



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**KARADENİZ ALABALIĞINDA (*SALMO TRUTTA LABRAX*) BAZI
KROMOZOM MANİPÜLASYON ÇALIŞMALARI**

Rahmi Can ÖZDEMİR

Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Aygül EKİCİ**

Haziran, 2018

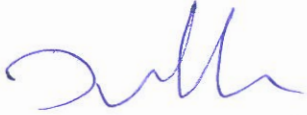
İSTANBUL

Bu çalışma, 22.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı
, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



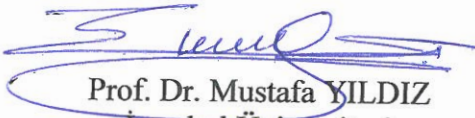
Doç. Dr. Aygöl EKİCİ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



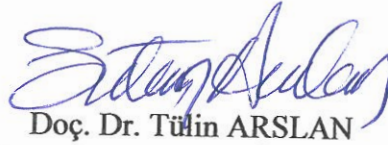
Prof. Dr. Devrim MEMİŞ
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Prof. Dr. İsmihan KARAYÜCEL
Sinop Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Doç. Dr. Tülin ARSLAN
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı değerli danışman hocam Doç. Dr. Aygöl EKİCİ'ye; benden yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. İsmihan KARAYÜCEL, Prof. Dr. Devrim MEMİŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Karadeniz alabalıklarının temini aşamasında her türlü destek ve yardımını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Adem Yavuz SÖNMEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Laboratuvar'ında benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Soner BİLEN ve Kastamonu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi lisans ve yüksek lisans öğrencilerine de çok teşekkür ederim.

En önemlisi beni her zaman destekleyen, en büyük manevi desteği veren hayat arkadaşım Yüksek Mühendis Keriman YÜRÜTEN ÖZDEMİR'e; babam Dr. Öğr. Üyesi Güven ÖZDEMİR, annem Sema ÖZDEMİR, kardeşim Av. Gözde Canan ÖZDEMİR ve babaannem Neriman ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2018

Rahmi Can ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. KARADENİZ ALABALIĞI (<i>SALMO TRUTTA LABRAX</i> PALLAS, 1811) GENEL ÖZELLİKLERİ	6
2.2. KARADENİZ ALABALIĞI ÜRETİMİ.....	8
2.3. BALIKLARDA GONAD ÖZELLİKLERİ	8
2.4. YUMURTA VE SPERM HÜCRESİNİN ÖZELLİKLERİ.....	8
2.4.1. Yumurta Hücresinin Özellikleri	8
2.4.2. Sperm Hücresinin Özellikleri	9
2.5. DÖLLENME VE EMBRİYONİK GELİŞİM	10
2.6. SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİNDE ÜREME BİYOTEKNOLOJİSİ UYGULAMALARI	12
2.7. HORMONAL CİNSİYET KONTROLÜ	14
2.8. KISIRLAŞTIRMA	15
2.9. KROMOZOM MANİPÜLASYONU.....	15
2.9.1. Poliploidi Uygulaması	16
2.9.2. Androenez Uygulaması	18
2.9.3. Ginenez Uygulaması.....	18
2.9.3.1. <i>Mayoginenez ve Mitoginenez Yöntemleri</i>	20
2.10. SU ÜRÜNLERİ ALANINDA GİNOGENEZ UYGULAMASININ ÖNEMİ VE YAPILAN ÇALIŞMALAR	21
2.11. POLİPLOİDİ VE GİNOGEN TANI METOTLARI	28
2.11.1. Akım Sitometrisi	28

2.11.2.	DNA Parmak İzi Analizi	30
2.11.3.	Morfolojik Tespit.....	31
2.11.4.	Karyotip Analizi	32
2.11.5.	Eritrosit Çap Ölçümü.....	32
2.11.6.	Cinsiyet Belirleme Geni ile Moleküler Tanımlama	33
3.	MALZEME VE YÖNTEM.....	35
3.1.	MALZEME.....	35
3.1.1.	Deney Yeri.....	35
3.1.2.	Deney Balıkları.....	35
3.1.3.	Deney Balıklarının Ağırlığı ve Boyu	36
3.1.4.	Deney Balıklarının Beslenmesinde Kullanılan Yem ve Besleme Şekli.....	36
3.1.5.	Deney Balıklarının Yetiştirildiği Havuzlar ve Havuzlarda Kullanılan Suyun Özellikleri	36
3.1.6.	Kuluçkahane	37
3.1.7.	Deneyde Kullanılan Solüsyonlar ve İçerikleri.....	38
3.1.7.1.	<i>Sperm Sulandırma Solüsyonları</i>	38
3.1.7.2.	<i>Fenoksi-ethanol</i>	40
3.1.7.3.	<i>Carnoy's Fiksatif</i>	40
3.1.7.4.	<i>Ringer Solüsyonu</i>	40
3.1.7.5.	<i>Colchicine (Kolşisin) solüsyonu</i>	40
3.1.7.6.	<i>Giemsa Boyası</i>	40
3.1.8.	Deneyde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	41
3.1.8.1.	<i>Ultraviyole Cihazı</i>	41
3.1.8.2.	<i>Multiparametre</i>	41
3.1.8.3.	<i>Sıcak Su İnkübatörü</i>	42
3.1.8.4.	<i>Jel Elektrophorez Cihazı</i>	42
3.1.8.5.	<i>Jel Elektrophorez Görüntüleme Cihazı</i>	43
3.1.8.6.	<i>Işık Mikroskopu</i>	43
3.1.8.7.	<i>Stereo mikroskop</i>	44
3.1.8.8.	<i>Isıtma Tablası</i>	44
3.1.8.9.	<i>Termal Döngü Cihazı</i>	45
3.1.8.10.	<i>Osmometre Cihazı</i>	45
3.1.8.11.	<i>Micro plate Reader</i>	46
3.1.8.12.	<i>Thoma Lamı</i>	46
3.1.8.13.	<i>Moleküler Tanı Kitleri ve Primerler</i>	47

3.2. YÖNTEM	48
3.2.1. Sperma Hareketlilik Oranı ve Süresinin Tespiti.....	48
3.2.2. Sperm Sulandırıcılarının Oranının Tespiti ile Sperm Hareketlilik Oran ve Sürelerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	48
3.2.3. Ginogenez Çalışması Deneme Grupları	49
3.2.4. Ultraviyole Uygulaması.....	49
3.2.5. Ginogen Diploid ve Triploid Karadeniz Alabalığı Eldesinde Sıcak Şok Uygulama Zamanı ve Süresinin Tespiti	49
3.2.6. Spermatozoa Sayımı	50
3.2.7. Karyotip Analizi	50
3.2.8. Moleküler Tanımlama	51
3.2.9. Eritrosit Çap Ölçümü.....	52
3.2.10. İstatistiki Analizler	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. SU SICAKLIĞI	54
4.2. SPERMANIN MORFOLOJİK VE SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ	54
4.2.1. Sperm motilitesi.....	54
4.2.2. Kullanılan sulandırıcılar ve sperm motilitesine etkisi	56
4.2.3. Sperma ve sulandırıcıların osmotik basınç değerleri ve sperma motilitesine etkisi.....	57
4.3. RADYASYON (UV) UYGULAMASI.....	58
4.3.1. UV ışınlama optimizasyonu	58
4.3.2. UV ışınlama sonrası sperma özellikleri.....	58
4.4. ŞOK UYGULAMASI	59
4.5. DENEY GRUPLARININ DÖLLENME, GÖZLENME VE YUMURTADAN ÇIKIŞ ORANLARI	60
4.6. KARYOTİP ANALİZİ	65
4.7. ERİTROSİT ÇAP ÖLÇÜMLERİ.....	65
4.8. AKİM SİTOMETRİSİ ÖLÇÜMLERİNE AİT VERİLER.....	68
4.9. MOLEKÜLER TANI	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ	104

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Karadeniz alabalığı döllenmiş yumurta görüntüsü (stereo mikroskop).....	9
Şekil 2.2: Karadeniz alabalığı spermatozoasının taramalı elektron mikroskopundaki görüntüsü.	10
Şekil 2.3: Karadeniz alabalığı yumurta bölünme aşamaları (Firidin ve diğ., 2012).	12
Şekil 2.4: Poliploidi uygulamasının şematik gösterimi (Arai, 2001).....	17
Şekil 2.5: Akım sitometrisi ile hücre döngüsünün incelenmesi (Walczak ve Haas, 2008).	28
Şekil 3.1: Çalışmanın yapıldığı tesisin genel görünümü.....	35
Şekil 3.2: Karadeniz alabalığı (Dişi).....	36
Şekil 3.3: Anaç balık havuzları	37
Şekil 3.4: Yumurta inkubasyonunda kullanılan kuluçkahane küvetleri ve tablalar.....	37
Şekil 3.5: UV Translinker cihazı.....	41
Şekil 3.6: Multiparametre cihazı	41
Şekil 3.7: Sıcak su inkübatörü.....	42
Şekil 3.8: Yatay jel elektroforez cihazı	42
Şekil 3.9: Jel görüntüleme cihazı	43
Şekil 3.10: Fotoğraf makinesi ataçmanlı ışık mikroskobu.....	43
Şekil 3.11: Bilgisayara bağlı fotoğraf makinesi ataçmanlı stereo mikroskop.....	44
Şekil 3.12: Isıtma tablası.....	44
Şekil 3.13: Termal döngü cihazları	45
Şekil 3.14: Osmometre cihazı	45
Şekil 3.15: Thermo MultiScan Go Mini drop cihazı	46
Şekil 3.16: Thoma lamı.....	46

Şekil 3.17: Moleküler tanı çalışmasında kullanılan DNA büyüklük belirteci (a) ve DNA polimeraz (b)	47
Şekil 3.18: Çalışmada kullanılan primer setleri.	48
Şekil 3.19: Döllenmiş yumurtalara sıcak şok uygulaması	50
Şekil 3.20: Moleküler tanı metodunda kullanılan Karadeniz alabalığı yavruları	51
Şekil 3.21: Eritrosit ve eritrosit çekirdek çaplarının ölçümü (A: Eritrosit majör aksis, B: Eritrosit minör aksis, a: Eritrosit çekirdek majör aksis, b: Eritrosit çekirdek minör aksis).....	53
Şekil 4.1: Aylara göre işletme su sıcaklığı değerleri.....	54
Şekil 4.2: Sperm motilite tespiti.....	56
Şekil 4.3: Sperma aylık osmotik basınç değerleri	58
Şekil 4.4: UV ışınlaması enerji düzeyi ve ışınlama sonrası sperm motilite yüzdesi.....	59
Şekil 4.5: Döllenmiş yumurtalara sıcaklık şoku uygulaması	59
Şekil 4.6: Deneme gruplarına ait gözlenme, yumurtadan çıkış ve yaşama oranları	61
Şekil 4.7: Deneme gruplarına ait sıcaklık şoku uygulamasına bağlı yumurtadan çıkış oranları.....	61
Şekil 4.8: Deneme gruplarının sıcak şok uygulamasına göre yaşam oranları	62
Şekil 4.9: Deneme gruplarına ait karyotip analizi sonuçları	65
Şekil 4.10: Deney gruplarına ait eritrosit görüntüleri (A: Kontrol grubu, B: Ginogen, C: Triploid).....	67
Şekil 4.11: Ginogenetik Karadeniz Alabalığında sdY Gen tespiti (G: Ginogenetik, EK: Erkek kontrol, DK: Dişi kontrol, K:Kontrol)	70

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1: Türkiye'nin 2014-2016 yılları arasındaki içsu balıkları üretimi (TUIK, 2017).....	2
Tablo 1.2: Türkiye'nin 2004-2016 yılları arasındaki su ürünleri yetiştiriciliği miktarları (ton).	2
Tablo 2.1: Kromozom manipölasyon uygulaması (Thorgaard, 1995).	16
Tablo 2.2: Farklı balık türlerinde ploid uygulamarları.	25
Tablo 2.3: Poliploidi tanı metotları.....	29
Tablo 2.4: Ginogenetik balık üretiminin morfolojik karşılaştırma yoluyla tespit edildiği çalışmalar.....	31
Tablo 3.1: Deneyde kullanılan kimyasallar	38
Tablo 3.2: Sperm sulandırma solüsyonları ve içerikleri.....	39
Tablo 3.3: Deneme gruplarının oluşturulması	49
Tablo 4.1: Sperm motilite yüzdesi ve süresi.....	55
Tablo 4.2: Deneme gruplarına ait embriyolojik gelişim safhaları.....	60
Tablo 4.3: Deneme gruplarına uygulanan UV, sıcak şok değerleri ve deneme gruplarına ait istatistiksel karşılaştırma	63
Tablo 4.4: Diploid ginogen ve triploid bireylerde eritrosit ve çekirdeklere ait bilgiler	66
Tablo 4.5: Kontrol grubu akım sitometrisi sonuçları.....	68
Tablo 4.6: Ginogen diploid grup akım sitometrisi sonuçları.....	68
Tablo 4.7: Triploid grup akım sitometrisi sonuçları.....	69

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
±	: Artı-Eksi
≈	: Yaklaşık değer
°	: Derece
μ	: Mikron
μl	: Mikrolitre
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μm ²	: Mikrometre kare
μm ³	: Mikrometre küp
α	: Alfa ışını
C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	: HEPES
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CaCl ₂ ·2H ₂ O	: Kalsiyum Klorür Dihidrat
cm	: Santimetre
cm	: Santimetre
d H ₂ O	: Distile su
DMS	: Dimetil Sülfat
γ	: Gama ışını
g	: Gram
K ₂ H ₂ PO ₄	: Potasyum Difosfat
KCl	: Potasyum Klorür
kg	: Kilogram
kJ/cm ²	: Kilojoule santimetre kare
KOH	: Potasyum Hidrooksit
M	: Molar
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	: Magnezyum Klorür Hekzahidrat
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	: Magnezyum Sülfat Hepta Hidrat
mM	: Milimolar
mOsm	: Mikroozmoz

Na₂HPO₄	: Sodyum Bifosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
pH	: Hidrojenin gücü
sa	: Saat
sn	: Saniye
W	: Watt
π	: Pi sayısı



Kısaltmalar	Açıklama
⁶⁰Co	: Cobalt 60
AMH	: Anti-Müllerian hormon
AR	: Androjen
AS	: Akım sitometrisi
CYP19	: Sitokrom P450 aromataz üretiminden sorumlu gen
DG	: Diploid ginogen Grup
DMRT	: Çifte cinsiyet ve mab-3 ile ilgili transkripsiyon faktörü
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ER	: Östrojen
FTZ-F1	: Nükleer hormon reseptörü
G	: Ginogenetik Grup
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
HBSS	: Hank's Dengeli Tuz Solüsyonu
K	: Kontrol Grubu
KPa	: Kilopaskal
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SD	: Cinsiyet belirleme
sdY	: Salmon cinsiyet belirleme geni
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Sox	: Sry ile ilişkili gen
T	: Triploid Grup
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
WT1	: Wilms tümör baskılayıcı geni

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KARADENİZ ALABALIĞINDA (*SALMO TRUTTA LABRAX*) BAZI KROMOZOM MANİPÜLASYON ÇALIŞMALARI

Rahmi Can ÖZDEMİR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Aygül EKİCİ

Bu tez çalışması, Avrupa’da ilk kültüre alınan kahverengi alabalığın (*Salmo trutta*) alt türü olan ve ülkemiz iç sularında doğal olarak bulunan Karadeniz alabalığının (*Salmo trutta labrax*) ginogenetik üretiminin gerçekleştirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada; Rize-Çamlıhemşin Ardesom alabalık üretim çiftliğinden temin edilerek Kastamonu ili Ilgaz Gürsu alabalık tesisine getirilen ortalama boyu $55,7 \pm 7,9$ cm, ağırlığı 1320 ± 220 g olan 17 adet dişi ve boyu $59,2 \pm 8,4$ cm, ağırlığı 1418 ± 310 g olan 24 adet erkek Karadeniz alabalığı kullanılmıştır.

Çalışma süresince uygun sperm sulandırma ortamının oluşturulması ve sulandırma oranının tespiti, spermatozoaya uygulanan UV ışık şiddetinin, dölleme ve sıcak şok uygulamasının optimizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ginogenez ve triploid uygulamalarının başarısını tespit etmek amacıyla deneme gruplarının larval yaşam oranları tespit edilmiş, karyotip analizi, eritrosit çap ölçümü ve akım sitometrisi ile DNA miktar tayini yapılmış ve ginogenez uygulamasının başarısı salmonid erkeklik geni (*sdY*) için moleküler tarama yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, sperm sulandırıcısı olarak hazırlanan 5 farklı solüsyonun sperm motilitesi üzerine etkileri tespit edilmiştir. Karadeniz alabalığı spermasının osmotik basınç değerinin 210-360 mOsm.kg⁻¹ ve pH’nın 7-8,5 arasında olduğu tespit edilmiştir. Sperm sulandırma solüsyonları, spermanın osmotik basınç ve pH değerlerine yakın değerlerde hazırlanmıştır. En iyi sperm motilite değeri olan %70-90 oranı HBSS solüsyonunun 1:20 (sperm : HBSS) oranında

sulandırılması ile elde edilmiştir. Döllemede kullanılan sperm+HBSS karışımı spermatozoa genetik materyalini inaktif hale getirmek amacıyla UV ışığına maruz bırakılmıştır. Sperm öldürmeden genetik materyali inaktif hale getirecek optimal ışıma dozu farklı enerji seviyeleri (2500-5000 kJ/cm²) kullanılarak test edilmiştir. Bu testler, 4500 kJ/cm² gibi yüksek bir dozun sperm tamamen öldürdüğünü (%0 motilite), 3600 kJ/cm² gibi bir dozun yaşam oranlarını en az düşürerek (>%60 motilite) sperm DNA'sını etkisiz hale getirdiğini göstermiştir.

Ginogenetik üretim denemeleri üç tekrarlı olarak dört grup; haploid, diploid normal (kontrol), diploid ginogen ve triploid, üzerinde gerçekleştirilmiştir. Her bir deneme grubunda 32,5±2,5 g (375±50 adet) yumurta kullanılmıştır. Dölleme sonrası sıcak şok uygulaması 5 farklı sıcaklık derecesinde 15 ve 20 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. En iyi gözlenme oranı (%89,59±2,18), yumurtadan çıkış (%82,86±3,11) ve larval yaşam (%79,61±1,25) oranları 28,5°C'lik sıcaklık şokuna maruz kalan döllenmiş yumurtalarda görülmüştür. Deneme grupları arasında yapılan istatistiksel analizler ile şoklama sıcaklığı arttıkça gözlenme, yumurtadan çıkış ve larval yaşam oranlarının düştüğü ortaya konulmuştur (P<0,05). Embriyolojik gelişim ve yumurtadan çıkış süreleri karşılaştırıldığında, kontrol (440 gün-derece), ginogen diploid (460 gün-derece) ve triploid (448 gün-derece) gruplar arasında istatistiksel bir farkın olmadığı (P>0,05), haploid gruba ait embriyoların tamamının 3-7. günler sonunda öldüğü tespit edilmiştir.

Karyotip analizi sonuçları incelendiğinde, kontrol ve ginogen diploid grup kromozom sayılarının 2n=80 olduğu, triploid grupta kromozom sayısının ise 80'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Eritrosit çap ölçümü sonuçları incelendiğinde, triploid grup (T) ile diploid ginogen grup (G) eritrosit çapları oranının T/G=1,8 olduğu, kontrol grup (D) ile ginogen diploid grup eritrosit çapları oranının ise D/G=0,98 olduğu tespit edilmiştir. T/D oranının >1,5 ve G/D oranının ≈1 olması uygulamaların başarısını ortaya koymuştur. Akım sitometrisi sonuçları incelendiğinde, ploidi seviyesini belirleyen G0+G1 değerinin gruplar arasındaki oranlarının T/D = 1,978 ve G/D = 1,016 olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar; T/D>1,5 ve G/D≈1, yine uygulamaların başarısını ortaya koymuştur.

Salmonid erkeklik geni *sdY*'nin varlığı ya da yokluğuna dayalı moleküler tanı yöntemi kullanılarak bireylerin cinsiyeti belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak gerçekleştirilen bu işlem sonucunda, ginogen olduğu varsayılan grupların tamamında *sdY* geninin bulunmadığı tespit edilmiş ve ginogen üretimin başarısı doğrulanmıştır.

Embriyolojik gelişim aşamaları, karyotip analizi, akım sitometri ve *sdY* gen tespiti sonuçları değerlendirildiğinde, ginogenetik Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*) üretiminin başarı ile gerçekleştirildiği ortaya konulmuştur. Moleküler tanılamada kullanılan *sdY* geninin tespiti amacıyla *Salmo trutta labrax* türüne özgü yeni primer setleri belirlenmiştir. Yüksek yaşama oranına (>%80) sahip ginogenetik üretimi için bu çalışmada geliştirilen yöntem, akuakültür sektörü tarafından triploid alabalık üretiminde de kullanılabilir. Bu tez çalışması sayesinde geliştirilen ginogenetik Karadeniz alabalığı üretim tekniği, su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli yere sahip tek cinsiyetli kültür ve genetik performans artırma çalışmaları açısından da fayda sağlayacaktır.

Haziran 2018, 123 sayfa.

Anahtar kelimeler: Karadeniz alabalığı, Ginogenez, UV ışınlanması, Sıcak şok, Ginogen tanı metotları, *sdY* geni

SUMMARY

Ph.D. THESIS

SOME CHROMOSOMAL MANIPULATION STUDIES ON BLACK SEA TROUT (*SALMO TRUTTA LABRAX*)

Rahmi Can ÖZDEMİR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Aquaculture and Fish Diseases

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aygöl EKİCİ

The study in this dissertation was carried out in order to produce gynogenetic black sea trout (*Salmo trutta labrax*) that is naturally found in Turkey's inland waters which is a subspecies of brown trout (*Salmo trutta*) cultured first species in Europe. Seventeen female fish with an average length of $55,7 \pm 7,9$ cm and an average weight of 1320 ± 220 g, 23 male fish with an average length of $59,2 \pm 8,4$ cm and an average weight of 1418 ± 310 g used in this study were obtained from Ardesom trout farm located in Rize-Çamlıhemşin and brought to Ilgaz Gürsu trout farm in Kastamonu Province.

The different stages of study were included determination of appropriate sperm dilution media and dilution rate, works done on optimization of UV irradiation dose for spermatozoa, fertilization and heat shock applications. Evaluation of larval survival rates of the experimental groups, karyotypes, erythrocyte diameters, DNA quantity by flow cytometry both gynogenetic and triploid induction success by molecular screening for salmonid male-determining gene (*sdY*).

In the study, the effects 5 different sperm diluent solutions on sperm motility were determined. The osmotic pressure and pH values of black sea trout semen were determined to be in between $210-360$ mOsm.kg⁻¹ and 7-8.5, respectively. All diluent solutions were prepared at close values to natural osmotic pressure and pH of fish semen. The best sperm motility ratio of 70-90% was

obtained with HBSS solution at a dilution ratio of 1:20. Sperm+HBSS mixture used for fertilization were exposed to UV irradiation in order to inactivate sperm genetic material. Optimal UV irradiation dose to inactivate the genetic material without killing sperm was evaluated at different energy levels (2500-5000 kJ/cm²). These trials revealed that a UV dose as high as 4500 kJ/cm² killed all sperm (0% motility), a UV dose of 3600 kJ/cm² had the least effect on sperm survival rates (>60% motility) and successfully inactivated the sperm genetic material.

Gynogenetic production experiment was carried out in triplicates on 4 groups; haploid, diploid normal (control), diploid gynogen and triploid. In each experimental group, 32.5 ± 2.5 g (375 ± 50) eggs were used. Heat shock treatments after fertilization was performed at 5 different temperature levels for 15 and 20 minutes. The group with the best eyeing ratio (89,59±2,18%), hatching ratio (82,86±3,11%) and larval survival rate (79,61±1,25%) was obtained at 28,5°C heat shock treatment. Statistical analysis revealed that there is a inverse relationship in between shock temperature and eyeing ratio, hatching ratio and larval survival rates (P<0.05). When embryonic development and hatching times were compared, there was no statistical differences among control (440 degree-days), gynogen diploid (460 degree-days) and triploid (448 degree-days) groups (P> 0,05) and complete mortality occurred at the end of 3.-7. day in embryos belonging to the haploid group.

When karyotype analysis results were examined, it was determined that chromosome numbers of control and gynogen diploid groups were 2n = 80 and triploid group had more than 80 chromosomes. Examination the results from erythrocyte diameters demonstrated that the ratio of erythrocyte diameters in between the triploid group (T) and the gynogen group (G) was T/G=1.8, and the ratio of erythrocyte diameters in between the control group (D) and the gynogen diploid group was D/G = 0.98. The ratio of >1.5 for T/D and ≈1 for G/D confirmed the success of applications. When the flow cytometry results were examined, it was determined that the ratio of G0 + G1, which determines ploidy level in between the groups, was T/D = 1,978 and G/D = 1,016. Again these ratios; T/D>1.5 and G/D ≈1, showed the success of applications.

Molecular analysis based on the presence or absence of salmonid male determining gene *sdY* were run to determine the gender of individuals. The results of this process, which was performed using polymerase chain reaction (PCR), demonstrated that no individual from presumptive ginogenetic groups carried *sDY* gene and confirmed the success of gynogen production.

The results from embryonic development, karyotype analysis, flow cytometry and molecular detection of *sdY* gene altogether showed that gynogenetic black sea trout (*Salmo trutta labrax*) was successfully produced in this study. During the study, new primer sets were evaluated for the detection of *sdY* gene. The high surviving (> 80%) gynogenetic production procedure developed during this study can also be used by triploid production in aquaculture sector. Additionally, gynogenetic Black sea trout (F₁) production technology developed through this study can be benefited by the other important technologies commonly employed in aquaculture such as monosex culture or genetic performance improvement.

June 2018, 123 pages.

Keywords: Black sea trout, Gynogenesis, *sdY* gene, UV irradiation, Heat shock, Identification of gynogenesis

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun tükettiği gıdaların temelinde bitkisel ve hayvansal proteinler önemli yer tutmaktadır. Hayvansal proteinler içerisinde ise su ürünlerinin önemi oldukça yüksektir. Dünyadaki nüfusun hızlı artışı yanı sıra toplumdaki beslenme bilincinin gelişmesi önemli bir hayvansal protein olan balık etine talebi artırmaktadır. Dolayısıyla su ürünleri yetiştiriciliği, dünya genelinde besin üretimi açısından en hızlı büyüyen sektör olup dünya balık ihtiyacının yaklaşık %50'sini karşılamaktadır (FAO, 2013).

Dünyada su ürünleri yetiştiriciliği M.Ö. 2000 yıllarında sazan üretimi ile Çin'de başlamıştır (Rabanal, 1988). Balık yetiştiriciliği ile ilgili ilk bilimsel bilgiler Çinli Fan Lai tarafından M.Ö. 475 yılında yazılmıştır (Aras, 1997). Ülkemizde ise su ürünleri yetiştiriciliği 1970'li yıllarda gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve yarı-entansif yada entansif sazan (*Cyprinus carpio*) üretimi ile başlamıştır. Karadeniz Bölgesi'nde su ürünleri yetiştiriciliği 1990 yılında salmonid türlerinin (Atlantik salmonu, *Salmo salar*, ve gökkuşağı alabalığı) üretimiyle başlamıştır (Çelikkale, 2002; Okumuş, 2002).

Dünya'da 1995'li yıllarda gerçekleştirilen balık üretim miktarı 106 milyon ton iken, 2000'li yıllarda 126 milyon ton ve 2010 yılında ise 148.476.000 tona ulaşmıştır. Bunun % 40.32'si yetiştiricilik yoluyla elde edilmiştir (FAO, 2014). Yetiştiricilikte önemli bir yer tutan salmonidlerden Atlantik salmonunun üretimi 2010 yılında 1.425.968 ton, gökkuşağı alabalığının ise 728.448 ton olduğu bildirilmiştir (FAO, 2012). Ülkemizde ise 2010 yılında su ürünleri üretimi 653 bin ton olarak bildirilmiştir, bu üretimde yetiştiriciliğin payı 167 bin ton iken 2011 yılında su ürünleri üretimi %7,73 artarak 703 bin ton ulaşmış ve yetiştiriciliğin payı 188 bin ton olmuştur. Üretimin %61,45'i deniz balıklarından, %6,45'i diğer deniz ürünlerinden, %5,27 'si içsu ürünlerinden ve %26,83 'ü yetiştiricilikten elde edilmiştir. Bu üretimde önemli bir paya sahip olan alabalık üretimi ise ülkemizde 2016 yılında içsularda 101.297 ton ve denizlerde ise 5.716 ton olarak gerçekleşmiştir (Tablo 1.1; Tablo 1.2) (TUİK, 2017).

Tablo 1.1: Türkiye'nin 2014-2016 yılları arasındaki içsu balıkları üretimi (TÜİK, 2017).

Balık türü	2014	2015	2016
İç su			
Gökkuşağı alabalığı	107.533,0	100.411,0	99.712,0
Alabalık (<i>Salmo sp.</i>)	450,0	755,0	1.585,0
Deniz			
Gökkuşağı alabalığı	4.812,0	6.187,0	4.643,0
Alabalık (<i>Salmo sp.</i>)	798,0	685,0	1.073,0

Tablo 1.2: Türkiye'nin 2004-2016 yılları arasındaki su ürünleri yetiştiriciliği miktarları (ton).

	Deniz Ürünleri	Yetiştiricilik Üretimi	Tatlısu Ürünleri
2004	504 897	94 010	45 585
2005	380 381	118 277	46 115
2006	488 966	128 943	44 082
2007	589 129	139 873	43 321
2008	453 113	152 186	41 011
2009	425 046	158 729	39 187
2010	445 680	167 141	40 259
2011	477 658	188 790	37 097
2012	396 322	212 410	36 120
2013	339 047	233 394	35 074
2014	266 078	235 133	36 134
2015	397 731	240 334	34 176
2016	301 464	253 395	33 856

Dünya üzerinde yetiştiriciliği yapılan ve deneme aşamasında olan Salmonidae familyasına ait birçok tür bulunmaktadır. Salmonidlerin üzerinde çok fazla çalışılmasının nedenleri; ilginç hayat hikâyeleri, türler arası ve aynı türün farklı ortamlarda yaşayan stokları arasındaki genetik farklılıklar, görünüş olarak ilgi çekici oluşu, et özellikleri ve diğer türlere nazaran yetiştiricilik çalışmalarında başarı oranının yüksek olmasıdır (Civelek, 2012).

Avrupa'da ilk kültüre alınan tür olan kahverengi alabalıklar (*Salmo trutta sp.*), sportif balıkçılık ve doğal ortamın balıklandırılması amacıyla kullanılmaktadır. İlk kuluçkahane 1841 yılında Boccia tarafından kurulmuş ve 1850 yılında ise Coste tarafından yapay üretim optimum hale getirilmiştir. Daha sonra Avrupa'da ve diğer kıtalarda kahverengi alabalık üretimi ortaya çıkmıştır. Bu balık türü Britanya'da 1980'li yılların sonunda deniz kafeslerinde salmon üretimine alternatif olarak düşünülmüştür (Weeks, 1998). Bu durum alabalıkların hızlı büyüyen soylarının gelişimine yol açmıştır (Vandeputte, 2008). Gelişmiş ülkelerde sportif balıkçılık son yıllarda çok önem kazanmıştır. Kahverengi alabalıklar görünüm ve et kalitesi ile sportif amaçlı ve ticari olarak iç sularda önemli yer tutmaktadır. Kahverengi alabalıkların özel isteklerinin ve kültür şartlarında yetiştiriciliğinin zor olması sebebiyle gökkuşağı alabalığı ile rekabet edememiştir (Kocabaş, 2009).

Ülkemizde son yıllarda yeni türlerin yetiştiriciliğine olan ilgi giderek artmaktadır. Karadeniz'de 1990'lı yıllarda araştırma, geliştirme ve pilot üretim çalışmaları yapılmaksızın denize kurulan ağ kafeslerde Atlantik salmonu (*Salmo salar*) ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği yapılmıştır. Ancak yaz aylarında Karadeniz'de su sıcaklığının salmonid türler için yüksek olması sebebiyle beklenen başarı elde edilememiştir. Bu nedenle, akuakültür sektörüne yeni türlerin kazandırılması amacıyla 1997 yılından itibaren Karadeniz alabalığı üretimi ile ilgili önemli gelişmeler kaydedilmiş ve özel sektör bu tür için yatırımlar başlatmıştır (Çakmak, 2009). 1997-2001 yılları arasında Karadeniz alabalığının biyo-ekolojik özelliklerinin ve kültür imkanlarının araştırılması, 2002-2008 yılları arasında Karadeniz alabalığının yetiştiriciliği ve balıklandırma amacıyla kullanımı, 2004-2007 yıllarında Türkiye'de kahverengi alabalık popülasyonlarının genetik yapısının belirlenmesi ve 2007-2010 yıllarında Karadeniz alabalığının özel sektöre kazandırılması ile ilgili bilimsel çalışmalar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Çakmak, 2009).

Akuakültür sektörüne yeni türlerin kazandırılması çalışmalarının yanı sıra yetiştiriciliği yapılan türlerin sayıca artırılması, istenilen cinsiyette ve özellikte türlerin eldesi çalışmaları da önem

kazanmaktadır. Yetiştiricilik için, hızlı büyüme yeteneğine sahip ve ortam şartlarına iyi adapte olabilen balıklar tercih edilmektedir. Bu bağlamda su ürünlerinde üretimi artırmak amacıyla, biyoteknolojik uygulamaların geleneksel yetiştiricilik metotlarıyla birlikte kullanılması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu çalışmalar ağırlıklı olarak laboratuvar çalışmalarıyla sınırlı kalmıştır (Turan, 2000). Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda geleneksel ıslah çalışmalarının yanı sıra son 30 yıldır su ürünleri yetiştiriciliği sektörünün de gündeminde yer alan ve kullanım alanına sahip olan biyoteknolojik uygulamalarla daha fazla ürün eldesi, eşeysel olgunlaşma yaşını düşürmek, büyüme hızını, yumurta verimini ve larval safhadaki yaşama oranını artırmak mümkündür (Dunham, 2004). Ayrıca biyoteknolojinin kullanılması ile canlının hastalıklara karşı direnci, yemden ete dönüşüm etkinliği ve etin kalitesi yükseltilebilir (Şahin, 2003; Başçınar ve Sonay, 2009). Bu uygulamalar içerisinde sperm kriyoprezervasyonu (Ekici ve diğ., 2012; Yamaner ve diğ., 2015), gen transfer teknolojisi (Ekici ve diğ., 2007), germ hücre izolasyonu (Atmaca, 2017) ve transplantasyonu, kromozom manipülasyonu (Özdemir ve Ekici, 2017) yer almaktadır. Su ürünlerinde yoğun uygulama alanına sahip olan kromozom manipülasyon teknikleri kullanılarak poliploid balık üretilebileceği gibi ginogenetik ve androgenetik balık üretimi de mümkün olmaktadır (Ueno, 1989; Bhise ve Khan, 2002).

Dünyada su ürünleri sektöründe ve diğer sektörlerde üreme biyolojisi çalışmalarında yardımcı “üreme teknikleri” adı altında çok farklı uygulamalar kullanılmaktadır. Bu tekniklerin kullanımı ile ürün miktarını artırmak ve üretim maliyetini düşürmek mümkün olduğu gibi tek cinsiyetli soy üretimi gerçekleştirmekte mümkündür. Alabalıkları da içeren bazı balık türlerinde dişiler erkeklere göre daha hızlı büyür ve satış boyuna daha hızlı ulaşır. Bu sonuçtan yola çıkarak bu tez çalışmasında ginogenetik balık üretimi gerçekleştirilerek tamamı dişi popülasyonların eldesi planlanmıştır. Ülkemizde tatlı suda yetiştirilen türler arasında ilk sırayı gökkuşağı alabalığı almakta, bazı özel çiftliklerde az miktarlarda da olsa Karadeniz alabalığı, kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve diğer alabalık türleri yetiştirilmeye başlanmıştır. Yukarıda bahsettiğimiz üreme biyoteknolojisi uygulamalarından biri olan triploid üretim çalışmaları özellikle Salmonidae familyasına ait türler üzerinde bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılmakla birlikte ticari işletmelerde de uygulama alanına sahiptir. Ülkemizde ise son yıllarda triploid üretim uygulamaları yanı sıra ginogen üretim çalışmaları yapan az sayıda işletme olmasıyla birlikte talep günden güne artış göstermektedir. Bu amaçla ülkemiz sularında da dağılım gösteren Karadeniz alabalığı üzerinde daha önce triploid üretimi ile ilgili bir çalışma

gerçekleştirilmiştir. Fakat ginogenetik üretim ve moleküler tespit yöntemlerinin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1 KARADENİZ ALABALIĞI (*Salmo trutta labrax* PALLAS, 1811) GENEL ÖZELLİKLERİ

Dorsal ve kaudal yüzgeç arasında adipoz yüzgeci olan Salmonidler 11 aile ve 225 türü içermektedir (Anonim, 2018). Alabalıklar, çevresel şartlara yüksek adaptasyonu, morfolojik ve ekolojik farklılıklardan kaynaklanan yaşam şekilleri nedeniyle, günümüze kadar birçok bilim adamı tarafından değişik isimler altında karakterize edilmişlerdir (Kocabaş, 2009). Kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) Avrupa iç suları için endemik bir türdür. Bulunduğu bölgeye ve çevresel şartlara göre vücut rengi ve şekli farklılaşabildiğinden araştırmacılar tarafından "*Salmo trutta* sp." alt-tür olarak isimlendirilmiştir (Stevenson, 1987). Kahverengi alabalığın farklı formları için 57 ayrı tür ismi 18. yüzyılın ortalarından günümüze kadar ileri sürülmüştür (Çiftçi ve diğ., 2009). Alabalıklarda görülen farklılıkların oluşumunun kısmen genetik farklılıklardan oluştuğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmekteyse de, Linnaeus'un ortaya attığı, "*Salmo trutta* tek bir türdür" savı en muhtemel olanıdır (Çakmak ve diğ., 2008).

Salmo trutta'nın sistematigi aşağıdaki gibi verilmektedir (Anonim, 2018).

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Alt-Şube: Vertebrata

Üst-sınıf: Osteichthyes

Sınıf: Actinopterygii

Alt-sınıf: Neopterygii

Alt-sınıf: Teleostei

Üst-takım: Protacanthopterygii

Takım: Salmoniformes

Aile: Salmonidae

Cins: *Salmo*

Tür: *trutta* Linnaeus, 1758

Ülkemiz faunasında yer alan kahverengi alabalıklar, beş farklı ekotip ile temsil edilmektedirler. Ayrıca ülkemizdeki bazı sularda birden fazla ekotipin yer aldığı birçok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (Geldiay, 1968; Geldiay ve Balık, 1996). Bunların adapte oldukları ortam veya coğrafi bölgeye göre en yaygın olanları; *Salmo trutta fario* Linnaeus, 1758 (dere alabalığı), *Salmo trutta labrax* Pallas, 1811 (Karadeniz alabalığı), *Salmo trutta macrostigma* Dumeril, 1858 (Anadolu alabalığı), *Salmo trutta caspius* Kessler, 1877 (Aras alabalığı), *Salmo trutta abanticus* Tortone, 1954 (Abant alabalığı) ve *Salmo trutta lacustris* Linnaeus, 1758 (göl alabalığı)'dır (Kocabaş, 2009). Kuluçkahanede yetiştirilen saf deniz alabalıklarının akarsulara ve yapay göllere stoklama denemeleri, kısa süre sonra deniz alabalığı ile kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) arasında fark olmadığını ortaya koymuştur. Kosswig 1969 yılında yapmış olduğu çalışmada, Kuzey Doğu Anadolu'daki alabalıkların *Salmo trutta labrax* alt türüne ait olduğunu belirtmiştir. Ninua ve diğ., (2018) Doğu Karadeniz bölgesinde deniz ve tatlı sulardan elde ettikleri balık örneklerinde filogenetik analiz çalışması yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar *Salmo coruhensis* ve *Salmo trutta labrax*'ın alt türlerinin filogenetik olarak benzer olduğunu göstermiştir.

Karadeniz alabalığı hayatlarının büyük bir kısmını beslenmek amacıyla denizlerde geçirir ve cinsel olgunluğa ulaştıklarında üremek için tatlı suya göç ederler. Ebeveynlerinin yumurta bıraktıkları sulara dönmeleri en önemli özellikleridir. Fakat eşeyssel olgunluğa 2-4 yaşları arasında ulaşan deniz alabalıkları, salmonların aksine döl verdikten sonra yaşamlarına devam edip, tekrar denizlere döner ve birkaç kez üreme göçü gerçekleştirirler (Çelikkale, 2002). Deniz ekotipinin yumurtlama dönemi Kasım-Aralık aylarında başlamakta ve Şubat ayının sonlarına kadar devam etmektedir. Yumurtlamak için genellikle su kaynağının başlangıcında çakıllı yerleri ve yan kolları tercih ederler (Çakmak ve diğ., 2005). Karadeniz alabalıklarında yumurtlama su sıcaklığının 8-10°C arasında olduğu Ekim sonu ile Aralık ayları arasında gerçekleşmekte ve dişilerin %80'i Kasım ayı içerisinde yumurtlamaktadır. Fekonditeleri 2000-3000 adet yumurta/kg dişi ağırlığı ve yumurta çapları 4,8-7,2 mm civarındadır. Larvaların yumurtadan çıkışı 5-7°C'de döllenmeden 60-80 gün sonra başlar ve keseli larvalar Nisan ayında ortaya çıkar. Yumurtadan serbest yüzme aşamasına kadar olan süre su sıcaklığına bağlı olarak iki aydan daha uzun sürebilir. Denize göç eden smoltların dere ağızlarındaki ve denizlerdeki başlıca besinlerini böcekler oluşturur. Denizde ise hamsi, küçük balıklar ve crustacea, göl ve nehirlerde yoğun olarak sucul böcekler ve bazı hayvansal detritus ile beslenirler. İlk büyüme

dönemi sonunda nehirlerdeki juveniller 9,5-16,5 cm boya ve 13-50 g ağırlığa ulaşırlar. İkinci yaşlarında ise 16-36 cm, 3. yaşta 42,5-57,0 cm boya ulaşırlar (Okumuş, 2004).

2.2 KARADENİZ ALABALIĞI ÜRETİMİ

Karadeniz alabalığı Doğu Karadeniz Bölgesinde doğal yaşama alanına sahip bir türdür. Rize ve Artvin ili havzalarında 2013 yılında yapılan tür koruma eylem planı çalışmaları sırasında farklı yaş ve boylarda karadeniz alası bulunduğu tespit edilmiştir. Başta Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü olmakla birlikte konusunda uzman akademisyenlerin danışmanlığında özel birkaç işletmede Karadeniz alabalığının üretim çalışmaları üreme döneminde doğadan anaçların yakalanıp üretim tesislerine konulmasıyla başlamıştır. TÜİK verileri incelendiğinde tam olarak üretim miktarı bilgisine tür bazında ulaşılamamasına rağmen son yıllarda özellikle Rize Çamlıhemşin bölgesinde ki alabalık çiftliklerinde yine Rize ilinde bulunan işletmelerde de Karadeniz alabalığı üretimi gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra araştırma, geliştirme çalışmaları ve farklı tür alabalık yetiştiriciliği amacıyla İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi, Sapanca İçsu Uygulama ve Araştırma Birimi ile Kastamonu Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İçsu ve Deniz Balıkları Araştırma ve Uygulama Merkezi Karadeniz alabalığını bünyelerinde bulundurarak bölgesel işletmelere yavru desteği sağlamaktadır.

2.3 BALIKLARDA GONAD ÖZELLİKLERİ

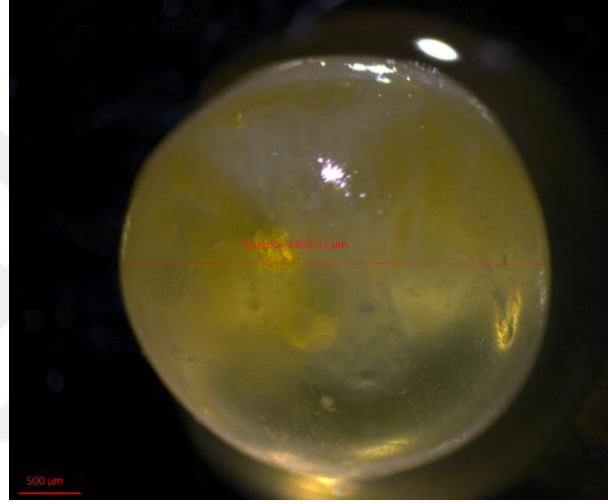
Teleost balıklarda gonadlar, bilateral yerleşmiş bir çift parmaklı uzantı şeklinde olup mesenterium ile ön vücut boşluğunun tavanına asılı olarak bulunurlar. Birçok teleost balıkta gonadların duvarı yumurta (oviduct) ve sperm kanalı oluşturmak üzere arkaya doğru uzanır ve genelde arkada genital açıklıkla birleşir. Gonadlar üreme (germ) ve somatik hücreler olmak üzere iki tip temel hücre içerir. Germ hücreleri olgun gametleri oluştururken (yumurta ve sperm hücresi), somatik hücreler ise üreme hücrelerinin gelişimini destekleyerek, aktivitesini düzenler (Braat ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2010; Can, 2014).

2.4 YUMURTA VE SPERM HÜCRESİNİN ÖZELLİKLERİ

2.4.1 Yumurta Hücresinin Özellikleri

Farklı balık türlerine ait yumurta hücrelerinin morfolojik yapısı birbirleriyle benzerlik göstermektedir. Balık yumurtası; koryon adı verilen bir yumurta kılıfı ile çevrili olup, animal

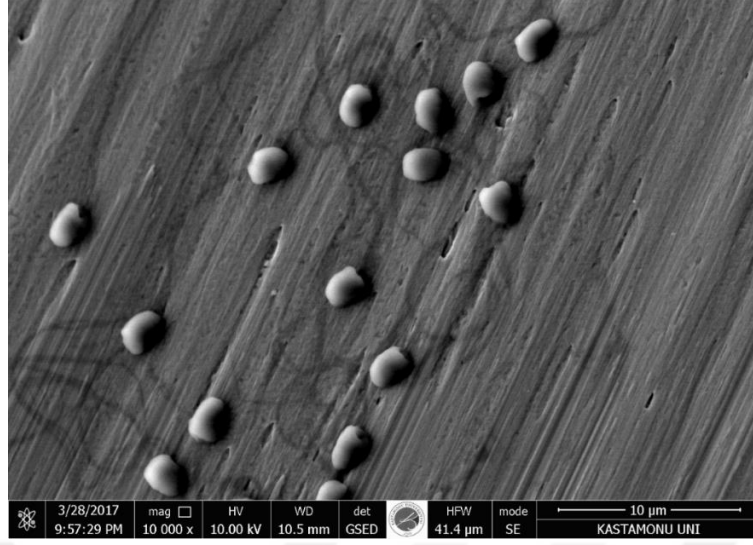
ve vejetatif kutup olmak üzere iki kısma ayrılır. Bunlar oogenez sırasında yumurta folikülünü çevreleyen zona radiata ile temas halindedir ve fertilizasyon sırasında perivitellin boşluğun oluşumunda önemli rol oynar. Balık yumurtasının yüzeyinde bulunan mikrofil deliği vasıtasıyla sperm hücresinin yumurta hücresi içerisine girişi ile fertilizasyon gerçekleşir (German ve diğ., 2001; Savaş, 2001). Kahverengi alabalığın (*Salmo trutta sp.*) yumurta hücresinin çapı 2,3-7,2 mm arasında yaşına ve alt türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bagenal, 1969; Dębowski ve diğ., 2005). Karadeniz alabalığı yumurtasının çapı Firidin ve diğ. (2012) çalışmasında 5,1 mm, çalışmamızda ise 4,3 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Karadeniz alabalığı döllenmiş yumurta görüntüsü (stereo mikroskop).

2.4.2 Sperm Hücresinin Özellikleri

Sperm hücresi olarak adlandırılan spermatozoon morfolojik olarak; baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Ancak; baş bölgesinin morfolojik yapısı (ince-uzun, elipsoidal ya da küresel) türlere göre farklılık göstermektedir (Jamieson, 1991). Birçok balık türünde sperm hücresinin yapısal özellikleri incelenmiş ve baş uzunluğu 2-2,8 µm ve şekli elipsoidal yapıdan ovoidal yapıya değişiklik gösterdiği, kuyruk uzunluğunun ise $32 \pm 1,4$ µm olduğu tespit edilmiştir (Cruea, 1969). Karadeniz alabalığı spermatozoonuna ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü incelenmiş ve şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Karadeniz alabalığı spermatozoasının taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü.

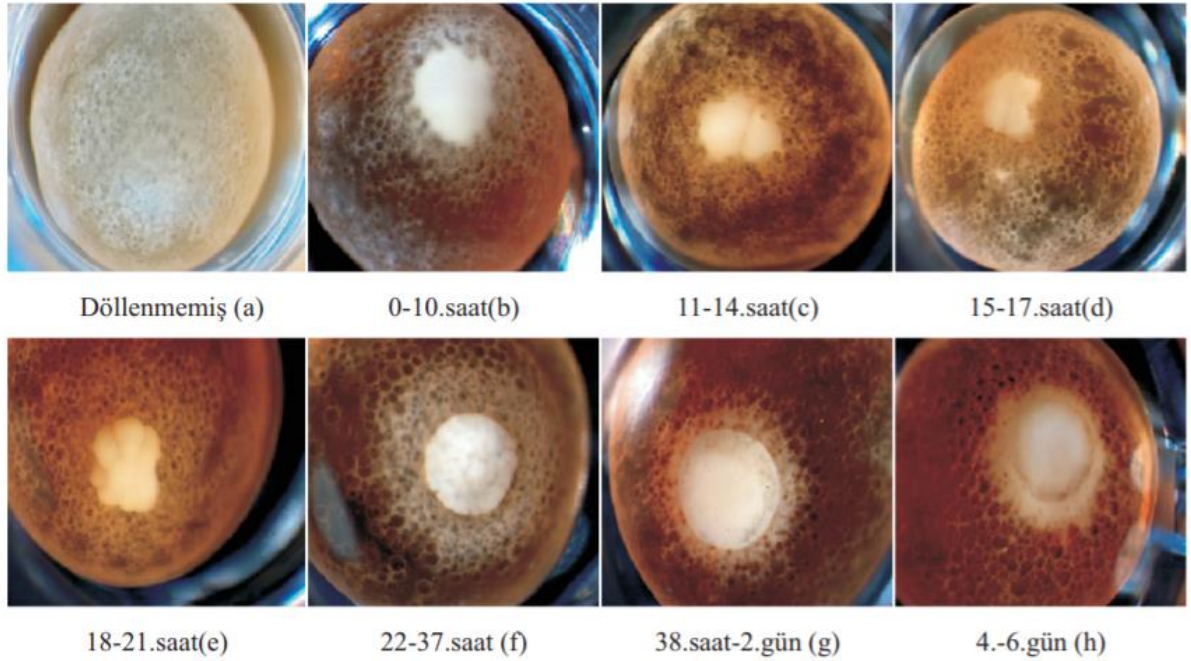
Spermatogenez; balıklarda ilk olarak üreme dönemine yaklaşıldığında spermatogonial germ hücrelerinin oluşumu (spermatogonia) ile başlar ve spermatidlerin oluşumuyla sonlanan ikinci mayoz aşamasıyla devam eder. Son olarak, spermatidlerin de farklılaşmasıyla sperm hücresi (spermatozoa) oluşur (Felice ve Rash, 1969; Grier ve Taylor, 1998). Testis dokusu içerisinde bulunan spermatozoa hareketsiz olup su ile temas etmesi durumunda osmotik basınçtaki değişim ile hareketlilik (motilite) kazanır (Rurangwa ve diğ., 2004; Alavi ve Cosson, 2006). Genellikle her balık türüne ait spermatozoa motilite süresi farklılık göstermekle birlikte motilite süresi oldukça kısadır. Örneğin, motilite süresinin kahverengi alabalık (*Salmo trutta* sp.) için 35-50 sn (Vladic ve Jätrvi, 1997), karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*) için 44-78 sn (Erbaş ve Başçınar, 2013), gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) için 40-51 sn (Bozkurt ve Yavaş, 2013), sazan balığında (*Cyprinus carpio*) için 50–78 sn (Tabakoğlu, 2005), zebra balığında (*Danio rerio*) için 35-60 sn (Jonas ve diğ., 2007; Jing ve diğ., 2009; Rongyan ve diğ., 2009; Özdemir ve Ekici, 2017) ve lepistes balığı (*Poecilia reticulata*) için ise 30-40 sn (Gasparini ve diğ., 2009) olduğu tespit edilmiştir.

2.5 DÖLLENME VE EMBRİYONİK GELİŞİM

Olgun balık yumurtası suya bırakıldığında, II. mayotik bölünmenin metafaz safhasındadır. Döllenme ile aktive olan yumurtada, önce II. mayotik bölünme tamamlanır ve dişiye ait ekstra kromozom takımı 2. kutup hücresi olarak uzaklaştırılmak üzere animal kutuba doğru itilir.

Geriye kalan haploid kromozom takımı bir dişiye ait pronukleusu oluşturur. Bu olay döllenmeden ayrı olarak gerçekleşir ve su ile temas eden bütün yumurtalarda bu yapı görülür (Wolenski ve Hart, 1987). Spermatozoon, kemotaksi ile yolunu bularak kuyruk hareketleri sonucunda mikrofil deliğinden yumurtaya giriş yapar (Amanze ve Iyengar, 1990). Çoğu balık türünde mikrofil deliğinin çapı tek bir spermatozoonun girebileceği büyüklüktedir (Kudo, 1980). Spermatozoonun baş kısmı mikrofil deliğinden içeri girdikten sonra kuyruktan ayrılır. Çekirdek bundan hemen sonra 180° döner ve aynı zamanda yumurtada şişme başlar. Nukleusun kromatin iplikleri gevşer ve spermatozoon nukleusu ince kromatinlerle hafif veziküler erkek pronukleusuna doğru ilerler. Bu yapı; sperm hücresinin sentrozomu etrafında şekillenir ve “spermaster” olarak adlandırılır ve dişi pronukleusuyla karşı karşıya gelecek şekilde animal kutubun tam ortasındaki erkek pronukleusuna doğru ilerler. Her iki pronukleus birbirine yaklaşır ve iç iplikleri onları yakalar. Daha sonra pronuklei yavaşça parçalanır ve kromozomlar kendi karakteristik gruplarını oluşturur. Sonuç olarak; iç iplikleri ilk mitotik bölünmede kromozomları kutuplara çeker ve mitotik bölünmeler başlar (Dettlaff ve diğ., 1993).

Karadeniz alabalığı embriyolojik gelişimi; yumurtanın bölünme safhası, gastrula safhası, somitogenesis, besin kesesinin damarlanması, yüzgeç gelişim safhası olarak tanımlanmıştır. Yumurtanın bölünme safhası döllenme sonrası 8-10. güne kadar devam etmektedir. 0-10. saatler arasında 2. kutup hücresinin ayrılması ve blastodisk oluşumu, 11-14. saatler arasında da blastodiskin ortasından dikey olarak ilk bölünme gerçekleşmektedir (Şekil 2.3) (Firidin ve diğ., 2012).



Şekil 2.3: Karadeniz alabalığı yumurta bölünme aşamaları (Firidin ve diğ., 2012).

Karadeniz alabalığı embriyolarının döllenmesini takiben 8-10°C su sıcaklığında 48-60.günde larva çıkışı gerçekleşmektedir. Yumurta dölendikten 25-30 gün sonra embriyoda gözler, deride pigmentasyon, omurga, kan dolaşımı, kalp atışı ve vitellüs kesesinden beslenme gözlemlenebilmektedir. Döllenmeyi takip eden 48-60. günlerde embriyo koryon'u yırtarak çıkma eğilimindedir (Bouvet, 1976; Okumuş ve diğ., 2004; Alp ve diğ., 2010).

2.6 SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİNDE ÜREME BİYOTEKNOLOJİSİ UYGULAMALARI

Su ürünleri yetiştiriciliğinde genotiplerin korunması, döl veriminin artırılması ve hastalıklara toleranslı nesillerin eldesi amaçlanmaktadır. Bu amaçlarla, mühendislik ve bilgisayar bilimlerinden yararlanarak genetik ve moleküler tekniklerin birlikte kullanımıyla suda yaşayan canlıların ıslahı, mevcut özelliklerinin değiştirilmesi veya bu canlılara yeni özellikler kazandırılması yönünde yapılan çalışmalar üreme biyoteknolojisi konuları içerisinde yer almaktadır (Beaumont ve Hoare, 2003). Üremenin kontrolü amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar karasal hayvanlarda olduğu gibi balık yetiştiriciliğinde de birçok farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Geniş bir ifade ile gamet oluşumu, bırakılması ve cinsiyetin kontrolü ile ilgili konularla ilgilidir. Bu şekilde gerçekleştirilen kontrol, kalite, miktar ve yıl süresince kullanılabilirliği de içeren döl üretimini kapsamaktadır (Weber ve Lee, 2014)

Akuakültürde kalite ve kantiteyi arttırma çabalarının tümü, ıslah çalışmaları içerisinde ifade edilmektedir. Islah çalışmalarında fenotip olarak ana ve babaların iyi karakterlerini taşıyan, sağlıklı fizyolojik aktivitesi normal, iyi yem alan, sperma ve yumurta kalitesi iyi olan balıklar anaç olarak seçilmektedir. Bu balıkların gametleri ile elde edilecek soylarda kısa sürede porsiyonluk boya ulaşması, türüne özgü morfolojiyi göstermesi ve bu özelliklerinin ticari olarak sağlanabilmesi amacıyla biyoteknolojik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

1959 yılında, H. Swarup, *Gasterosteus aculeatus* balıklarında ilk triploidi çalışmasını gerçekleştirmiştir. 1970'li yıllarda kültür balıkçılığındaki gelişmelere paralel olarak çeşitli salmonid balıkların uzun süreli seleksiyon programları üzerinde çalışmalara başlanmıştır. Rafael Guerrero ve William Shelton'un buldukları tilapya da cinsiyet değiştirme yöntemi, ilerleyen yıllarda daha da geliştirilmiş ve dünya çapında erkek tilapya elde edilmesi sağlanmıştır. 1980'lerin sonu 1990'ların başında ise yalnızca büyüme oranı üzerine değil cinsi olgunlaşmanın et kalitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalarda gerçekleştirilmiştir (Dunham, 2004; Ekici, 2011).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde teknolojiye paralel olarak, üretimi yapılan balık türlerinin et kalitesinin ve döl veriminin arttırılması, hastalıklara toleranslı balıkların elde edilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalar geleneksel yetiştiricilik teknikleri ve biyoteknolojik metotların bir arada kullanılması ile elde edilmektedir (Purdom, 1983; Sheperd ve Bromage, 1990; Bromage ve Roberts, 1995). Bu bağlamda balık yetiştiriciliğinde uygulanan biyoteknolojik yöntemler 5 ana başlık altında ele alınmaktadır (Purdom, 1983; Thorgaard, 1983; Thorgaard, 1995). Bunlar; 1) Hormonal cinsiyet kontrolü (Doğrudan veya dolaylı hormon uygulamaları, kısırlaştırma uygulamaları), 2) Kromozom manipülasyonları (poliploidi, ginogenez ve androgenez) (Deng ve diğ., 1992; Deng ve diğ., 2001), 3) Sperm kriyoprezervasyonu; çeşitli balık türlerine ait genetik materyalin -196°C'deki sıvı azot içerisinde uzun süreli muhafazasına olanak sağlar. Bu uygulama ile üreme mevsimi dışında da döl elde edilmesi yanı sıra nesli tehlike altında olan türlerin genetik materyalinin muhafazası işlemi gerçekleştirilir (Beaumont ve Hoare, 2003; Ekici ve ark., 2012), 4) Gen transferi; rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen gen konstraktı döllenen balık yumurtasının blastodiskine aktararak kromozomal replikasyonda yerini alır ve o hücrenin kalıtım materyalinin bir parçası haline gelir (Purdom ve diğ., 1985; Ekici, 2007). Su ürünlerinde çoğunlukla laboratuvar çalışmalarıyla sınırlı kalan gen transfer çalışmaları; büyüme

performansının artırılması, soğuğa, tuzluluğa ve hastalıklara karşı tolerans gösteren balıkların elde edilmesi konuları üzerinde yoğunlaşmıştır (Jiang, 1993), 5) Germ hücre izolasyonu, kriyoprezervasyonu ve taşıyıcı anaç balık teknolojisi; gamet hücrelerinin oluşumunu sağlayan germ hücrelerinin balıklardan izolasyonu sonrasında (Atmaca, 2017) -196°C’de uzun süreli muhafazası ile farklı türlere transplantasyonu gerçekleştirilmektedir (Yoshizaki ve diğ., 2011).

2.7 HORMONAL CİNSİYET KONTROLÜ

Aynı türe ait erkek ve dişi balıklarda ikincil eşeyssel özelliklerin bir sonucu olarak gelişmede farklılıklar görülür ve bu farklılıklar bazı türlerde çok az iken bazılarında oldukça belirgindir (Yamazaki, 1983; Timur ve Ekici, 2009; Timur, 2011). Ekonomik açıdan değerlendirildiğinde erkek ve dişi balıklar arasındaki bu farklılık cinsiyet kontrolünün öneminin anlaşılmasına yardımcı olur (Özden ve Güllü, 1996). Bu farklılığın sonucu olarak balık büyüklüklerinin aynı olmaması bu balıkların satışında sıkıntı yaşanmasına neden olmaktadır. Kültürü yapılan türlerden biri olan gökkuşağı alabalığında; dişi balık erkek balığa göre daha hızlı büyür, et kalitesi daha iyi olup hastalıklara toleransı yüksektir (Donaldson ve Hunter, 1982; Arslan ve diğ., 2010; 2012). Erkek gökkuşağı alabalığı ise yetiştiricilik koşullarında yaklaşık yumurtadan larva çıkışını takip eden bir yıllık süre sonunda seksüel olgunluğa ulaşır ve büyümenin yanı sıra gonad gelişimi için de enerji harcadığından et verimi düşük olmaktadır. Bu sorunların giderilmesi amacıyla cinsiyet dönüşümü ve tek cinsiyetli stokların üretimi yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Sheperd ve Bromage, 1990). Bu amaçla tek cinsiyetli ve steril popülasyonlar elde edilmesinde; doğrudan hormon uygulaması, dolaylı hormon uygulaması ve kısırlaştırma uygulamaları yapılmaktadır (Purdom, 1983; Sheperd ve Bromage, 1990; Purdom, 1993).

Birçok balık türünde seksüel gelişim genellikle larval safhada meydana gelmekte (Degani, 1985) ve fenotipik cinsiyetin değiştirilebileceği bu dönem balık türlerine göre farklılık göstermektedir. Vitellus kesesini tüketmiş bir larvanın bu dönemde anabolik steroidleri absorbe etmesi durumunda cinsiyet hücrelerinin gelişimi gerçekleşir. Embriyonun genetik yapısına karşılık, bu evrede gerçekleştirilecek müdahalelerle (banyo veya oral yolla östrojen veya androjen verilerek) canlıya ait prematüre gonadların ya ovaryum ya da testis olacak şekilde gelişim göstererek dişi ya da erkek cinsiyetteki canlı elde edilir. Bu nedenle bu dönemde yapılacak bir manipülasyon uygulaması ile cinsiyet kontrolü sağlanır (Degani, 1985; Sheperd ve Bromage, 1990; Lone ve Ridha, 1993; Arslan ve diğ., 2009). Chinook salmonu (*Oncorhynchus tshawytscha*), tilapya (*Oreochromis niloticus*) ve sazan türlerinde Devlin ve

Nagahama (2002) 17α -metiltestosteron kullanarak erkekleştirme çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Dolaylı hormon uygulaması, çaprazlamalar ya da androjenetik/ginogenetik balık üretimi sonucu elde edilen balıklara hormon verilerek gerçekleştirilir ve bu uygulama sonucunda süper erkek veya süper dişi balıklar anaç olarak büyütülüp istenilen cinsiyette balık bir sonraki jenerasyonda elde edilir (Purdom, 1993; Krisfalusi ve Cloud, 1996).

2.8 KISIRLAŞTIRMA

Yetiştiricilikte, normalden daha hızlı büyüyen ve büyüme potansiyeline sahip balıkların üretimi amaçlanmaktadır. Balık erginleştikten sonra büyümenin yanı sıra gonad gelişimi için de enerji harcadığından verimi düşer (Piferrer ve diğ., 1994). Bu sebepten dolayı seksüel olgunlaşma ile ilgili birçok önemli sorun tek cinsiyetli stokların üretimiyle giderilmesine karşın, hem dişi hem de erkekler olgunlaşmadan önce satışa sunulmazsa balık bu dönemde alacağı yemi büyüme için değil de gonad gelişimi için kullanacağından işletmenin zarar etmesine neden olacaktır (Başçınar ve Sonay, 2009). Bu sorunların giderilmesi amacıyla kısırlaştırma yöntemleri uygulanmaktadır. Kimyasal, hormonal, triploidi ve radyasyon gibi farklı yöntemler içerisinde en yaygın olarak kullanılan kısırlaştırma yöntemi bir kromozom manipülasyon metodu olan triploidi uygulamasıdır (Arai, 1987; Jungalwalla, 1991; Sheperd ve Bromage, 1990).

2.9 KROMOZOM MANİPÜLASYONU

Balık hücrelerinin çoğu dişi ve erkek balıklardan gelen 2 kromozom setine sahiptir (Tave, 1986). Gametlerde bu sayı yarıya düşer ve anaç balıklardan gelen setlerden sadece biri döllere geçer. Bu indirgenme işlemi, kromozom manipülasyonlarının anlaşılmasında temel noktadır (Arai, 2001). Normal fertilizasyonda, haploid sperm hücresi yumurtayı döyledikten sonra dişiye ait kromozom setlerinden birisi (ikinci kutup hücresi) ikinci mayotik bölünmenin tamamlanmasıyla dışarıya atılır. Böylece başlangıçtaki embriyonik hücre (zigot) biri erkek diğeri dişi balığa ait iki set kromozom içerir (Manickam, 1991; Johnstone, 1992).

Kromozom düzeyinde mayotik ve mitotik olaylara farklı amaçlar doğrultusunda yapılan çeşitli manipülasyon işlemleri vardır (Chourrout, 1980; Purdom, 1993; Colombo ve diğ., 1995; Rothbard ve diğ., 1999; Galbusera ve diğ., 2000). Bu manipülasyon işlemleri; ginogenez (mayoginogenez ve mitoginogenez), androgenez ve poliploidi (triploidi ve tetraploidi) uygulamaları olarak sınıflandırılmaktadır (Tave, 1986).

Balıkların büyük bir kısmında dış döllenme meydana geldiğinden çeşitli manipülasyon uygulamalarıyla kromozom sayısı kısmen değiştirilebilmektedir (Thorgaard, 1983; Arai, 2001). Kromozom manipülasyonu; gametlerin (sperm veya yumurta hücresi) genomlarının tahrip edilmesi için UV, γ (gama) ışınları ile kimyasal mutajenler kullanılarak gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda elde edilen canlı haploid yapıya sahip olduğundan canlının yaşayabilirliğinin sağlanması için sıcak/soğuk şok, hidrostatik basınç ve çeşitli kimyasallar (Kolşisin, Sitokalsin B ve N_2O gibi) kullanılarak diploid yapı sağlanır (Diter ve diğ., 1993; Manickman, 1991; Purdom, 1993; Teskeredzic ve Donaldson, 1993; Malison ve diğ., 1993; Jungalwalla, 1991).

Bu teknikler içerisinde en yüksek başarı oranı basınç şoku uygulamasında elde edilmesine karşın diğer metotlara göre maliyetinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Malison ve diğ., 1993; Purdom, 1993). Ultraviyole (UV) kullanılarak yapılan şok uygulaması, ucuz ve kullanışlı olması nedeniyle diğer şok uygulamalarına göre daha çok tercih edilmektedir (Refstie, 1983; Goryczko ve diğ., 1991; George ve diğ., 1994; Cherfas ve diğ., 1990; Malison ve diğ., 1993; Rothbard, 1994).

Kromozom manipülasyon teknikleri ve manipülasyon sonucunda elde edilen balığın kromozom yapısı ile seksüel yapısı tablo (2.1)'de gösterilmiştir.

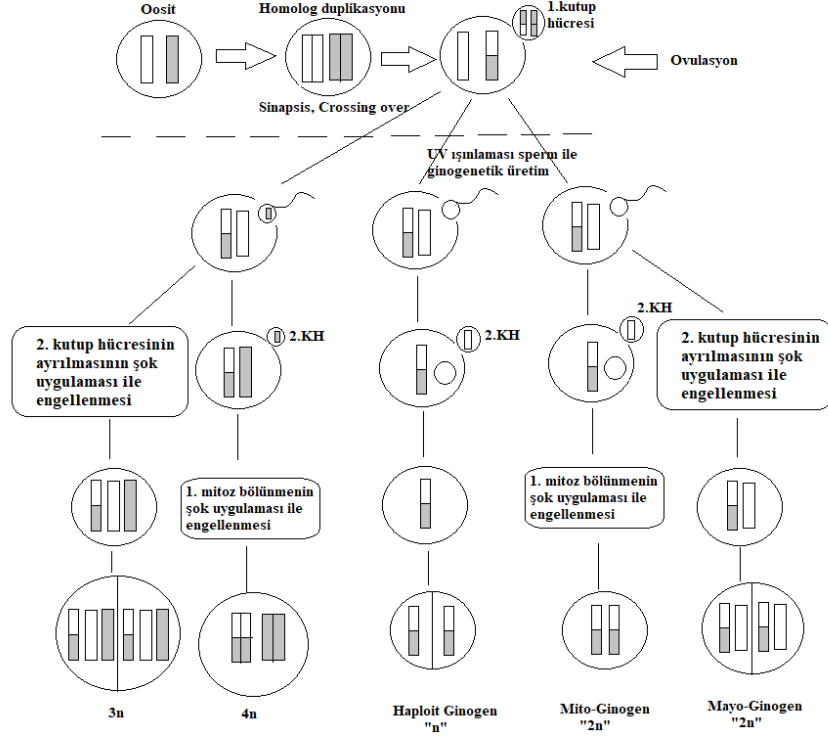
Tablo 2.1: Kromozom manipülasyon uygulaması (Thorgaard, 1995).

<i>Döllenmeden önce ışın uygulaması</i>	Yumurta ve Sperm Hücresi					
	-----		<i>Sperm Hücresi</i>		<i>Yumurta Hücresi</i>	
Şok uygulama amacı	Kutup hücresi	İlk mitotik bölünme	Kutup hücresi	İlk mitotik bölünme	Kutup hücresi	İlk mitotik bölünme
Uygulama sonucu	Triploid	Tetraploit	Heterozigot ginogenetik	Homozigot ginogenetik	Heterozigot androgenetik	Homozigot androgenetik
Seksüel karakteristikler	Kısır erkek (XXY) Kısır dişi (XXX)	Döl verimli erkek (XXYY) ve Döl verimli dişi (XXXX)	Dişi (XX)	Dişi (XX)	Erkek (YY)	Erkek (YY)

2.9.1 Poliploidi Uygulaması

Normal koşullarda bir canlının somatik hücrelerindeki 2 set “2n” kromozom vardır. Bir canlıdaki kromozom setlerinin şok uygulamaları ile 3 veya daha fazla kata yükseltilmesine “poliploidi” adı verilmektedir (Lutz, 2001; Timur ve Ekici, 2009). Döllenmeden hemen sonra uygulanan çevresel şok uygulamaları sonucunda elde edilen triploid balıklar üç kromozom setine (3n) sahiptirler (Şekil 2.4) ve tek sayıda kromozom setlerinin mayozda eşleşmesinin

sıkıntılı olması sebebi ilede kısırdırlar. Triploidi tekniği; ginogenez işlemine benzemekle beraber, bu yöntemde radyasyona maruz bırakılmamış normal spermatozoa yumurtanın döllenmesinde kullanılır (Purdom, 1983; Turan, 2000; Özden ve diğ., 2003).



Şekil 2.4: Poliploidi uygulamasının şematik gösterimi (Arai, 2001).

Birçok balık türünde triploid balıklar diploidlere kıyasla daha iyi yaşama, büyüme ve yem dönüşüm oranına sahiptirler. Fakat bu özellikler seksüel olgunlaşmanın başlangıcına kadar kendini göstermemektedir (Kerby ve Harell, 1990). Triploidi uygulamaları çoğunlukla kısır salmonid türlerin elde edilmesi amacıyla kullanılmakta ve su ürünleri endüstrisi açısından birçok avantaj sağlamaktadır. Bu tür manipülasyonların en önemli yararı, metabolik enerjinin gamet üretimi yerine somatik büyüme için kullanılmasıdır (Bye ve Lincoln, 1986; Oshiro ve diğ., 1991; Teskeredzic ve Donaldson, 1993). Triploid balık üretimi, verimliliği artırma çalışmalarının yanı sıra biyoteknolojik bir araç olarak kullanılabilir (Özden ve diğ., 2003). Örneğin, triploid ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) kısır olması nedeniyle rutin olarak yetiştiricilik yapılan havuzların biyolojik kontrolünde kullanılmaktadırlar (Kerby ve Harell, 1990; Lincoln ve Bye, 1989; Purdom, 1993).

Tetraploidi uygulaması ile 4 kromozom setine ($4n$) sahip balıklar elde edilir. Normal bir yumurta hücresi aktif spermatozoon tarafından döllenildikten sonra ilk mitotik bölünme sırasında şok uygulanması ile $4n$ kromozomlu balıklar (tetraploid) elde edilir (Şekil 2.4) (Özden ve diğ., 2003; Ünlü, 2004). Elde edilen tetraploid balıklar diploid balıklarla çaprazlanarak triploid balıkların üretimi sağlanır (Johnstone, 1991).

Diploid dişilerin tetraploid erkekler tarafından döllenme oranı normal erkek balıklara kıyasla daha düşüktür. Bu durumun spermatozoon başının çapıyla ilgili olduğu ifade edilmektedir. Bu bağlamda triploid balık üretiminde, tetraploid dişilerin diploid erkekler tarafından döllenmesi ile döllenme başarısının artırıldığı ifade edilmektedir. Bununla birlikte, tetraploid balık üretimi kolay olmamasına rağmen gökkuşağı alabalıklarında başarılı tetraploid balık eldesi çalışmaları yapılmıştır (Johnstone, 1991).

2.9.2 Androgenez Uygulaması

Androgenez; gama (γ), X veya ultraviyole (UV) ışınları kullanılarak DNA inaktivasyonu gerçekleştirilen yumurta hücresinin normal sperm hücresi ile döllenmesi ve embriyo gelişiminin spermatozoaya ait kromozom setinden devam etmesi olayıdır (Purdom, 1993). Androgenetik zigota ilk mitotik bölünme safhasında şok uygulaması (basınç, kimyasal ve sıcaklık) yapılarak hücre bölünmesi engellenir. Böylece elde edilen androgen birey, sadece erkek balıktan gelen diploid kromozom setine sahip olur (Bhise ve Khan, 2002) (Şekil 2.4).

Androgenez uygulaması; gökkuşağı alabalığı, ot sazanı, sazan, dere alabalığı, Nil tilapyası ve beyaz Mersin (*Acipenser transmontanus*) türlerinde başarıyla gerçekleştirilmiştir (Rothbard ve diğ., 1999; Karayücel ve diğ., 2002). Mitoz sırasında kendini eşleyen kromozomlar tek bir kromozom takımından geldiğinden, androgenetik bireyler %100 homozigottur. Bu sebeple, androgenetik balıklarda ölüm oranı yüksektir, çünkü herhangi bir mutant çekinik allel mevcut ise bu uygulama sonucunda açığa çıkmaktadır (Purdom, 1993).

2.9.3 Ginogenez Uygulaması

Kromozom manipölasyon tekniklerinden biri olan ginogenez uygulaması, erkek balığa ait genetik materyalin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla mutajenlerle muamele edilen spermatozoanın normal yumurta hücrelerini döllemesi olarak ifade edilir (Thorgaard, 1983; Purdom, 1993; Jiang, 1993). Yani yumurtalar biyolojik olarak aktif; ancak genetik açıdan

etkisiz olan spermatozoa tarafından döllenirler (Dunham, 2004; Ekici, 2011). Söz konusu bu spermatozoon yumurta hücrelerini dölediğinde hücre içi mekanizma harekete geçerek ikinci kutup hücresi atılır. Bu kritik noktada sıcak, soğuk ya da basınç gibi fizyolojik şok uygulamalarından biri kullanılarak ikinci polar cismin çıkışı engellenir ve embriyonun diploidi durumu tekrar sağlanır. Uygulanan bu şoklar, mikrotübülleri tahrip ederek hücre bölünmesini engeller (Galbusera ve diğ., 2000).

İlk kez 1911 yılında Hertwig ve 1983 yılında Thorgaard, kurbağa spermatozoasını radyum-gama ışınlarına maruz bırakarak ginogenetik embriyolar elde etmişlerdir (Karayücel, 1999). Omurgalılarda spontane gelişen ginogenez ise sürüngen, kurbağa ve teleost balıklarda da tespit edilmiştir (Komen ve Thorgaard, 2007).

Ginogenez uygulaması ile akraba hatların ve tek cinsiyetli popülasyonların üretimi gerçekleştirilir. Yüksek derecede akraba olan balıkların üretiminde kullanılabildiğinden, teleost balıklarda akrabalı yetiştirme çalışmalarında tercih edilen bir metottur (Galbusera ve diğ., 2000; Turan, 2000). Sperm hücresinin kalıtım materyali mutajenlerle etkisiz hale getirildiğinden farklı balık türlerinden elde edilen sperm hücreleri de yumurtaların döllenmesinde kullanılabilmektedir (Purdom, 1983). Bu sebeple çalışmalarda, ginogenez uygulamasının başarılı olup olmadığının anlaşılması amacıyla farklı bir türe ya da varyeteye ait balığın spermatozoaları kullanılmaktadır. Farklı bir türe ait spermatozoa ile dölenen yumurtadan gelişen bireylerin vücut veya yüzgeç şekli gibi morfolojik özelliklerine dayanarak da değerlendirme yapılmaktadır (Paschos ve diğ., 2001).

Ginogenez metodu ile sadece dişi balığa ait kalıtım materyalini taşıyan nesillerin elde edilmesi amaçlanmaktadır (Thorgaard, 1983). Bu amaçla γ , X veya UV ışınları kullanılarak DNA inaktivasyonu gerçekleştirilmiş spermatozoa yumurta hücresinin döllenmesinde kullanılır (Opperman, 1953; Purdom, 1993). Spermatozoaya ait kalıtım materyalinin tahrip edilmesinde kullanılan iyonize ışınlar (X ışınları ve ^{60}Co gama ışınları), güçlü geçirgenlikleri sayesinde yoğun miktarda spermaya uygulanabilirler. Ancak bu çalışmalarda erkek balığa ait özelliklerin veya kromozom parçalarının varlığının tespit edilmesi ile bu ışınların spermatozoa DNA'sını inaktive etmek için yeterince etkili olmadığı gösterilmiştir (Karayücel, 1999).

Düşük dozda uygulanan gama ışınları spermatozoa genomunu tamamen inaktive etmediğinden, düşük yaşama oranının elde edildiği yüksek doz uygulandığında ise spermatozoa genomunun

tamamen inaktive edilmesi nedeniyle yaşama oranının arttığı tespit edilmiştir. Bu doza bağlı etkiye “Hertwig Etkisi” adı verilmektedir (Karayücel ve Karayücel, 2000; Dahm ve diğ., 2005). UV ışınları, gama ışınlarına göre daha etkili olup daha fazla avantaja sahiptir. Eğer gama radyasyonu uygulamasında kullanılan doz çok düşük olursa kromozom fragmentleri gözlemlenebilir. Bu kromozom fragmentleri konak genomunda hücre bölünmeleri ile bağımsız olarak kopyalanarak çoğalır ve embriyoda ifade deilebilir (Dunham, 2004). Gama ışınları, UV ışınlarından çok daha fazla geçirgendir ve UV ışınları düşük geçirgenlikleri nedeniyle ancak sperma seyreltildiğinde ve ince bir tabaka halinde yayıldığında etkili olur (Dunham, 2004). UV ışınları; ucuz, kullanımının kolay olması ve diğer metotlara göre daha güvenilir olması sebebiyle son yıllarda daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca UV ışınları, gama ışınlarının tersine kromozom parçaları bırakmamaktadır. Çünkü UV uygulamasına maruz bırakılmış spermatozoa fertilize edilen yumurtalardan gelişen haploid embriyoların erkek balığa ait genetik materyal taşımadığı bildirilmiştir (Plegri ve Schulte-Merker, 1999).

Kimyasal mutajenler; örneğin dimetilsülfat (DMS), tolüdin mavisi ve etilen üre çok miktarda spermatozoaya ait DNA’nın tahrip edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Fakat bu maddelerin kullanımı sonucunda kromozom parçalarının görüldüğü tespit edilmiştir (Karayücel ve Karayücel, 2000; Dunham, 2004; Komen ve Thorgaard, 2007).

2.9.3.1 Mayoginogenez ve Mitoginogenez Yöntemleri

Ginogen balıkların üretiminde, mayoginogenez ve mitoginogenez olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemlerle; genetik harita oluşturma, soy içi nesiller ve isogenetik üretim, seksüel organların gelişimi ve yapısal farklılıkların incelenmesi çalışmalarında kullanılacak balıkların üretimi gerçekleştirilir (Thorgaard, 1983; Cherfas ve diğ., 1993).

Döllenmeyi takiben aktive olan yumurtada 2. mayoz bölünmenin tamamlanıp, polar cismin ayrılması engellenerek “mayotik ginogenetik” balık elde edilir (Şekil 2.4) (Purdom, 1993; Lutz, 2001; Özdemir ve Ekici, 2017).

Gadus morhua ve *Acipenser transmontanus* gibi balık türlerinde yapılan mayoginogenez uygulamalarında, juvenil safhaya kadar ölüm oranı çok düşükken bu safhadan sonra ölüm oranında artış gözlenmiştir (Van Eenennaam ve diğ., 1995; Ottera ve diğ., 2011). Diploid durumu sağlamak için şok uygulaması ile ikinci kutup hücresinin yumurtadan çıkışı engellenir

ve ovum farklı gen kombinasyonlarına sahip rekombine kromozom setleri taşıdığından mayotik ginogenler tamamen homozigot değildir (Dunham, 2004).

Mayoz bölünme bitiminden hemen sonra başlayan mitoz bölünme aşamasında gerçekleştirilen şok (hidrostatik basınç veya sıcaklık) uygulamasıyla bölünme engellendiğinde “mitotik ginogen” balık elde edilir (Şekil 2.4) (Lutz, 2001; Devlin ve Nagahama, 2002).

Mitoginogenez; genom duplikasyonundan sonra ilk mitotik bölünmenin engellenmesiyle gerçekleştirildiğinden sadece homozigot nesiller elde edilir. Bu metod kullanılarak 2 nesil sonrasında tamamıyla homozigot bireyler elde edilebilmektedir (Cherfas ve diğ., 1993).

Mitoginogenez uygulamasında şokun başlangıç zamanı, yoğunluğu ve süresi önemlidir. Şokun başlangıç zamanı en önemli parametrelerden biri olup üretimde önemli değişikliklere neden olabilir. Üretim kaynaklı sorunlar ve mitoginogenez uygulamasındaki engeller nedeniyle yavru balık eldesinde düşük verim ve yaşama oranı gözlemlenir (Komen, 2007). Bu düşük verim ve yaşama oranının; şok uygulaması nedeniyle meydana gelen fiziksel zarar, zararlı genlerin homozigot halde bulunması, düşük yumurta kalitesi ve senkronize olmayan embriyo gelişimi kaynaklı olduğu ifade edilmektedir (Komen ve Thorgaard, 2007).

2.10 SU ÜRÜNLERİ ALANINDA GİNOGENEZ UYGULAMASININ ÖNEMİ VE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Ginogenez uygulaması, su ürünleri yetiştiriciliğinde ve araştırma amacıyla gerçekleştirilen deneysel (inbreeding) çalışmalarda kullanılmaktadır (Varadaraj, 1990; Komen ve Thorgaard, 2007). İlk başlarda genler arasında az miktarda/seyrekleşmesi beklenen parça değişimi olayının aslında bazı genlerde fazla miktarlarda olduğu bildirilmektedir (Purdom, 1993). Buna rağmen mayotik ginogenez uygulaması, gen-sentromer rekombinasyon oranı bulunarak kromozom haritalanmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan birinci jenerasyon mitotik ginogen ve androgenler tüm gen lokuslarında homozigottur ve ikinci jenerasyonda klonların üretilmesinde kullanılırlar (Purdom, 1993).

Gerek ginogenez gerekse androgeniz teknikleri ile canlılardaki karakterlerin genetiksel analizleri kolaylıkla yapılabilir. Ginogenetik dişilerin hormon kullanılarak erkekleştirilmesi ve normal dişilerle çaprazlanması ile sadece dişi balık üretiminin devamlılığı nesiller boyu sağlanabilir. Diğer taraftan erkek heterogametik cinsiyet belirleme sistemine sahip balıklarda

androgenez ile %50 YY erkekler ve %50 XX dişiler üretmek mümkündür. Bu şekilde elde edilen YY erkeklerin normal dişilerle çaprazlanması ile sadece erkek balık üretimi gerçekleştirilir (Purdom, 1993; Dahm ve diğ., 2005; Komen ve Thorgaard, 2007). Kemikli balıklarda ginogez olayının spontane olarak görüldüğü bazı durumlar tespit edilmiştir. Ancak su ürünlerinde yapılan çalışmalar çoğunlukla laboratuvar araştırmalarıyla sınırlı kalmıştır. Özellikle hobi amaçlı üretimi yapılan bazı balık türlerinde, renklerin ve renklenme desenlerinin döllere aktarımının tespit edilmesi amacıyla ginogenetik çalışmalar yapılmaktadır (Lutz, 2001).

Diploid ginogen balıkların %30'unda anormal ovaryum gelişiminin söz konusu olduğu bildirilmektedir. Bu duruma spermatozoa genomunun tahrip edilmesi sürecinde meydana gelen ekstra kromozom fragmentlerinin neden olduğu düşünülmektedir (Krisfalusi ve diğ., 2000).

Ovaryum gelişimlerinin izlenmesi, genetik mühendisliği ile gen lokuslarının ve genlerin etkilerinin belirlenmesi, yemden yararlanma ve et verimi ile cinsiyet oranının belirlenmesi ve seksüel gelişimin kontrolünün sağlanması üzerine araştırma yapılması amacıyla ginogenez ve androgenez metotları yetiştiriciliği yapılan balık türleri üzerinde uygulanmaktadır (Dunham, 2004; Overturf, 2009).

Ülkemiz içsu balık yetiştiriciliğinde ilk sırada olan gökkuşağı alabalığı üzerinde biyoteknolojik uygulamalardan olan ginogenez uygulaması birçok farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sayede gökkuşağı alabalıklarının yetiştiriciliği ile ilgili karşılaşılan problemlerin çözümü sağlanmaya çalışılmıştır. Büyüme hızı, gamet kalitesi, tek eşeyli popülasyon üretimi, hastalıklara karşı direnç kazandırma, yemin ete dönüşüm etkinliği ve etin kalitesinin yükseltilebilmesine olanak sağlayan çalışmalara ginogenez uygulaması temel oluşturmaktadır (Lutz, 2001; Komen ve Thorgaard, 2007).

Ülkemizde gökkuşağı alabalığının yanı sıra sularımızda doğal olarak bulunan türlerden biri olan Karadeniz alabalığı yetiştiriciliği yapılan alternatif balık türü olarak son yıllarda önem kazanmıştır. Yetiştirme denemeleri; doğal ortamdan avlanarak çiftlik ortamına adaptasyonunun sağlanması, optimum yetiştirme koşullarının belirlenmesi ve triploid üretim çalışmalarıyla devam etmektedir.

Farklı türler üzerinde gerçekleştirilen ginogenez çalışmaları, spermatozoanın radyasyona maruz bırakılma süresi, yoğunluğu ve fiziksel şokun zamanı gibi parametrelere ait optimum şartların belirlenmesi amacının yanı sıra tamamen yada kısmen soy içi gelişimi ve tek cinsiyetli

popölasyonların üretimi amacıyla da su ürünlerinde kullanılmaktadır (Varadaraj, 1990; Lutz, 2001).

Bu amaçla; ginogenetik balık üretimiyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda akuakültür sektöründe ki gereksinimlere bağılı olarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kontrollü deneme ortamının kolay oluşturulabilmesi; balıkların akvaryum, tank, beton ya da toprak havuzlarda kolay ulaşılabilir halde stoklanabilmesi, takibinin daha kolay olması veya doğadan üreme döneminde anaç yakalayarak temin edilebilme kolaylığı olan balık türlerinde ilk ginogenetik balık üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salmonid grubu balıklarda; Gökkuşaağı alabalığı (Onozato, 1984; Purdom ve diğ., 1985; Quillet ve diğ., 1988), *Oncorhynchus masou*, *Oncorhynchus keta*, *Salmo trutta caspius* (Kalbassi ve diğ., 2009), kahverengi alabalık (Chourrout ve Quillet, 1982) (Arai ve Wilkins, 1987), dere alabalığı (Dube ve diğ., 1991), Nil tilapyası (Karayücel, 1999), yaldızlı pisi ve pisi balığı (*Pleuronectes platessa- Platichthys flesus*, Purdom, 1968), zebra balığı (*Danio rerio*, Streisinger ve diğ., 1981; Özdemir ve Ekici, 2017), sazan (Nagy, 1978) türleri yapılan çalışmalarda en çok tercih edilen türlerdir. Johnson ve Wright (1986) kahverengi alabalık ve Atlantik somonu hibridlerinden ginogen ve triploid bireyler elde etmiş ve gen sentromer yapısı arasındaki ilişkiyi moleküler belirteç kullanarak ve elektroforetik bantlama yöntemiyle ortaya koymuştur. Johnson ve Wright (1987), Allendorf ve diğ. (1986), Seeb ve Seeb (1986) salmonid türlerinden elde ettikleri diploid ginogen bireylerde gen-sentromer haritalama çalışması gerçekleştirmişlerdir. Purdom ve diğ. (1985) gökkuşaağı alabalığında ginogenetik üretim sonrası yaşama oranı ve elektroforetik enzim lokuslarının incelemesini gerçekleştirmişlerdir. Millot ve diğ.'nin 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada, izogenik balık hatlarında meydana gelebilecek genetik farklılaşmaların tespiti yapılmıştır. Bu çalışmada ikinci jenerasyon ginogenetik gökkuşaağı alabalıkları kullanılarak genlerdeki farklılaşmalar tespit edilmiştir. Oral (2017) deniz levreği'nde (*Dicentrarchus labrax*) yaptığı bir sekanslama çalışması için gerekli izogenik hatları mitoginogenez yöntemi ile üretmiştir.

Yapılan çalışmalarda araştırmacılar ginogenetik üretim için ilk basamak olan spermatozoa hücresinin genetik materyalinin tahrip edilmesi yanı sıra, dölleme yeteneğini kaybetmemesi amacıyla optimizasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu aşamada araştırmacılar Co⁶⁰, γ ve UV ışınlarını kullanarak spermatozoaya ait DNA materyalini tahrip etmeye çalışmışlardır. Fakat bu çalışma sonuçlarına bakıldığında en uygun maliyette olan ve en kolay uygulanabilen ışınlama yönteminin UV ışınlanması olduğu, ayrıca diğ er ışınların spermatozoanın hücresel

yapısını bozarak dölleme yeteneğinde düşüşe sebep olduğu ortaya konulmuştur (Purdom, 1963; Chourrout, 1984; Quillet ve Diter, 1988; Colihueque ve diğ., 1996; Kaastrup ve Horlyck, 1987).

Ginogenetik üretim aşamalarının ikincisi olan diploid yapının sağlanması amacıyla hidrostatik basınç, sıcak ve soğuk şok, döllelenmiş yumurtalara türe özgü olarak belirlenen zamanlarda uygulanmıştır. Şok uygulamalarından biri olan hidrostatik basınç şoku uygulanabilirliği diğer şok türlerine göre zor ve maliyetli olmasından dolayı diğer şok uygulamalarına göre daha az tercih edilmektedir. Sıcak ve soğuk şok uygulamaları ise balık türlerinin yaşadıkları su sıcaklıklarına bağlı olarak daha yaygın olarak tercih edilen metotlardır (Refstie ve diğ., 1982; Chourrout, 1984; Onozato, 1984; Tabata, 1991; Peruzzi ve diğ., 2007). Şok uygulamasının zamanlaması ise üretilmek istenen balığın mitoginogen ya da mayoginogen olmasına göre ayarlanmıştır. Bir çok araştırmacı çalışmalarında (Diter ve diğ., 1993; Palti ve diğ., 1997; Krisfalusi ve diğ., 2000; Strunjak ve diğ., 2003; Penman ve Piferrer, 2008; Bencsik ve diğ., 2011) mayo ve mito ginogen balık eldesi için optimum şok derecesi ve zamanın tespiti için denemeler gerçekleştirilmiştir.

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, ginogen balıkların tespitinde farklı tanı metotları kullanılmıştır. İlk yapılan çalışmalarda, kontrol grubu ile ginogen gruplar yaşam oranları üzerinden değerlendirilerek üretim başarısı tespit edilmeye çalışılmıştır. Haploid ginogen grupların yaşamaması bu şekilde bir değerlendirmenin hatalı sonuçlar doğurmasına sebep olacağından, daha sonra yapılan çalışmalarda karyotip analizi, NOR boyama, eritrosit çap ölçümü, akım sitometrisi ve moleküler hızlı cinsiyet tespiti gibi değerlendirme yöntemleri kullanılmaya başlamıştır. Bu tekniklerin yanı sıra doğal genetik belirteç olan albinoluk özelliği ya da heterolog (farklı türe ait) spermatozoa kullanılarak ginogenetik üretim çalışmalarının başarısı kanıtlanmaya çalışılmaktadır. Zheng ve diğ. (2017) UV ışınlaması yapılmış küt burun sazan (*Megalobrama amblycephala*) sperması kullanarak mayotik ginogenetik ot sazanı üretim performansını değerlendirmiş ve ploidi seviyesinin tespiti çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca ginogen ve ploidi seviyesinin tespiti amacıyla DNA içeriği akım sitometri yöntemiyle incelenmiş, karyotip analizi yapılmış, büyüme verileri incelenmiş ve türe özgü gen primerleri belirlenerek analizleri yapılmıştır. Chen ve diğ. (2017) *Nibeal albiflora* balığında ginogenetik üretim yapmak için doğadan yakalanan herhangi bir balığın heterolog spermini kullanmışlardır. Piferrer ve diğ.'nin (2000), kalkan balığında döllemeden sonra soğuk şok uygulaması yaptığı çalışmada, NOR boyaması yapılarak diploid ve triploid oranını belirlenmiştir. Sola ve diğ.

(1993) iki ekonomik levrek türü (*D. labrax* ve *D. punctatus*) ile gerçekleştirdikleri ginogenetik üretim çalışmasında, farklı boyama teknikleri ile karyotip analizi yapmışlardır. Metafaz safhasındaki kromozomları elde etmek için dalak, solungaç ve böbreklerden örnekler almış ve örnekleri farklı boyama teknikleri ile tespit etmişlerdir. Onozato'nun 1984 yılında yapmış olduğu çalışmada, diploid ginogen balık eldesi sağlanmış ve uygulamanın kontrolü albino alabalık kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kaastrup ve Horlyck (1987) çalışmalarında, dişi albino gökkuşağı alabalığını belirteç olarak kullanmış ve ginogenetik balık üretimi için en uygun yöntemi araştırmış, sperm sulandırma oranı, UV ışınlaması ile şok derecesi ve zamanının optimizasyonunu gerçekleştirmiştir.

Tablo 2.2: Farklı balık türlerinde ploidi uygulamaları.

Türler	Ş.T.	Ş.Y./Sıc.	D.T.U.Z.	U.S.	P.Y.(%)	Ref.
BALIKLAR						
Triploidi						
Kahverengi alabalık (<i>Salmo trutta</i>)	Hidrs.	10000 psi	450 dk	3 dk	100	Jagiełło ve diğ. (2017)
Atlantik somonu (<i>Salmo salar</i>)	Sıcak	28°C	50 dk	10 dk		Refstie (1984)
	Sıcak	30°C	50 dk	5 dk		Refstie (1984)
	Sıcak	32°C	20 dk	5 dk	95	Sutterlin ve diğ. (1987)
Gümüş sombalığı (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Sıcak	28-30°C	10 dk	10 dk	58-84	Utter ve diğ. (1983)
Kral sombalığı (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	Sıcak	28-30°C	10 dk	10 dk	58-84	Utter ve diğ. (1983)
Pembe somon (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	Sıcak	28-30°C	10 dk	10 dk	58-84	Utter ve diğ. (1983)

Ş.T.: Şok tekniği, Ş.Y.: Şok yoğunluğu, D.T.U.Z.: Döllenmeyi takiben uygulama zamanı, U.S.: Uygulama süresi, P.Y.: Poliploidi yüzdesi

Tablo 2.2 (devam): Farklı balık türlerinde ploidi uygulamaları.

Gökkuşağı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Sıcak	26°C	1 dk	10 dk	100	Solar ve diğ. (1984)
	Hidrs.	7000 psi	40 dk	10 dk	80-90	Lou ve Purdom (1984)
Ginogen	Hidrs.	7000 psi	40 dk	4 dk	100	Chourrout (1984)
Ginogen	Sıcak	26°C	95-508 °C-dk.	20 dk		Palti ve diğ. (1997)
	Hidrs.	9000 psi	273-693°C-dk.	3 dk		Palti ve diğ. (1997)
	nitro-oksit/B asınc	11 atm	0 dk	30 dk	90	Shelton ve diğ. (1986)
Kaynak alabalığı (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Sıcak	28°C	10 dk	10 dk	98-100	Galbreath ve Samples (2000)
Sarı kuyruk pisi balığı (<i>Pleuronectes ferrugineus</i>)	Hidrs.	7000 psi	5 dk	10 dk	93-100	Manning ve Crim (2000)
Adi sazan (<i>Cyprinus carpio</i>)	Soğuk				91,7	Ueno (1984)
	Soğuk	0-2°C				Cherfas ve diğ. (1990)
	Sıcak	40°C				Hollebecq ve diğ. (1988)
	Hidrs.	5,6x10 ³ kPa				McCarter (1988)
Ot sazani (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	Hidrs.	7000-8000 psi	4 dk	1-2 dk	98	Cassani ve Caton (1986a)
	Sıcak	42°C	4 dk	1 dk	67 (0-100)	Cassani ve Caton (1986a)
Atlantik morina (<i>Gadus morhua</i>)	Sıcak- Soğuk	0°C-16- 18°C	20-120 dk	20- 40 dk	10-20	Peruzzi ve diğ. (2007)

Tablo 2.2 (devam): Farklı balık türlerinde ploidi uygulamaları.

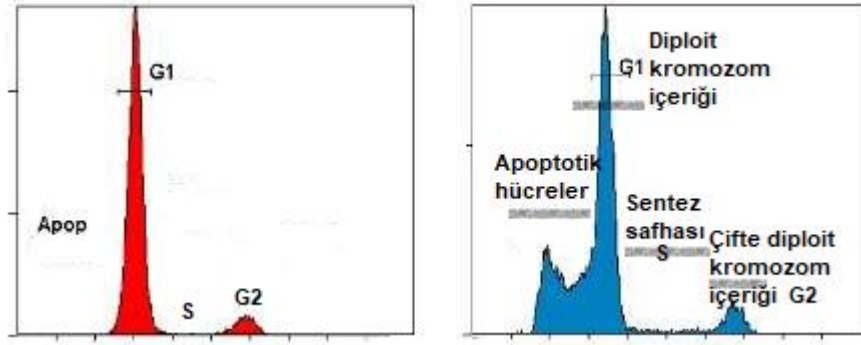
Pisi balığı (<i>Paralichthys olivaceus</i>) ginogen	Soğuk	0°C	3 dk	45 dk		Tabata (1991)
Kırmızı çipura (mercan) (<i>Pagrus major</i>) ginogen	Sıcak	35°C	3 dk	2,5 dk	100	Sugama ve diğ. (1990)
Çipura (<i>Sparus aurata</i>) ginogen	Sıcak	36,5-37,3°C	3 dk	2,5 dk	90-100	Gorshkov ve diğ. (1998)
Avrupa levreği (<i>Dicentrarchus labrax</i>) ginogen	Sıcak	29°C	15 dk	25 dk	90-100	Carrillo ve diğ. (1993)
	Hidsr.	8000 psi	5 dk	2-3 dk	>80	Zanuy ve diğ. (1994)
	Soğuk	0-2°C	5 dk	20 dk	83-100	Colombo ve diğ. (1995)
	Soğuk	0°C	5 dk	10 dk	>95	Felip ve diğ. (1999a)
	Soğuk	0-1°C	5 dk	15-20 dk	100	Peruzzi ve Chatain (2000)
	Hidsr.	8500 psi	6 dk	2 dk	100	Peruzzi ve Chatain (2000)
Beyaz levrek (<i>Morone chrysops</i>) ginogen	Sıcak	36°C	3 dk	2 dk	100	Gomelsky ve diğ. (1998)
Dil balığı (<i>Solea solea</i>) ginogen	Hidsr.	630 kg/cm ²	10-40 dk	10 dk	0	Howell, Baynes ve Thompson (1995)
	Soğuk	2°C	5-10 dk	1-2 saat	80	Howell, Baynes ve Thompson (1995)
Kalkan (<i>Scophthalmus maximus</i>) ginogen	Soğuk	0°C	5 dk	20 dk	100	Piferrer ve diğ. (2000)

2.11 POLİPLOİDİ VE GİNOGEN TANI METOTLARI

Balıklarda uygulanan kromozom set manipülasyonu teknikleri çalışmalarında yapılan uygulamaların sonuçlarının doğruluğunun tespiti önemlidir. Bu sebeple, elde edilen embriyo ve balıklarda kontrol gruplarıyla karşılaştırma ve kıyaslama yapılır. Bu yöntemler; embriyolojik gelişim safhalarının karşılaştırılması, morfolojik farklılıkların karşılaştırılması, akım sitometrisi ile DNA miktarının karşılaştırılması, moleküler belirteçler yardımıyla tespit, eritrosit çap ölçüm karşılaştırması ve karyotip analizi olarak sıralanabilir.

2.11.1 Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi (AS), hücrelerin veya partiküllerin belli bir hızda, sıvı bir sistem içerisinde, bir ışık kaynağının önünden tek tek geçerken tespit edilmek istenen özelliklere göre tanımlandığı bir sistemdir (Shapiro, 2003; Özdemir ve Artaç, 2013). AS her bir hücrenin birçok fiziksel ve kimyasal karakteristiğinin anlık olarak ölçülüp daha sonra da analiz edilebildiği bir uygulamadır. Ölçülebilen özellikleri; hücrelerin ya da partiküllerin büyüklükleri, granül varlığı ya da hücre içi kompleksi ve floresan yoğunluğudur. Hücrelerin sayımı ve analizinde mikroskopik yöntemlere göre tek hücre seviyesinde, daha hızlı ve doğru sonuçlar elde edilmesi, karışık popülasyonlar içerisinde her bir hücrenin ayrı ayrı özelliklerinin tespitine ve analizine imkan sağlamasından dolayı geleneksel yöntemlerin alternatifi olmuştur (Manti ve diğ., 2015).



Şekil 2.5: Akım sitometrisi ile hücre döngüsünün incelenmesi (Walczak ve Haas, 2008).

AS farklı konularda çalışan bilim adamları tarafından kullanılma özelliğine sahip bir sistemdir. İmmunologlar, ekologlar, araştırmacı veya klinik laboratuvarında çalışanlar, birçok farklı uygulama için kullanabilir (Chaiton ve Allen, 1985; Demers ve diğ., 1989; Yazıcı ve Yardımcı,

2016). Günümüzde ise su ürünleri yetiştiriciliğinde (Morgan ve diğ., 1993), immünoloji çalışmalarında (Scharsack ve diğ., 2001), antibiyotik duyarlılık çalışmalarında (Chilmonczyk ve Monge, 1999), ilaç, immuno-stimulant ve aşı etkinliğini ölçmede (Wang ve diğ., 2010), spermatogonial hücrelerin ayırımında (Yoshizaki ve diğ., 2011), ploidi seviyelerinin tespiti ve tek cinsiyetli balık üretimi çalışmalarında rutin olarak kullanılan bir yöntem olmuştur (Yentsch ve diğ., 1983).

AS su ürünleri alanında ilk olarak 1980'li yıllarda hem balıklarda hem diğer su ürünlerinde poliploidi çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Thorgaard, 1982; Yentsch ve diğ., 1983; Allen, 1983; Lecommandeur ve diğ., 1994). Kırmızı kan hücresinin DNA içeriğinin AS ile analiz edilerek tanımlanabileceği gökkuşağı alabalığı, sazan, Nil tilapyası ve diğer birçok balık türü üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Thorgaard, 1982; Allen, 1983; Burns ve diğ., 1986; Don ve Avtalion, 1988a-b; Aldridge ve diğ., 1990; Taylor, 2009). Diploid bir hücredeki DNA miktarı FL-2 PE antikoruna ile işaretlendiğinde $2n$ olarak tanımlanır (Şekil 2.5). Bu durumda test edilen hücredeki DNA'nın normal hücrelerdeki DNA miktarlarına oranlanması ile elde edilen değer DNA indeksi o hücrenin DNA içeriğini yansıtmaktadır. Normalde DNA indeksinin $1 \pm 10\%$ olması beklenir; bundan farklı değerler bulunduğu anaploididen söz edilir. DNA indeksinin >1 olması hiperploidi, <1 olması hipoploidi olarak tanımlanır (Tabl 2.3).

Poliploid balıkların diploid balıklardan morfolojik olarak ayrımı yapılamamaktadır (Pandian ve Koteeswaran, 1998). Bu sebeple ploidi seviyesinin belirlenmesi için farklı metotlar kullanılmıştır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Poliploidi tanı metotları.

Metot	Açıklamalar	Referans
Akım Sitometrisi	DNA miktar ölçümü	Allen, 1983
	Taze ya da formalin ile fikse edilmiş dokulardan ploidi tayini	Burns ve diğ., 1986
Karyotip Analizi	Yaygın olarak kullanılan metot;	Varadaj ve Pandian, 1988
	Kesin sonuç için işaretleyici kromozom kullanımı	Baksi ve Means, 1988
Hücre Hacmi: Coulter Sayacı	Hücre hacim ölçümü	Johnson ve diğ., 1984 Wattendorf, 1986

Tablo 2.3 (devam): Poliploidi tanı metotları.

Hücre Boyutu-Eritrosit	Kırmızı kan hücresi ile çekirdeğinin boy ve en ölçümü ile hücre boyutu hesaplaması	Benfey ve diğ., 1984 Johnstone ve Lincoln, 1986 Kavumpurath ve Pandian, 1990
Nükleoli Sayımı	Düşük doğruluk payına sahip, daha düşük kullanım sayısına sahip; Hücredeki NOR (çekirdek organize bölgeleri) bölgelerinin sayımı	Varadaj ve Pandian, 1989a Phillips ve diğ., 1986 Phillips ve diğ., 1989 Fiajshans ve diğ., 1992
Enzim	Uzun süre alan metottur. İzozim ve allozimden ploidi seviyesinin belirlenmesi	Chevassus ve diğ., 1983 Crozier ve Moffett, 1989 Arai, 1984; 1986
Dna Parmak İzi	Aşırı hassas olunması gereken fakat kesin sonuç veren metottur.	Han ve diğ., 1992 Volckaert ve diğ., 1994
Transplantasyon	Aynı türün farklı morfolojik özelliklere sahip olan soyları kullanılarak yapılır.	Dawley ve diğ., 1987 Komen ve diğ., 1990b Taniguchi ve diğ., 1994

2.11.2 DNA Parmak İzi Analizi

Multilokus DNA parmak izi yöntemi genetik tanı çalışmalarında kullanılan çok güçlü bir metottur. Bu yöntem insanlarda annelik ve babalık testlerinde, adli analizlerde, popülasyonlar arası genetik benzerlik çalışmalarında başarıyla uygulanmıştır (Jeffrey ve diğ., 1986; Burke ve Bruford, 1987; Burke ve diğ., 1989, 1991; Welsh ve McClelland, 1990; Bar ve Hummel, 1991). DNA parmak izi akuakültür alanında bireylerin ayrımında, soy ağacının belirlenmesinde, popülasyon analizinde, özellikle küçük balıklar için işaretleyici kullanmadan ebeveyn belirlemede kullanılmaktadır (Hallerman ve Beckman, 1988; Doyle ve Talbot, 1986; Eknath ve Doyle, 1990). DNA parmak izi kullanımındaki diğer bir avantaj ise mayotik veya mitotik ginogenetik balıklarda ebeveynlerden gelen genomların tespitine ve bireylerin homozigotluk oranının belirlenmesine olanak sağlamasıdır (Chourrout, 1986). DNA parmak izi yöntemi

balıklarda ginogenetik ve androgenetik üretim başarısının belirlenmesinde kullanılmıştır (Carter ve diğ., 1991; Han ve diğ., 1992; Takagi ve diğ., 1995; Eenennaam ve diğ., 1996; Nagoya ve diğ., 1996; Young ve diğ., 1996; Karayücel, 1999).

2.11.3 Morfolojik Tespit

Ginogenez uygulamasının tespiti amacıyla kullanılan yöntemlerden biri de morfolojik tespit yöntemidir. Haploid ve diploid kromozom setine sahip balıkların embriyo gelişim aşamaları ve vücutlarında meydana gelen deformasyonların gözlenmesi ile ginogenetik balık üretim metodunun başarısı değerlendirilebilir. Balık türlerine bağlı olarak haploid embriyolarının embriyogenez aşamasında 7-12.günlerde öldüğü fakat bazı balık türlerinde ise 4-5 gün süre ile hayatta kalabildiği bildirilmiştir (Komen ve Thorgaard, 2007; Walker ve diğ., 2009). Bu yöntem aynı türe ait fakat farklı fenotipik özellik gösteren erkek balıklara ait heterolog spermatozoa kullanılarak üretilen ginogenetik balıkların morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması temeline dayanır. Bu yöntem pek çok değişik türde yapılan ginogenez çalışmasında kullanılmış ve güvenilirliği doğrulanmış olan bir yöntemdir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Ginogenetik balık üretiminin morfolojik karşılaştırma yoluyla tespit edildiği çalışmalar.

Erkek Balık Türü	Dişi Balık Türü	Referans
<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Carrasius auratus</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Stanley, 1976
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Chourrout ve Quillet, 1982
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> (turuncu)	Suzuki ve diğ., 1985b
<i>Cyprinus carpio</i> , <i>Tinca tinca</i> , <i>C. auratus</i>	<i>O. niloticus</i>	Peruzzi ve diğ., 1993
<i>O. mossambicus</i>	<i>Betta splendens</i>	Kavumpurath ve Pandian, 1992, 1994
<i>M. anguillicaudatus</i>	<i>Cobitis biwae</i>	Kusunoki ve diğ., 1994
<i>Barbus barbus</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Castelli, 1994
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Tinca tinca</i>	Linhart ve diğ., 1995
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Crandell ve diğ., 1995
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Oryzias latipes</i> , <i>Oncorhynchus curvinotus</i>	Kurita ve diğ., 1995

2.11.4 Karyotip Analizi

Her balık türü için kromozom sayısı ve morfolojisi farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar nedeniyle karyotip analizi canlıyı tanımlamada yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. Türler arasında kromozom sayısı ve morfolojisindeki benzerliğin derecesine bağlı olarak da evrimsel ilişkilerin tespiti yapılabilmektedir. Popülasyonlar arasında ve popülasyonların kendi içinde gözlemlenen farklılıklar sayesinde evrimsel ilişkilerin tahmini ve stokların belirlenmesinde de karyotip analizi kullanılabilir (Thorgaard ve Disney, 1990). Balık kromozomlarının memeli kromozomlarından daha küçük ve sayılarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Bilgin, 2004; Timur ve Ekici, 2009). Kromozom preparatlarının hazırlanmasında metafaz hücreleri bakımından yoğun olan aktif olarak bölünen dokular kullanılır. Bu amaçla; embriyonik dokular, solungaç, ön böbrek, bağırsak ve pul epiteli balıkta bölünen hücreler için iyi birer kaynaktırlar (Thorgaard ve Disney, 1990). Kromozomlar mitoz bölünmenin metafaz evresinde iken kısalıp kalınlaşır, daha iyi görünür hale gelirler ve bu aşamada iken ışık mikroskopunda incelenebilirler. Bölünmekte olan hücrelere “colchicine, colcemid ve vinblastine sulfate” gibi maddeler verilerek iğ ipliklerinin parçalanması sağlanır (Thorgaard ve Disney, 1990). Hipotonik solüsyonlar kullanılarak hücre çeperlerinin parçalanması ve kromozomların hücre dışına çıkması sağlanır. Bu işlemten sonra, bozulmaları engellemek için fiksasyon işlemi uygulanır (Blaxhall, 1975). Ginogenetik balık üretimi çalışmalarında karyotip analizi, diploid kromozom sayısının sağlandığını teyit etmek amacıyla uygulanan bir yöntemdir (Colihueque ve diğ., 1992; Reed ve Phillips, 1995; Abuín ve diğ., 1996; Colihueque ve diğ., 1996; Morán ve diğ., 1997; Castro ve diğ., 2001; Caputo ve diğ., 2009; Özdemir ve Ekici, 2017).

2.11.5 Eritrosit Çap Ölçümü

Kırmızı kan hücreleri, eritrositler balıklarda memelilerden farklı olarak çekirdeğe sahiptir. Balık eritrosit hücreleri ve nukleusu elipsoidal bir morfolojiye sahiptir (Felip ve diğ., 2009). Bu sebeple elipsoidal yapıların hacim hesaplaması için kullanılan formül ile hücre ve nukleus hacim hesaplaması gerçekleştirilmektedir (Felip ve diğ., 1997). Triploid balıkların eritrosit ve nukleus hacimleri diploid balığına göre daha büyüktür. Kromozom manipülasyonu çalışmalarında poliploidi seviyesinin belirlenmesi için kontrol grubu ve deneme grubu arasında eritrosit çap ve hacim ölçümü gerçekleştirilerek hücresel olarak çap ve hacim farkları ortaya konulur (Ilhssen ve diğ., 1990; Felip ve diğ., 2001b). Bu yöntem pek çok balık türünde ploidi

tespiti için başarı ile kullanılmıştır (Wolters ve diğer., 1982; Benfey ve diğer., 1984; Thititananuki ve diğer., 1996; Felip ve diğer., 2001a; Cal ve diğer., 2005).

2.11.6 Cinsiyet Belirleme Geni ile Moleküler Tanımlama

Ana cinsiyet belirleyici genler, yumurtalıkların veya testislerin gelişimine önemli derecede etki eden gonadal cinsiyet farklılaşmasını kontrol eden temel genetik anahtarlardır (Yano ve diğer., 2012). Memelilerde 1990'lı yılların başında, ilk ana cinsiyet belirleme geni olan *Sry* (Y kromozomunun cinsiyet belirleyen bölgesi) tespit edilmiştir (Sinclair ve diğer., 1990; Vanpe'C ve diğer., 2013). Tavuklarda ve kuşlarda ise *Dmrt1* geni cinsiyet belirleyici gen olarak yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Dunnington ve diğer., 1990; Stiglec ve diğer., 2007; Smith ve diğer., 2009). Amfibilerde ise ana cinsiyet belirleme geni olarak Africa pençesi kurbağası'nın (*Xenopus laevis*) *dm-W* geni tespit edilmiştir. Bu gen, W dişi heterokromozomu üzerinde yer aldığından ve transaktivasyon alanını kaybeden bir *Dmrt1* otozomal geninin tekrarlanmasıyla evrimleşerek *dm-W*'nin *Dmrt1*'i baskılayarak negatif düzenleyici olarak görev aldığı tespit edilmiştir.

Balık türleri arasındaki yüksek genetik çeşitliliğin sebepleri incelenirken cinsiyet belirlemede etkili olan gen bölgeleri de tespit edilmiştir (Martinez ve diğer., 2014). Akuakültür sektöründe yetiştiriciliği yapılan ve cinsiyetin üretim verimini etkilediği balık türlerinde, cinsiyet belirleme genleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 7 farklı gen bölgesi tespit edilmiştir (Zhang ve diğer., 2009).

DMRT (çifte cinsiyet ve mab-3 ile ilgili transkripsiyon faktörü, Zhu ve diğer., 2000) gen bölgesi Medaka balığında (*Oryzias latipes*) (Schartl, 2004), plati balığında (*Xiphophorus maculatus*) (Kondo ve diğer., 2000; Veith ve diğer., 2003) ve japon kirpi balığında (*Takifugu rubripes*) (Artieri ve diğer., 2006; Shen ve diğer., 2007) tespit edilmiştir.

Sox (*Sry* ilişkili gen) gen bölgesinin cinsiyet belirlemede etkin rol aldığı Bowles ve diğer. (2000) tarafından rapor edilmiştir. Levrek balığında (*Dicentrarchus labrax*) (Galay-Burgos ve diğer., 2004), zebra balığında (*Danio rerio*) (Hofsten ve Olsson, 2005; Manolakou ve diğer., 2006) ve japon kirpi balığında (*Takifugu rubripes*) (Shen ve diğer., 2007) sox gen bölgesinin cinsiyet üzerindeki etkili olduğu tespit edilmiştir.

CYP19 (Sitokrom P450, aromataz üretiminden sorumlu gen) gen bölgesinin sıcaklığa bağlı olarak cinsiyet üzerinde farklı etki gösterdiği tespit edilmiştir (Hofsten ve Olsson, 2005). Zebra balığında (Chiang ve diğ., 2001), levrek balığında (Blazquez ve Piferrer, 2004) ve medeka balığında (Manolakou ve diğ., 2006) CYP19 gen bölgesinin tespiti ve etkisi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Östrojen (ER) ve androjen (AR) reseptör gen bölgesinin balıklarda cinsiyet belirlemede önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir (Blazquez ve Piferrer, 2004). Sarı levrek balığında (*Perca flavescens*) (Scott, 2008) ve Avrupa deniz levreğinde (Halm ve diğ., 2004) ER ve AR gen bölgelerinin cinsiyet üzerine etkileri tespit edilmiştir.

AMH (Anti-Müllerian hormon) gen bölgesi zebra balığında (Rodriguez-Mari ve diğ., 2005), medaka balığında (Klüver, 2007), japon yılan balığında (Miura ve diğ., 2002), japon pisi balığında (Yoshinaga ve diğ., 2004) ve Avrupa deniz levreğinde (Halm ve diğ., 2007) tespit edilmiştir.

WT1 (Wilms tümör baskılayıcı faktör) gen bölgesinin zebra balığında (Hsu ve diğ., 2003; Hofsten ve Olsson, 2005) cinsiyet üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

FTZ-F1 gen bölgesinin embriyogenezin erken döneminde (4. saate kadar) cinsiyet oluşumunda etkin rol aldığı tespit edilmiştir (Wakimoto ve diğ., 1984). Salmon balıklarında (Hofsten ve Olsson, 2005), medaka balığında (Watanabe ve diğ., 1999; Yoshiura ve diğ., 2003), alp dere alabalığında (*Salvelinus alpinus*) (Hofsten ve Olsson, 2005) ve zebra balığında (Chai ve Chan, 2000) FTZ-F1 gen bölgesinin bulunduğu belirlenmiştir.

Cinsiyet belirleme geni (SD) balıklarda gonad gelişiminin kontrolünü elinde bulundurarak testis yada ovaryum oluşumunu gerçekleştirir (Sinclair ve diğ., 1990; Matsuda ve diğ., 2002). Salmonidler de ise cinsiyet belirleme geni olarak “sdY” tanımlanmıştır. Bu gen; ginogenetik balık üretimi çalışmalarında ve cinsiyet belirleme çalışmalarında hızlı moleküler tanı amaçlı kullanılmaktadır (Yano ve diğ., 2012; Bachtrog ve diğ., 2014; Lubieniecki ve diğ., 2015).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Doktora çalışması Kastamonu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 29.02.2016 tarih ve 2016.03 sayılı izin ve kararı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1 MALZEME

3.1.1 Deney Yeri

Araştırma, Kastamonu ili Ilgaz Gürsu Alabalık tesisinde gerçekleştirilmiş ve çalışma süresince deney balıkları ve elde edilen yumurtalar bu tesiste muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Çalışmanın yapıldığı tesisin genel görünümü.

3.1.2 Deney Balıkları

On yedi dişi ve 24 erkek Karadeniz alabalığı Haziran 2016'da temin edilerek Kastamonu ili Ilgaz Gürsu Alabalık tesisinde deney düzeneği oluşturulmuştur. Eylül ayının sonuna kadar bir arada tutulan anaç balıklar daha sonra kontrol edilerek dişi ve erkek olarak ayrılmıştır. Anaç balık kontrolleri ve incelenmesi 3 günlük aralıklarla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2: Karadeniz alabalığı (Dişi).

3.1.3 Deney Balıklarının Ağırlığı ve Boyu

Dişi anaç balıkların ortalama boyu $55,7 \pm 7,9$ cm (range = 48-64 cm) ve ortalama ağırlığı 1320 ± 220 g'dır. Erkek anaç balıkların ortalama boyu $59,2 \pm 8,4$ cm ve ortalama ağırlığı 1418 ± 310 g olarak ölçülmüştür.

3.1.4 Deney Balıklarının Beslenmesinde Kullanılan Yem ve Besleme Şekli

Çalışmada özel bir balık yemi üretim firmasından alınan ticari 9 mm'lik anaç alabalık yemi kullanılmıştır. Yemin besin madde içeriği %49 protein, %14-16 ham yağ, %2-2,5 ham selüloz, %9-10 nem olarak beyan edilmiştir. Deney balıkları tesise getirildikten ve adaptasyonları sağlandıktan sonra sabah/akşam olmak üzere günde 2 kez ortalama ağırlıklarının yüzde 3'ü oranında beslenmiştir.

3.1.5 Deney Balıklarının Yetiştirildiği Havuzlar ve Havuzlarda Kullanılan Suyun Özellikleri

Deneyde genişliği 2 metre, uzunluğu 7 metre olan ve 120 cm su derinliğine sahip beton havuzlara Çatören deresinden (Kastamonu) alınan su verilmiştir (Şekil 3.3). Deney balıkları 21/06/2016 tarihinde 14°C su sıcaklığında, $10,38 \pm 1,23$ mg/L çözünmüş oksijen içeren taze su ile doldurulmuş havuzlara aktarılmıştır. Üreme dönemi başlangıcına kadar aynı havuz içerisinde tutulan anaç Karadeniz alabalıkları üreme döneminden önce erkek ve dişi olarak ayrı ayrı stoklanmıştır. Denemelerin yapıldığı dönemde (Ekim-Ocak ayları) anaç havuzlarındaki suyu sıcaklığı $7 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar düşmüştür.



Şekil 3.3: Anaç balık havuzları.

3.1.6 Kuluçkahane

Çalışmada elde edilen yumurtalar dölleme sonrasında kuluçkahane içerisinde bulunan fayansla kaplı 50x100 cm² boyutlarında 30 cm su yüksekliğine sahip küvetlere 3 paralelli olarak yerleştirilmiştir. Kuluçkahaneye kaynak suyu ile az miktarda dere suyu birlikte verilmiştir. Kuluçkahane suyunun sıcaklığı deneme süresince (Ekim-Ocak ayları) $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Yumurta inkubasyonunda kullanılan kuluçkahane küvetleri ve tablalar.

Tablo 3.1: Deneyde kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Katalog No.	Marka
Kolşisin	C9754	Sigma-Aldrich
Fenoksi-Ethanol	P1126	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür	567440	Merck
Potasyum Klorür	529552	Merck
Sodyum Bikarbonat	6329	Merck
Sodyum Sekonder Fosfat	106370	Merck
Magnezyum Sülfat	106067	Merck
Alkol (Ethanol)	100986	Merck
Kalsiyum Klorür	2739	Merck
Hepes	H4034	Sigma-Aldrich
Mono Potasyum Fosfat	104877	Merck
Deniz Tuzu	7711	Merck
Sodyum Asetat Anhibrid	106264	Merck
Magnezyum Klorür	814733	Merck
Tris Tamponu	T6789	Sigma-Aldrich
Glasiyel Asedik Asit	632500	Merck
Trizma	T1503	Sigma-Aldrich
Kloroform	2445	Merck

3.1.7 Deneyde Kullanılan Solüsyonlar ve İçerikleri

3.1.7.1 Sperm Sulandırma Solüsyonları

Deneyin başarısını etkileyecek en önemli unsurlardan biri olan spermatolojik özelliklerin belirlenmesi için denemeler yapılmıştır. Denemelerde önceden belirlenen ve taze olarak hazırlanan ve aşağıda verilen 5 farklı sperm sulandırma solüsyonu kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Sperm sulandırma solüsyonları ve içerikleri.

Sperm Sulandırma Solüsyonları	Kimyasal	Miktar	
<i>Fizyolojik Tuz Solüsyonu</i>	NaCl	600 mg	
	KCl	315 mg	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	15 mg	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	20 mg	
	HEPES	470 mg	
	dH ₂ O	100 ml	
<i>Antibiyotik İçermeyen (Bicine içeren) Solüsyon</i>	Kimyasal	Miktar	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.001 M	
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.001 M	
	Na ₂ HPO ₄	0.002 M	
	KCl	0.034 M	
	Sitrik Asit	0.001 M	
	Glikoz	0.055 M	
	KOH	10 ml (0.002 M)	
	A Bicine	20 ml (0.006 M)	
	dH ₂ O	100 ml	
<i>Hank's Dengeli Tuz Solüsyonu</i>	Kimyasal	Miktar (300 mOsm.kg⁻¹)	Modifiye (250 mOsm.kg⁻¹)
<i>Sol I</i>	NaCl	8 g	6 g
	KCl	0.4 g	0.3 g
	dH ₂ O	100 ml	100 ml
<i>Sol II</i>	K ₂ H ₂ PO ₄	0.6 g	0.5 g
	Na ₂ HPO ₄	0.358 g	0.250 g
	dH ₂ O	100 ml	100 ml
<i>Sol III</i>	CaCl ₂	0.72 g	0.58
	dH ₂ O	50 ml	50 ml
<i>Sol IV</i>	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.23 g	0.99 g
	dH ₂ O	50 ml	50 ml
<i>Sol V</i>	NaHCO ₃	0.35 g	0.28 g
	dH ₂ O	10 ml	10 ml
<i>Hank's Final Solüsyonu</i>	Sol – I	10 ml	10 ml
	Sol – II	1 ml	1 ml
	Sol – III	1 ml	1 ml
	Sol – IV	0.1 ml	0.1 ml
	dH ₂ O	86 ml	86 ml
	Sol – V	1 ml	1 ml
<i>Trizma İçeren Solsüyon (Billard ve Cosson; 1992)</i>	Kimyasal	Miktar	
	NaCl	0.234 g	
	KCl	0.149 g	
	CaCl ₂	0.0055 g	
	Trizma	0.1575 g	
	dH ₂ O	50 ml	

Hazırlanan tüm solüsyonların osmotik basınç değeri 300mOsm/kg olarak ayarlanmıştır. Bunun için çalışmada kullanılan spermanın osmotik basınç değerine göre sulandırma solüsyonlarının içeriğindeki kimyasal miktarlarında modifikasyonlar yapılmıştır. NaCl, KCl, CaCl₂ ve K₂H₂PO₄ Hank's solüsyonunun osmotik basıncını düşürmek ya da yükseltmek amacıyla doğru orantılı olarak solüsyon içerisindeki değerlerinde değişiklik yapılmıştır.

3.1.7.2 Fenoksi-ethanol

Balığın anesteziye alınması amacıyla 7-10ml/lt oranında fenoksi-ethanol kullanılmıştır.

3.1.7.3 Carnoy's Fiksatif

Karyotip analizleri sırasında hücrelerin fiksasyonu amacıyla 30 ml asetik asit üzerine 60 ml methanol ve 5-10 ml kloroform eklenerek hazırlanmıştır. Fakat kloroformun hücrenin şişmesini engellemesinden dolayı karışımdan çıkarılmıştır.

3.1.7.4 Ringer Solüsyonu

Spermatozoa yoğunluğunun hesaplamasında kullanılmıştır. Ringer solüsyonu, 3,25 g NaCl, 2,5 g KCl, 0,1 g NaHCO₃ ve 0,15 g CaCl₂ 500 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

3.1.7.5 Colchicine (Kolşisin) solüsyonu

Karyotip analizleri sırasında hücre bölünmesinin engellenmesi amacıyla kullanılmıştır. Kolşisin solüsyonu hazırlamak için 0,011 g kolşisin 50 ml dH₂O içerisinde çözündürülmüştür.

3.1.7.6 Giemsa Boyası

Metafaz safhasında bölünmesi engellenen hücrelerin patlatılmasıyla elde edilen kromozom setlerinin boyanması için saf su ile hazırlan %4'lük Giemsa solüsyonu kullanılmıştır.

3.1.8 Deneyde Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

3.1.8.1 Ultraviyole Cihazı

UV uygulaması için UVP TL-2000 translinker cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: UV Translinker cihazı.

3.1.8.2 Multiparametre

Deney havuzlarında ve kuluçkahanede kullanılan suyun sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijen miktarının ölçümünde Hach-Lange marka multiparametre cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Multiparametre cihazı.

3.1.8.3 Sıcak Su İnkübatörü

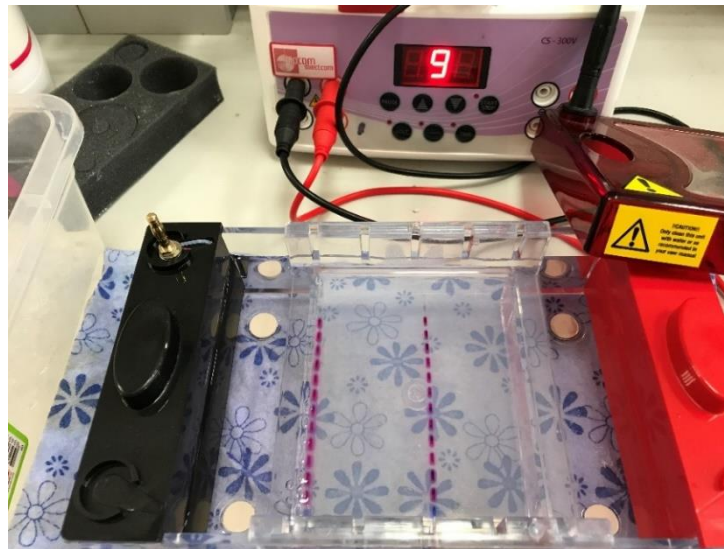
Dölllenmiş yumurtalardan ikinci kutup hücresinin çıkışını engellemek amacıyla gerçekleştirilen sıcak şok uygulamalarında Elektro-mag marka su banyosu kullanılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Sıcak su inkübatörü.

3.1.8.4 Jel Elektroforez Cihazı

PZR ürünlerini ayırtırmak için Bio-com CS-300V marka yatay elektroforez tankı kullanılmıştır. Agaroz jel (Konsantrasyonu %1, % 1,5) hazırlanarak kalıplara dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra örnekler kuyucuklara yüklenmiş ve yatay jel Elektroforez cihazı (Bio-com CS-300V) kullanılarak gen varlığı ya da yokluğu tespit edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: Yatay jel elektroforez cihazı.

3.1.8.5 *Jel Elektroforez Görüntüleme Cihazı*

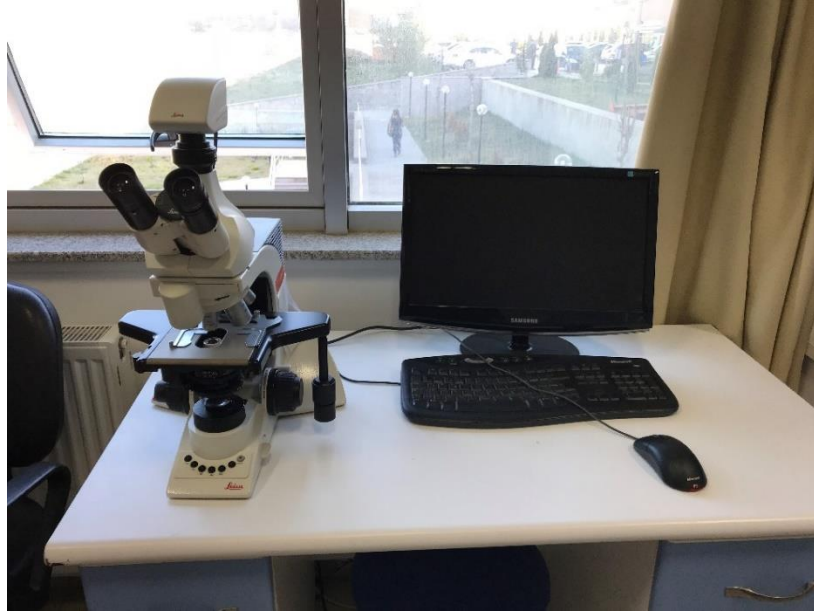
Yatay jel elektroforezinde ayrıştırılan PZR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla fotoğraf makinesi ataçmanlı bilgisayara bağlı UV jel görüntüleme cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Jel görüntüleme cihazı.

3.1.8.6 *Işık Mikroskobu*

Entellan ile kapatılan karyotip analizi örnekleri bilgisayara bağlı Leica marka fotoğraf makinesi ataçmanlı ışık mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Fotoğraf makinesi ataçmanlı ışık mikroskobu.

3.1.8.7 Stereo mikroskop

Karadeniz alabalığı yumurtalarının dölleme işlemi öncesi ve sonrası incelenmesi amacıyla Zeiss marka bir stereo mikroskop kullanılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Bilgisayara bağlı fotoğraf makinesi ataçmanlı stereo mikroskop.

3.1.8.8 Isıtma Tablası

Karyotip analizi çalışmasında lamaların 50°C'ye kadar ısıtılması için kullanılmıştır.



Şekil 3.12: Isıtma tablası.

3.1.8.9 Termal Döngü Cihazı

Belirlenmiş gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3.13: Termal döngü cihazları.

3.1.8.10 Osmometre Cihazı

Çalışmada kullanılan solüsyon ve sperma örneklerinin osmotik basıncının ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 3.14: Osmometre cihazı.

3.1.8.11 Micro plate Reader

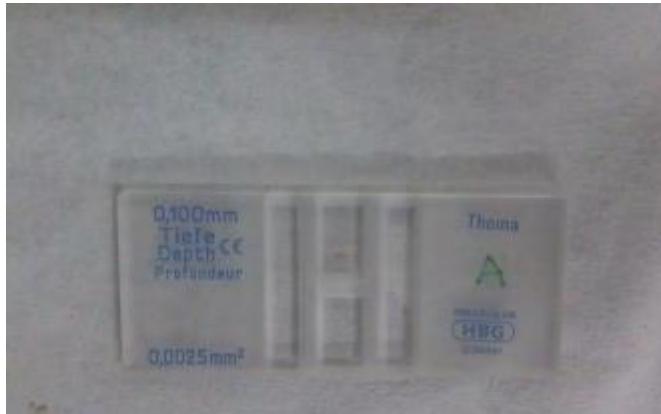
Genomik DNA örneklerinin miktar tayininde Thermo Multiscan Go mini drop cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: Thermo MultiScan Go Mini drop cihazı.

3.1.8.12 Thoma Lamı

Sperma örneklerinde spermatozoa sayımı için Thoma lamı kullanılmıştır.



Şekil 3.16: Thoma lamı.

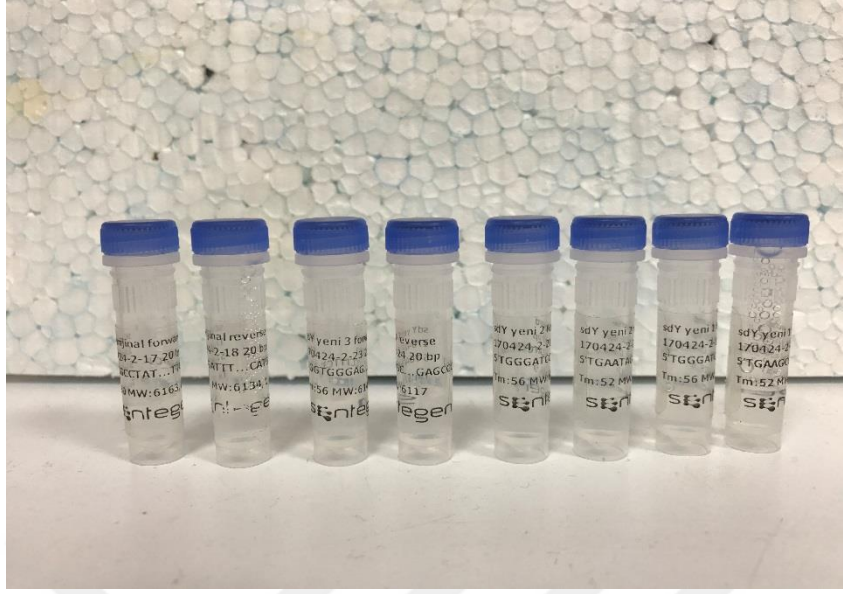
3.1.8.13 Moleküler Tanı Kitleri ve Primerler

Termal döngü cihazında primer setlerinin çoğaltılması ve jel içerisinde net görüntü vermelerini sağlamak amacıyla kullanılmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17: Moleküler tanı çalışmasında kullanılan DNA büyüklük belirteci (a) ve DNA polimeraz (b).

Quemere ve diğ.'nin 2014 yılında Salmonidler üzerinde yapmış olduğu hızlı cinsiyet belirleme çalışmasında kullanmış oldukları sdY geni için dizayn ettikleri Salmo-sdY-F:5'GGGCCTATGAATTTCTGATG (forward-primer) ile Salmo-sdY-R:5'ACAGATTTGCGACATGAACA (reverse-primer) ve bu primerlere ek olarak dizayn edilen üç farklı primeri; sdY-1-F:5'TGGGATCCCCGTCATCTCTC sdY-1-R:5'TGAAGCGTTCCAACCTCCTGT, sdY-2-F:5' TGGGATCCCCGTCATCTCTC sdY-2-R:5'TGAATAGCTGCTGAGCCCAT ve sdY-3-F:5'GGTGGGAGGTACTCCCTTTC ile sdY-3-R:5'TGAATAGCTGCTGAGCCCAT kullanarak ginogenez uygulamasının başarısı sdY geninin varlığı (ginogenetik olmayan) ya da yokluğu (ginogenetik) ortaya konularak kanıtlanmaya çalışılmıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: Çalışmada kullanılan primer setleri.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Sperma Hareketlilik Oranı ve Süresinin Tespiti

Spermatolojik özelliklerin belirlenmesinde aktivasyon solüsyonu olarak; Ekici ve Yamaner (2013)'in çalışmalarında verilen 180 mM NaCl, 7 mM Ca^{+2} ve kuluçka suyu kullanılmıştır. Spermatozoa hareketliliğini ölçmek amacıyla 1 μ l sperma ile 10 μ l aktivasyon solüsyonu kullanılmış ve ışık mikroskobu (20x) altında hareketlilik oranı yüzdesel olarak değerlendirilmiştir.

Spermatozoa motilitesini değerlendirilmesi sırasında hassas kronometre (1/100 saniye) yardımıyla spermatozoonların canlılık süresi saptanmıştır. Bu işlem için mikroskop tablasına konan sperma numunesinde son motil spermatozoonun canlılığını kaybetmesine kadar geçen süre spermatozoonun canlılık süresi (sn) olarak kaydedilmiştir.

3.2.2 Sperm Sulandırıcılarının Oranının Tespiti ile Sperm Hareketlilik Oran ve Sürelerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

UV ışınlama uygulamasının başarısını artırmak amacıyla 1:10, 1:20, 1:50 ve 1:100 oranlarında, sperm sulandırıcısı olarak kullanılmak üzere hazırlanan solüsyonların sperm hareketlilik oran

ve süresine etkisi ışık mikroskobu (20x) altında yüzdesel olarak değerlendirilmiş hassas kronometre (1/100 saniye) yardımıyla spermatozoonların canlılık süresi saptanmıştır.

3.2.3 Ginogenez Çalışması Deneme Grupları

Çalışmada aşağıdaki tabloda verilen 4 deneme grubu oluşturulmuştur (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Deneme gruplarının oluşturulması

Gruplar	Spermaya UV uygulaması	Döllenme sonrası sıcak şok uygulaması
<i>Haploid</i>	Var	Yok
<i>Ginogen Diploid</i>	Var	Var
<i>Kontrol Diploid</i>	Yok	Yok
<i>Triploid</i>	Yok	Var

3.2.4 Ultraviyole Uygulaması

Lethal doz ve optimum doz tespiti gerçekleştirilerek ginogenetik Karadeniz alabalığı üretimi için optimum doz belirlenmiştir. Optimal dozun belirlenmesinden sonra sperma + sulandırıcı karışımının bulunduğu saat camına 5 ve 10 dk. süreyle 28-30 cm mesafeden titreşim verilerek UV uygulanmıştır.

3.2.5 Ginogen Diploid ve Triploid Karadeniz Alabalığı Eldesinde Sıcak Şok Uygulama Zamanı ve Süresinin Tespiti

Erkek balıklardan ayrı olarak tutulan en az 4 adet dişi balıktan elle sağım metoduyla yumurtalar alınarak pooling yapılmış ve her bir sıcaklık şoku derecesinde kullanılmak üzere deneme gruplarına $32,5 \pm 2,5$ g (375 ± 50 adet) olarak ayrılmıştır. Sıcak şok uygulaması ginogen diploid ve triploid olması arzu edilen yumurta gruplarına uygulanmıştır. Dölleme işlemi ve yumurtaların yıkanmasını takiben su sıcaklığına ve yumurtaların sertleşmesine bağlı olarak 20 ± 10 dakikaya kadar beklenmiş olup 15 ve 20 dakika sonrasında 28,0-28,5-29-30 ve 31°C’lerde sıcak şok 20 litre hacimli termostatl su banyosunda elekler içine alınan yumurtalar hava motoru ile havalandırılarak uygulanmıştır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19: Dölllenmiş yumurtalara sıcak şok uygulaması.

3.2.6 Spermatozoa Sayımı

Hücre sayımında yaygın olarak kullanılan metotlardan hemositometrik sayım (Davis, 2002) çeşitlerinden biri olan Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sperma çukur kısım üzerine aktarılıp, lamel kapatıldığında bu çukurda 0,1 mm yüksekliğinde bir sıvı kalır. Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. 25 küçük karenin dış ve iç kenarlar arasında ayırım için birer satır ve sütun sayım yapılırken kullanılmamıştır. Bu kenarların içerisinde kalan 16 küçük kare içerisinde sayım yapılmış ve sayım sonucu elde edilen hücre adedi, 10000 ile çarpılarak $0,1\text{mm}^3$ 'te ki hücre yoğunluğu hesaplanmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990).

3.2.7 Karyotip Analizi

Deney gruplarından alınan Karadeniz alabalığı yavruları (besin kesesini tüketmiş ve 0,75-1 g ortalama ağırlığa sahip), 4mg/ml 'lık kolşisin solüsyonu içerisinde karanlık ortamda 120 dk. süre ile tutulmuştur. Karadeniz alabalığı üzerinde yapılmış karyotip analizi çalışmalarında kolşisin solüsyonu içerisinde balığın bekletilme süresi 3-7 saat arasında değişiklik göstermektedir (Kenanoğlu ve diğ., 2013, Karami ve diğ., 2015). Çalışmada uygulanan 2 saatlik bekleme süresi sonunda kromozomların net görüntüleri ve metafaz aşamasında hücrelerin görülememesinden dolayı kolşisin içerisinde balığın tutulma süresi artırılmıştır. 12 saate kadar kolşisin solüsyonu içerisinde tutulan kontrol, ginogen ve triploid gruptan 3'er adet balık alınarak, yüzgeç dokuları ince keskin uçlu pens yardımıyla çıkarılmıştır. Dokular %1.1 'lık sodyum sitrat içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra buz üzerine aktarılarak 10 dakika boyunca

bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yüzgeç dokuları 3:1 methanol:asetik asit (Carnoy fiksatif) içerisine aktararak 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve bu süre sonrasında taze methanol:asetik asit fiksatifine alınarak gece boyunca +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Methanol:asetik asit fiksatif içeriğinde muhafaza edilen dokular fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve daha sonrasında üzerlerine %50’lik asetik asit damlatılarak (500µl) ezme işlemi gerçekleştirilmiştir. Dokuların ezilme işleminden sonra elde edilen örnekler kapillar tüpe alınarak önceden ısıtma tablasında 50°C’ye kadar ısıtılmış olan lam üzerine 20-30 cm yükseklikten damlatılmıştır. Preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar %4’lük Giemsa boyası içeriğinde 20 dakika tutularak boyanmış ve sonrasında saf su ile yıkanarak temizlenmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi biten örnekler, entellan ile kapatılarak Leica marka bilgisayara bağlı fotoğraf makinesi ataçmanlı ışık mikroskobunda incelenmiştir.

3.2.8 Moleküler Tanımlama

Çalışmada ginogenetik Karadeniz alabalığı üretiminin kanıtlanması amacıyla elde edilen ginogenetik balıklardan yüzgeç ve solungaç dokusu örnekleri alınmıştır (Şekil 3.20).



Şekil 3.20: Moleküler tanı metodunda kullanılan Karadeniz alabalığı yavruları.

Alınan dokular mikro tüp içerisinde sıvı azot ile dondurularak laboratuvara getirilmiştir. En az 20 mg doku örneği olmasına dikkat edilerek alınan dokular GeneAll Genomik DNA purification kit kullanılarak genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen genomik DNA örneklerinin moleküler tanı metodunda kullanılması için gerekli olan 10 pikomol (pm) değerine sulandırılabilmesi için öncelikle yoğunlukları Thermo Multiscan Go mini drop cihazı kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 3.15).

Moleküler tanı metodunda pozitif ve negatif kontrol uygulaması için olgun erkek ve dişi Karadeniz alabalığından yüzgeç dokusu örnekleri alınmış ve yukarıda belirtilen yöntemle genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen örnekler Mytaq Red DNA Polymerase kit yardımı ile PCR'a konmak üzere hazırlanmıştır (Şekil 3.17-18).

PCR protokolü olarak kit üzerinde belirtilen protokol izlenmiştir; 95°C'de 60 sn aktivasyon aşaması, 30 döngü; denaturasyon aşaması 95°C'de 15 sn/60°C'de 15 sn/72°C'de 10 sn ve son artırma 72°C'de 60 sn olarak uygulanmıştır. Belirlenen protokole göre termal döngü sonucu elde edilen örnekler 0,4 g agaroz + 40 ml TAE (uzun adı yazılacak) (1x) + 1 µl red free eklenerek hazırlanan jel içerisinde yürütülmüştür.

3.2.9 Eritrosit Çap Ölçümü

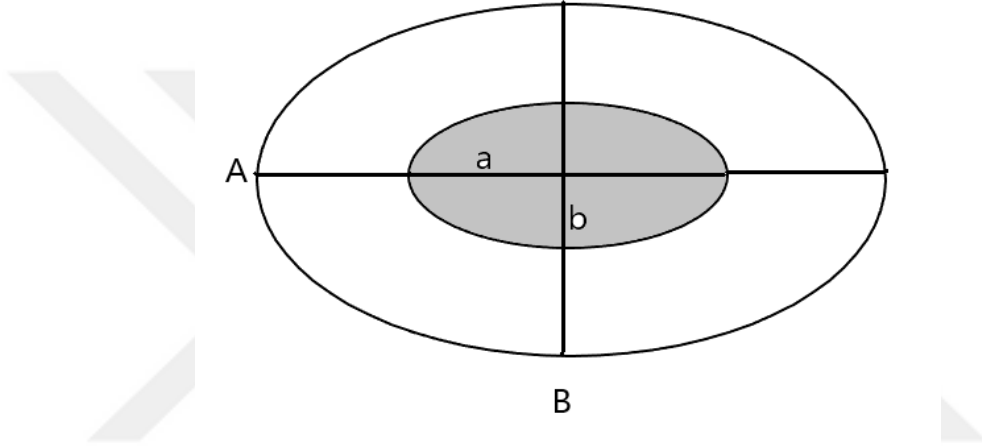
Ethanol ile iyice temizlenen lam üzerine 50 günlük larvanın kuyruk kısmı kesilerek 1 damla kan damlatılmış ve lamel yardımıyla froti çekilmiştir. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılan örnekler 10 dk. süre ile %100'lük methanol ile fikse edildikten sonra tekrardan kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler %4-6'lık Giemsa içerisinde 10-15 dk. süre ile tutularak eritrositleri boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Culling, 1963; Bullock, 1978). Boyadan alınarak saf su içerisinde yıkanan örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan kullanılarak kapatılmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Eritrosit hücre minör aksis, majör aksis ve eritrosit çekirdek minör aksis ve majör aksis ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.21). Aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır (A: Eritrosit majör aksis, B: Eritrosit minör aksis, a: Eritrosit çekirdek majör aksis, b: Eritrosit çekirdek minör aksis) (Benfey ve Sutterlin, 1984).

$$V_{\text{eritrosit}}: 4/3 \times \pi \times (A/2) \times (B/2)^2$$

$$V_{\text{çekirdek}}: 4/3 \times \pi \times (a/2) \times (b/2)^2$$

$$\text{Eritrosit yüzey alanı} : (\pi/4) \times A \times B$$

$$\text{Çekirdek yüzey alanı} : (\pi/4) \times a \times b$$



Şekil 3.21: Eritrosit ve eritrosit çekirdek çaplarının ölçümü.

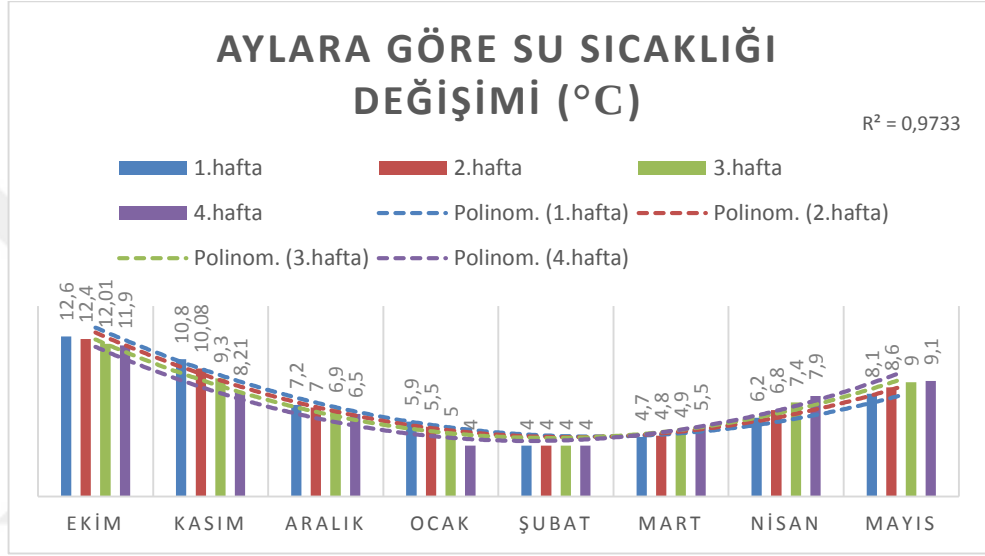
3.2.10 İstatistiki Analizler

Deneyde elde edilen bütün verilerin ortalama ve standart sapma ($\pm SS$) değerleri Microsoft Office Excel programı yardımıyla hesaplanmış ve arcsin karekök transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu verilere SPSS 23.0 programı yardımıyla homojenite testi ve Varyans Analizi (ANOVA) uygulanmıştır. İstatistiki olarak belirgin fark gösteren deneme ortalamaları Tukey HSD testi uygulanarak ayrıştırılmıştır. Tüm testlerde $\alpha=0.05$ önem derecesi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 SU SICAKLIĞI

Deneme süresince anaç Karadeniz alabalıklarının tutulduğu havuzlardaki ve kuluçkahanede ki su sıcaklığı ölçümleri Ekim-Mayıs ayları arasında haftalık olarak yapılmıştır. Çalışma süresince aylık olarak elde edilen su sıcaklık değişimleri şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Aylara göre işletme su sıcaklığı değerleri.

4.2 SPERMANIN MORFOLOJİK VE SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ

4.2.1 Sperm motilitesi

Her bir Karadeniz alabalığından elde edilen sperma miktarının minimum 3ml olmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen spermanın morfolojik yapısı göz ile muayene edilmiş ve süt beyazı renginde olan çok sulu olmayan yapıdaki spermalar kullanılmıştır.

Sperma örnekleri Eylül 2016’dan itibaren toplanmaya başlanıp Mart-2017’ye kadar örneklerin toplanması devam etmiştir. Ayda 4 kez alınan spermanın motilite ve osmotik basınç değerleri tespit edilerek kayıt edilmiştir.

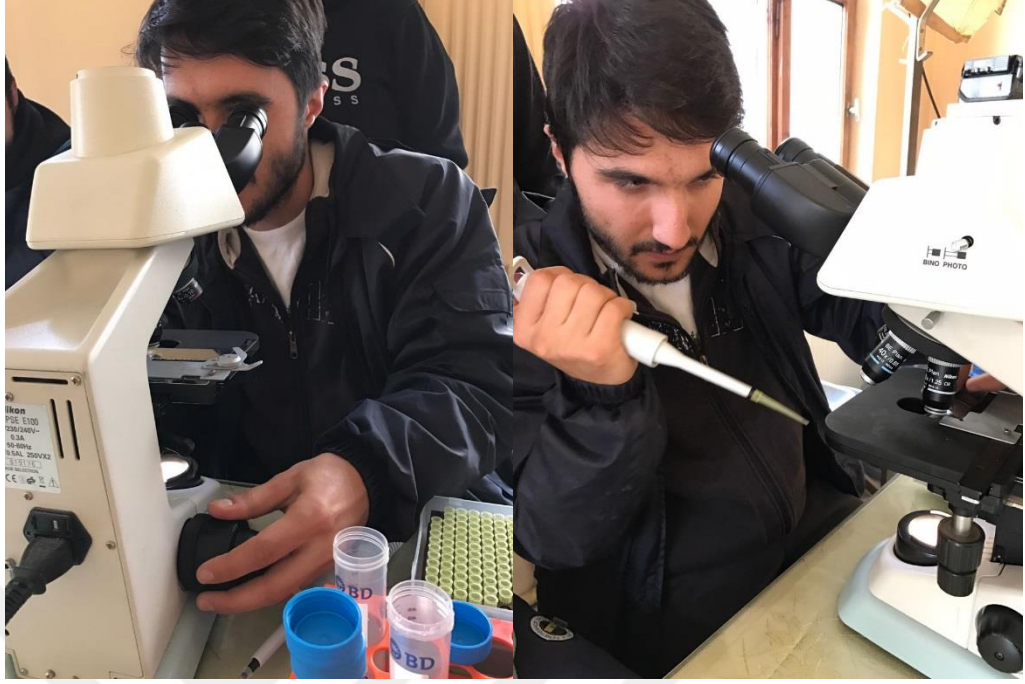
Her bir ginogenetik balık üretimi denemesi sırasında, 2 adet erkek Karadeniz alabalığından elde edilen sperma karıştırılarak kullanılmıştır. Karıştırılan sperma örneklerinin motilitesi

önce ışık mikroskopunda (x20) tespit edilmiş ve sadece % 90 ve üzeri motiliteye sahip örnekler çalışmada kullanılmıştır (Şekil 4.2).

Sağım yapıldıktan hemen sonra strafor kutu içerisinde karanlık ortamda +4°C’de muhafaza edilen sperma örnekleri 1:20 oranında (Sperma : Hank’s solüsyonu) seyreltilerek kullanılmıştır. Seyreltilen spermanın motilite yüzdesi ve süresi; 80 ± 10 , 60 ± 15 sn olarak kronometre kullanılarak tespit edilmiştir. Sperma : Hank’s solüsyonu +4°C’de karanlık ortamda 4 saate kadar muhafaza edilerek ilk alındığı andan itibaren her saat başı motilite yüzdesinde ki değişimler takip edilmiştir. Karışım yapıldıktan hemen sonra (0.dk), 1.saat ve 2. saatte tespit edilen sperm motilitesi >90 iken 3. saatte tespit edilen motilite yüzdesi ve süresinde %20 düşüş gözlemlenmiştir (Tablo 4.1). Sperma anaç balıkların bulunduğu dereden alınan su ile 1:20 oranında sulandırılarak (sperma-aktivasyon sıvısı) aktive edilmiş ve 20x büyütmede ışık mikroskopunda (Olympus Cx21) motilite kontrol edilmiştir. Spermatozoa sayısı hemositometrik yöntemle sayılarak $4,5 \pm 1,8 \times 10^9$ /ml spermatozoa olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1: Sperm motilite yüzdesi ve süresi.

Taze Sperm Motilite		Hank’s-Sperm Karışım Motilite		
Yüzdesi (%)	Süresi (sn)	Yüzdesi (%)	Süresi (sn)	Spermin Hank’s İçerisinde Tutulma Süresi (dk)
>90	65	>90	60	10
>90	65	>90	60	60
>90	65	>90	60	120
>90	65	>90	60	180
>90	65	60	45	210



Şekil 4.2: Sperm motilite tespiti.

4.2.2 Kullanılan sulandırıcılar ve sperm motilitesine etkisi

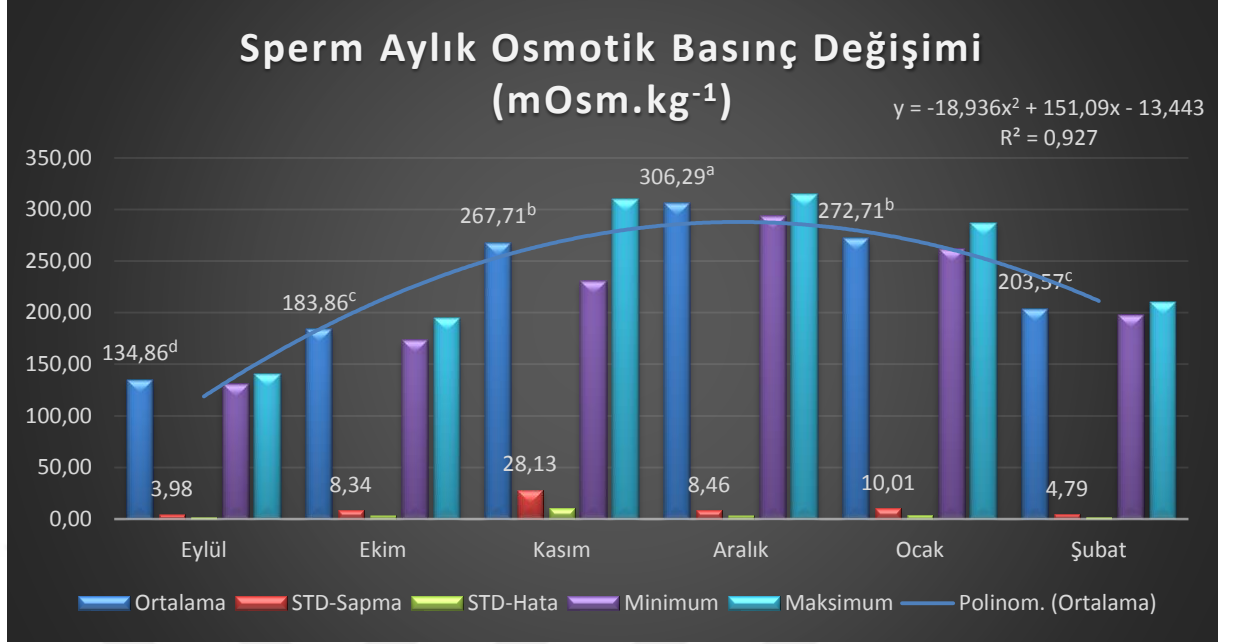
Çalışmanın başarısını etkileyecek en önemli unsurlardan biri olan spermatolojik özelliklerin belirlenmesi amacıyla taze olarak hazırlanan 5 farklı sulandırma solüsyonu [fizyolojik tuz solüsyonu (HEPES içeren), antibiyotik içermeyen (Bicine içeren) solüsyon, Hank's Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS), *Salmo trutta macrostigma* için hazırlanan (Trizma içeren) (Billard ve Cosson, 1992) solüsyon ve PBS solüsyonu kullanılmıştır. Sulandırma solüsyonu çalışmada spermanın seyreltilmesi ve ginogenetik balık eldesinde UV uygulamasının başarısını artırmak amacıyla kullanılmıştır. Sulandırma solüsyonu ile karıştırılan ve 4°C'de muhafaza edilen spermanın sağımdan sonraki ilk 3 saat boyunca canlılığını koruduğu tespit edilmiştir. Bu sulandırma solüsyonları içerisinde HBSS'nin diğer solüsyonlara göre daha iyi sonuç verdiği (>%90) tespit edilmiştir.

Yapılan denemeler sırasında spermanın osmotik basıncı ve pH'ı tespit edilerek sulandırıcıların optimizasyonu yapılmıştır. Sulandırıcıların optimizasyonu yapıldıktan sonra gerçekleştirilen denemelerde en iyi spermatozoa aktivasyonu fizyolojik tuz solüsyonu ve Hank's solüsyonunun kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiştir. Çalışmada olgun erkek Karadeniz alabalığından (*Salmo trutta labrax*) alınan spermanın pH'ının 7-8.5, osmotik

basıncının ise 210-360 mOsm/kg değerleri arasında olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle sulandırıcı ve aktivasyon solüsyonlarının pH ve osmotik basınçları sırasıyla 7-8.5 ve 250-300 mOsm/kg olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.2.3 Sperma ve sulandırıcıların osmotik basınç değerleri ve sperma motilitesine etkisi

Üreme dönemi boyunca her ay yapılan örneklemede elde edilen spermanın osmotik basınç değerleri Eylül ayında 130-140 mOsm.kg⁻¹, Ekim ayında 173-195 mOsm.kg⁻¹, Kasım ayında 230-310 mOsm.kg⁻¹, Aralık ayında 293-315 mOsm.kg⁻¹, Ocak ayında 261-287 mOsm.kg⁻¹ ve Şubat ayında 197-210 mOsm.kg⁻¹ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Çalışma boyunca Hank's solüsyonu (HBSS) 290 mOsm.kg⁻¹ kontrol sulandırma solüsyonu olarak kullanılmıştır. Sperma osmotik basınç ölçümlerine göre HBSS osmotik basıncı içeriğinde modifikasyon yapılarak motilite değerlerine etkisi tespit edilmiştir. Eylül ayında yapılan çalışmada kontrol HBSS kullanılan örneklerde sperm motilitesi %20 iken 210 mOsm.kg⁻¹ olarak osmotik basıncı ayarlanmış HBSS ile %50 olarak gözlemlenmiştir. Ekim ayında ise kontrol HBSS ile sulandırılmış sperma motilitesi %50 iken 250 mOsm.kg⁻¹ HBSS'de %70 motil olduğu gözlemlenmiştir. Kasım ve Aralık aylarında kontrol HBSS ve modifiye edilmiş 300 mOsm.kg⁻¹ HBSS'nin motiliteye etkileri (>%90) benzerlik göstermiştir. Ocak ve Şubat aylarında ise kontrol HBSS'nin kullanılarak sulandırılan sperma motilite değerlerinin %90'ın altında olduğu tespit edilmiştir. Motilite yüzdesinin belirlenmesi sırasında sperm osmotik basıncıyla HBSS osmotik basıncı arasındaki farkın yüksek olduğu (150 mOsm.kg⁻¹) durumlarda spermatozoa hücresinin baş bölgesinin zaman içerisinde şiştiği ışık mikroskopunda gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3: Sperma aylık osmotik basınç değerleri.

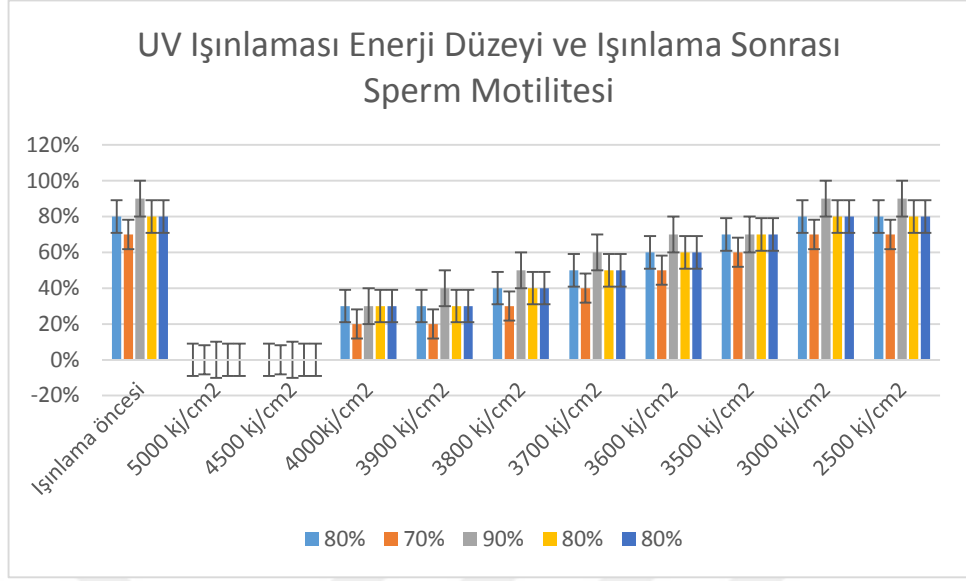
4.3 RADYASYON (UV) UYGULAMASI

4.3.1 UV ışınlama optimizasyonu

UV ışınlaması farklı enerji seviyelerinde Hank's-Sperma karışımına uygulanmıştır. Bu farklı enerji seviyelerindeki uygulamalar “Lethal doz” ve “Optimum doz” tespiti amacıyla yapılmıştır.

4.3.2 UV ışınlama sonrası sperma özellikleri

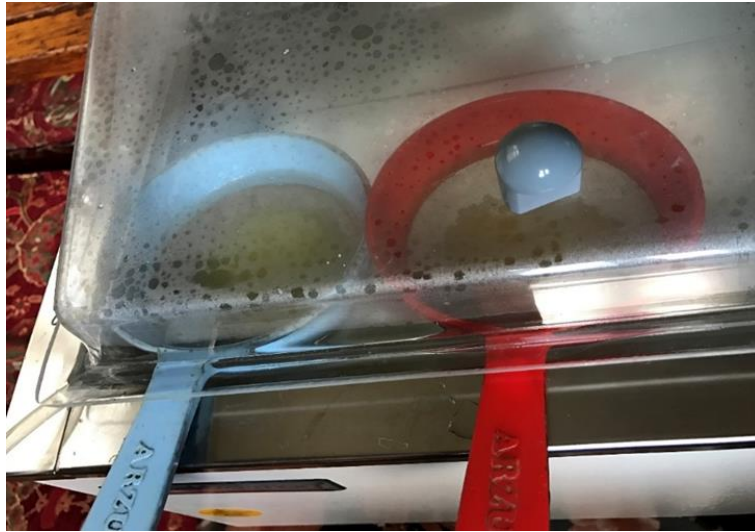
Lethal doz 4500 Kj/cm² (%0 motilite), optimum doz ise 3600 Kj/cm² (%70-80 motilite) olarak tespit edilmiş ve ginogenetik Karadeniz alabalığı üretimi aşamalarında optimum doz kullanılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: UV ışınlaması enerji düzeyi ve ışınlama sonrası sperm motilite yüzdesi.

4.4 ŞOK UYGULAMASI

Dölleme işlemi ve yumurtaların yıkanmasını takiben su sıcaklığına ve yumurtaların sertleşmesine bağlı olarak 20 ± 10 dakika kadar bekledikten sonra yumurtalar inkübatörlere alınmıştır. İnkübatöre alındıktan 15 ve 20 dakika sonrasında döllenmiş yumurtalar hava motoru kullanılarak havalandırılan 20 litre hacimli termostatlı su küvetine alınarak 28,0-28,5-29,0-30,0 ve 31°C’lerde 15 dakika süreyle sıcaklık şokuna maruz bırakılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Döllenmiş yumurtalara sıcaklık şoku uygulaması.

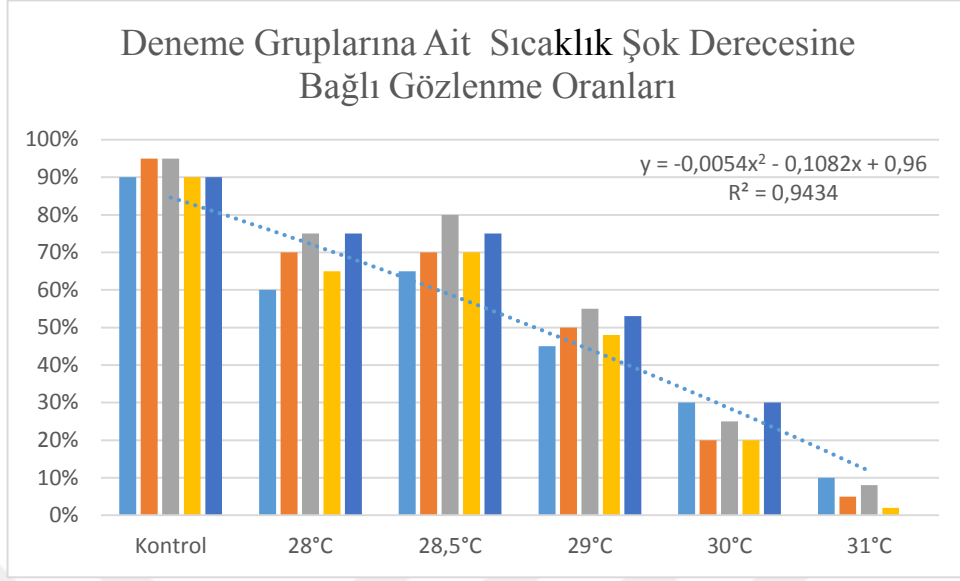
4.5 DENEY GRUPLARININ DÖLLENME, GÖZLENME VE YUMURTADAN ÇIKIŞ ORANLARI

Deneme grupları arasında embriyolojik gelişim safhaları incelendiğinde ginogenetik ile triploid grubun gelişim süreleri kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.2). Haploid grubun ise döllenme gerçekleşmesine rağmen 7.gün sonunda hayatta kalan yumurtanın kalmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: Deneme gruplarına ait embriyolojik gelişim safhaları.

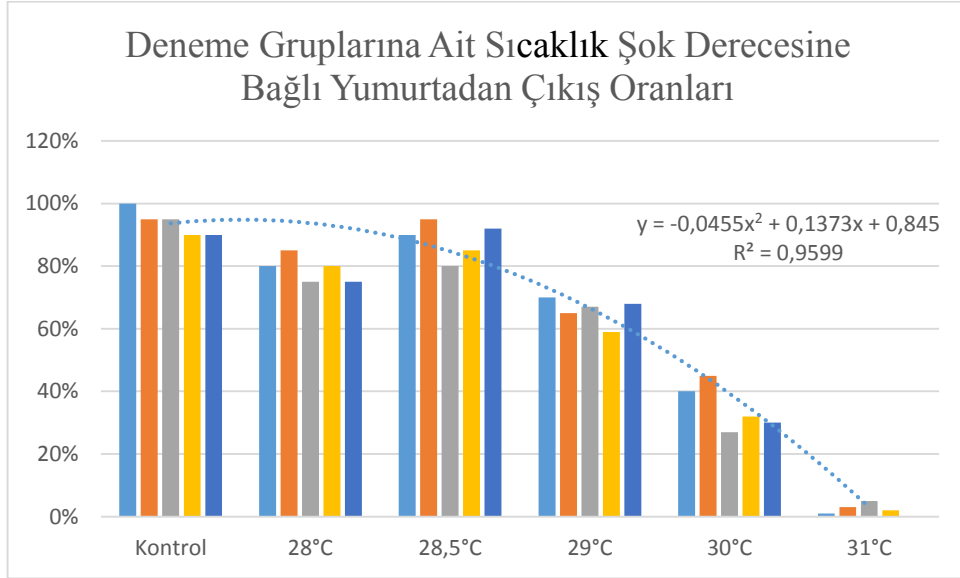
Deney Grupları	Embriyolojik Gelişim Safhaları		
	<i>Yumurtanın Bölünme Safhası</i>	<i>Gözlenme Safhası</i>	<i>Larva Çıkışı</i>
Kontrol	1-11 gün	40.gün (215 gün-derece)	70. gün (440 gün-derece)
Haploid	3-7 gün sonunda tamamı öldü.	-----	-----
Ginogenetik	1-12.gün	43. gün (230 gün-derece)	74. gün (460 gün-derece)
Triploid	1-12 gün	41. gün (221 gün-derece)	72. gün (448 gün-derece)

Deneme grupları arasında gözlenme oranlarına göre yapılan karşılaştırma sonuçlarında 28,0 ve 28,5°C’de sıcak şoku uygulanmış ginogenetik (G) grupların ortalama gözlenme oranının (%80±5) kontrol grubuna (%90±5) benzer değerde olduğu tespit edilmiştir. Sıcak şok derecesi arttıkça gözlenme oranlarında düşüş olduğu gözlemlenmiştir. 31°C’de sıcak şoku uygulanan grupta gözlenme aşamasında hayatta kalan yumurta oranı %5±4’e kadar düşmüştür (Şekil 4.6).



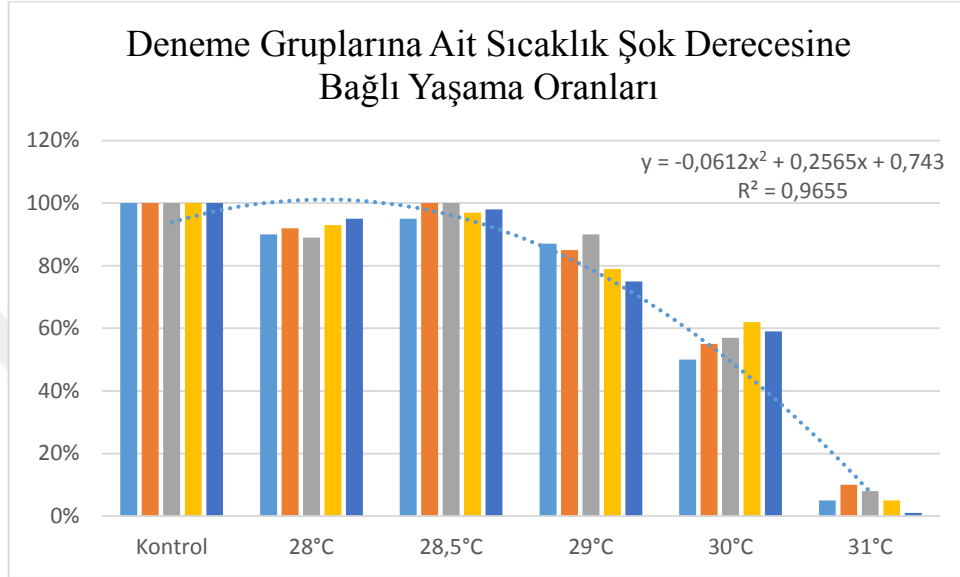
Şekil 4.6: Deneme gruplarına ait gözlenme, yumurtadan çıkış ve yaşama oranları.

Deneme gruplarına ait yumurtadan çıkış oranları incelendiğinde sıcaklık şok derecesi arttıkça yumurtadan çıkış oranında düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu oranlarına en yakın sonuçlar 28,5°C’de sıcaklık şoku uygulanan grupta elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Deneme gruplarına ait sıcaklık şoku uygulamasına bağlı yumurtadan çıkış oranları.

Deneme gruplarına ait larval yaşama oranları incelendiğinde, 28,0-28,5 ve 29,0°C’de sıcaklık şokuna maruz bırakılan gruplarda oranların kontrol grubu ile benzer olduğu, fakat sıcak şok derecesi arttıkça hayatta kalan larva oranında ciddi oranda düşüşler olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Deneme gruplarının sıcak şok uygulamasına göre yaşam oranları.

Deneme gruplarına ait UV dozu, sıcak şok derecelerine göre belirlenmiş gruplara ait döllenme, gözlenme, yumurtadan çıkış ve larval yaşama oranı verileri ayrıntılı şekilde Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Deneme gruplarında sıcaklık şoku derecesi ve süresine bağlı döllenme, gözlenme, yumurtadan çıkış ve larval yaşama oranına ait veriler

Sıcaklık Şoku Derecesi (°C)	Döllenmeden Sonraki Şok Zamanı (dk.)	Deneme Grupları	Döllenme Oranı	Gözlenme Oranı	Yumurtadan Çıkış	Larval Yaşama Oranı
28	15	Kontrol	91,08±4,25 ^a	86,53±2,5 ^a	82,20±5,25 ^a	80,56±2,33 ^a
		Haploid	99,09±0,86 ^a	0,00	0,00	0,00
		Ginogen	98,91±1,04 ^a	74,61±7,14 ^b	60,47±3,87 ^b	57,08±1,86 ^b
		Triploid	98,0±1,17 ^a	75,82±8,60 ^b	56,68±3,62 ^b	52,05±1,99 ^b
28	20	Kontrol	92,75±4,25 ^a	85,50±2,5 ^a	81,23±3,25 ^a	79,60±1,26 ^a
		Haploid	97,39±0,13 ^a	0,00	0,00	0,00
		Ginogen	98,04±1,5 ^a	72,77±6,68 ^b	49,78±3,19 ^b	47,25±4,33 ^a
		Triploid	97,74±1,75 ^a	64,96±5,8 ^b	47,01±3,23 ^b	45,10±3,55 ^a
28,5	15	Kontrol	92,50±5,50 ^a	87,88±3,75 ^a	83,48±7,65 ^a	81,81±1,25 ^a
		Haploid	98,74±0,94 ^a	0,00	0,00	0,00
		Ginogen	98,38±1,0 ^a	89,59±2,18 ^b	82,86±3,11 ^a	79,61±1,25 ^a
		Triploid	99,46±0,11 ^a	89,76±2,88 ^b	84,07±2,77 ^a	81,11±1,5 ^a
28,5	20	Kontrol	92,50±2,50 ^a	86,03±3,75 ^a	77,72±2,65 ^a	76,17±0,33 ^a
		Haploid	97,30±0,31 ^a	0,00	0,00	0,00
		Ginogen	96,76±1,85 ^a	79,83±2,41 ^a	74,02±2,23 ^a	73,65±2,50 ^a
		Triploid	95,14±1,20 ^a	76,38±2,11 ^a	72,44±2,33 ^a	72,43±2,00 ^a
29	15	Kontrol	92,67±5,0 ^a	86,03±4,41 ^a	77,72±4,75 ^a	76,17±1,52 ^a
		Haploid	97,12±0,95 ^a	0,00	0,00	0,00
		Ginogen	99,82±0,08 ^a	79,25±4,27 ^{ab}	67,01±3,27 ^{ab}	67,44±1,25 ^{ab}
		Triploid	96,43±1,33 ^a	82,68±3,82 ^{ab}	70,69±3,23 ^{ab}	70,26±1,33 ^{ab}
29	20	Kontrol	93,75±5,0 ^a	80,39±3,33 ^a	76,37±4,75 ^a	74,46±1,33 ^a
		Haploid	97,07±1,20 ^a	0,00	0,00	0,00
		Ginogen	98,51±0,64 ^a	81,37±3,77 ^a	71,15±1,81 ^{ab}	68,50±1,39 ^{ab}
		Triploid	96,05±1,07 ^a	82,01±4,43 ^a	73,33±1,33 ^{ab}	68,46±1,67 ^{ab}

*Deneme gruplarının yüzdesel değerleri ve istatistiksel farklılıkları kontrol grubuna oranlanarak hesaplanmıştır. Döllenme oranı dışında ki tüm aşamalarda döllenmeden sonraki 10. günden itibaren hayatta kalan haploid deneme grubu yumurtası olmadığından istatistiksel analize dahil edilmemiştir.

Tablo 4.3 (devam): Deneme gruplarında sıcaklık şoku derecesi ve süresine bağlı döllenme, gözlenme, yumurtadan çıkış ve larval yaşama oranına ait veriler

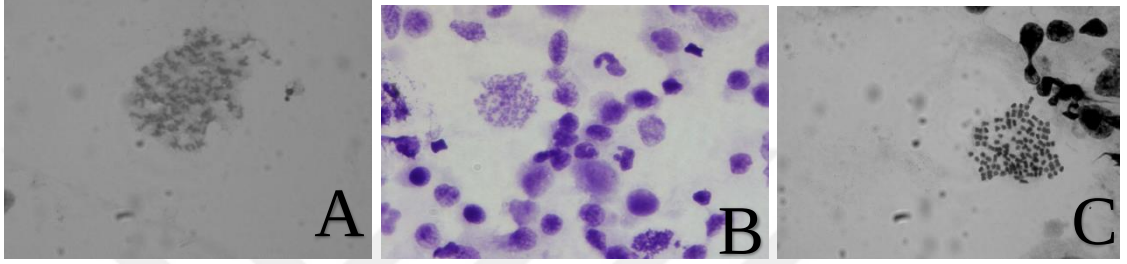
Sıcaklık Şoku Derecesi	Döllenmeden Sonraki Şok Zamanı	Deneme Grupları	Döllenme Oranı	Gözlenme Oranı	Yumurtadan Çıkış	Larval Yaşama Oranı
30	15	<i>Kontrol</i>	92,67±5,75 ^a	79,46±5,75 ^a	75,49±5,0 ^a	73,60±2,17 ^a
		<i>Haploid</i>	99,39±0,35 ^a	0,00	0,00	0,00
		<i>Ginogen</i>	98,91±0,35 ^a	37,01±7,5 ^b	15,15±5,2 ^b	13,91±1,39 ^b
		<i>Triploid</i>	99,28±0,15 ^a	43,37±6,85 ^b	16,39±6,10 ^b	16,17±1,93 ^b
30	20	<i>Kontrol</i>	93,33±5,75 ^a	88,43±5,75 ^a	79,90±5,0 ^a	78,30±2,17 ^a
		<i>Haploid</i>	97,50±0,25 ^a	0,00	0,00	0,00
		<i>Ginogen</i>	95,57±0,75 ^a	30,84±5,0 ^b	13,23±5,8 ^b	13,17±0,26 ^b
		<i>Triploid</i>	94,20±1,95 ^a	33,90±6,93 ^b	15,63±4,35 ^b	15,63±0,94 ^b
31	15	<i>Kontrol</i>	93,50±2,50 ^a	81,61±6,35 ^a	77,53±5,20 ^a	75,59±2,57 ^a
		<i>Haploid</i>	96,79±0,15 ^a	0,00	0,00	0,00
		<i>Ginogen</i>	99,02±0,75 ^a	25,52±5,75 ^a	7,76±2,61 ^c	7,13±0,24 ^b
		<i>Triploid</i>	97,68±0,75 ^a	30,50±4,75 ^a	8,32±3,91 ^b	8,20±0,94 ^b
31	20	<i>Kontrol</i>	93,75±2,50 ^a	86,39±7,5 ^b	76,37±5,20 ^a	74,46±2,57 ^a
		<i>Haploid</i>	97,42±0,35 ^a	0,00	0,00	0,00
		<i>Ginogen</i>	99,20±0,25 ^a	20,81±6,85 ^b	4,66±2,48 ^c	4,07±0,54 ^b
		<i>Triploid</i>	96,71±0,75 ^a	21,69±5,75 ^a	5,09±3,49 ^b	4,66±0,77 ^b

*Deneme gruplarının yüzdesel değerleri ve istatistiksel farklılıkları kontrol grubuna oranlanarak hesaplanmıştır. Döllenme oranı dışında ki tüm aşamalarda döllenmeden sonraki 10. günden itibaren hayatta kalan haploid deneme grubu yumurtası olmadığından istatistiksel analize dahil edilmemiştir.

Tablo 4.3’de sıcaklık şoku derecesi arttıkça larval yaşama oranında düşüş olduğu görülmektedir. Kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan bir fark belirlenmeyen 28,5°C’lik grup optimum sıcaklık şok derecesi olarak tespit edilmiştir ($P>0,05$). 28 ve 29°C’lik sıcaklık şoku uygulamalarında ise kontrol grubuna oranla deneme gruplarının daha düşük yaşama oranına sahip olduğu tespit edilmiş ve istatistiksel açıdan farklı olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Ginogen grupta en yüksek larval yaşama oranı 79,61±1,25 ile 28,5°C’lik şok uygulamasıyla elde edilirken en düşük larval yaşama oranı 4,07±0,54 ile 31°C’lik şok uygulamasıyla elde edilmiştir. Triploid grup larval yaşama oranları ginogen grupla benzerlik gösterdiği tespit edilmiş ve en yüksek yaşama oranı değeri 81,11±1,5 ile 28,5°C’de elde edilmiştir.

4.6 KARYOTİP ANALİZİ

Deneme gruplarına ait karyotip analizi sonucunda elde edilen görüntüler şekil (4.9)'de verilmiştir. Kontrol grubu (Şekil 4.9A) ve diploid ginogen gruba (Şekil 4.9B) ait kromozom sayısı $2n=80$ olarak tespit edilmiştir. Fakat triploid gruba (Şekil 4.9C) ait kromozom sayısı tam olarak tespit edilememesine rağmen diploid kromozom setinden daha fazla sayıda olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.9: Deneme gruplarına ait karyotip analizi sonuçları.

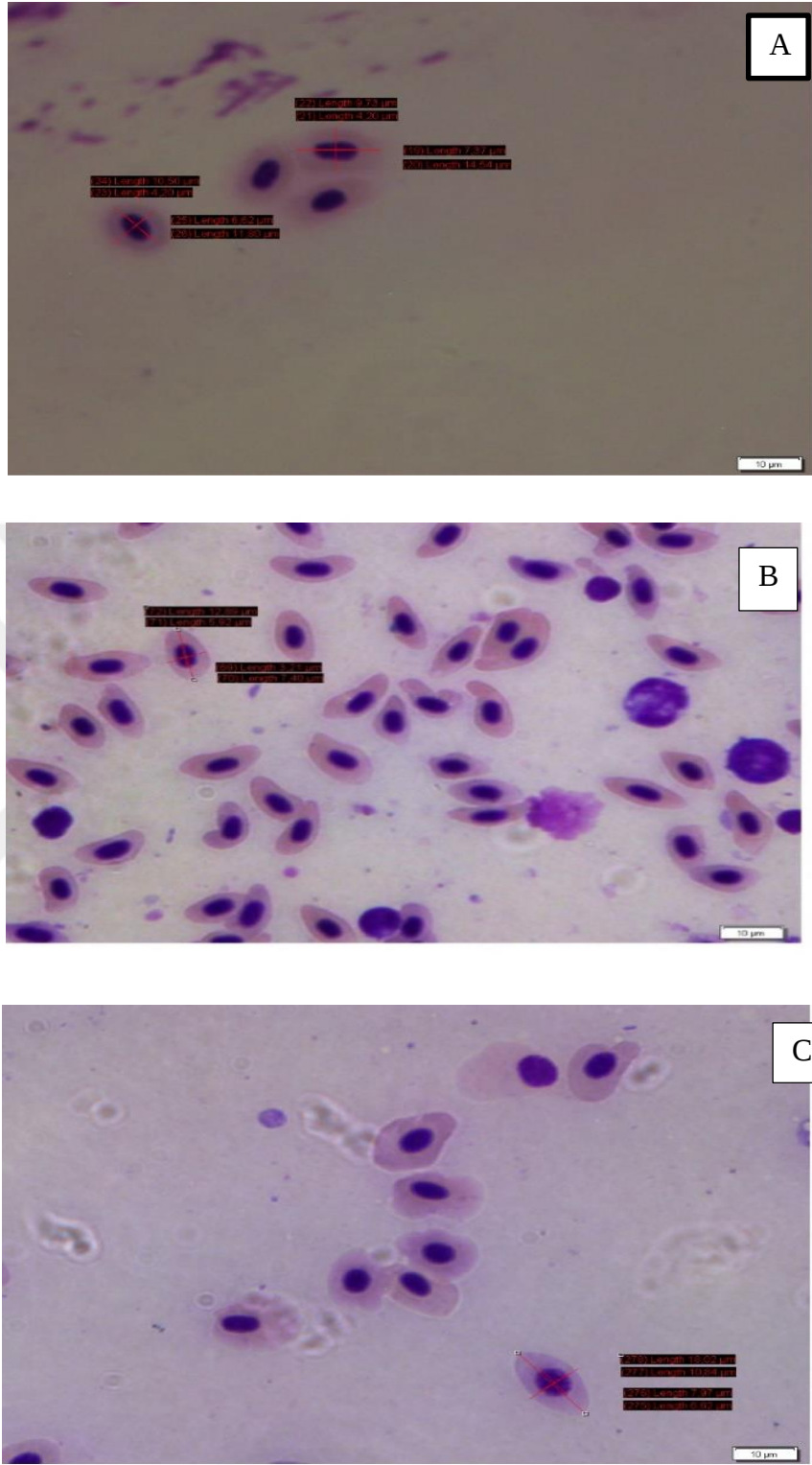
4.7 ERİTROSİT ÇAP ÖLÇÜMLERİ

Kontrol (D), ginogen (G) ve triploid (T) gruplar arasındaki farkların tespiti amacıyla her bir gruba ait kan örneklerinden eritrosit çap ölçümleri gerçekleştirilmiş ve gruplar arasındaki farklılıklar Tablo 4.4'de belirtilmiştir.

Triploid grup verileri diploid gruptan daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Eritrosit ve çekirdekle ilgili olan tüm verilerde triploid ve diploidler arasında fark önemli bulunmuştur (Şekil 4.10) ($P>0.05$).

Tablo 4.4: Diploid ginogen ve triploid bireylerde eritrosit ve çekirdeklere ait bilgiler.

	Triploid	Ginogen	Kontrol	T/D	G/D	P
Eritrosit minör aksis (µm)	11,121±1,131 ^b	7,836±0,811 ^a	7,518±0,679 ^a	1,48	1,04	<0.05
Eritrosit majör aksis (µm)	17,236±0,521 ^b	14,893±0,701 ^a	15,091±0,593 ^a	1,14	0,99	<0.05
Eritrosit yüzey alanı (µm²)	147,244±15,959 ^b	90,174±8,637 ^a	89,062±9,038 ^a	1,66	1,01	<0.05
Eritrosit hacmi (µm³)	1079,354±106,394 ^b	450,784±58,697 ^a	446,376±60,283 ^a	2,42	1,01	<0.05
Çekirdek minör aksis (µm)	5,874±0,323 ^b	4,083±0,193 ^a	4,008±0,241 ^a	1,46	1,02	<0.05
Çekirdek majör aksis (µm)	8,761±0,266 ^b	7,098±0,134 ^a	7,153±0,157 ^a	1,22	0,99	<0.05
Çekirdek yüzey alanı (µm²)	33,8297±4,169 ^b	23,297±2,437 ^a	22,505±2,394 ^a	1,51	1,03	<0.05
Çekirdek hacmi (µm³)	107,991±14,166 ^b	62,384±9,912 ^a	60,134±10,368 ^a	1,80	1,03	<0.05



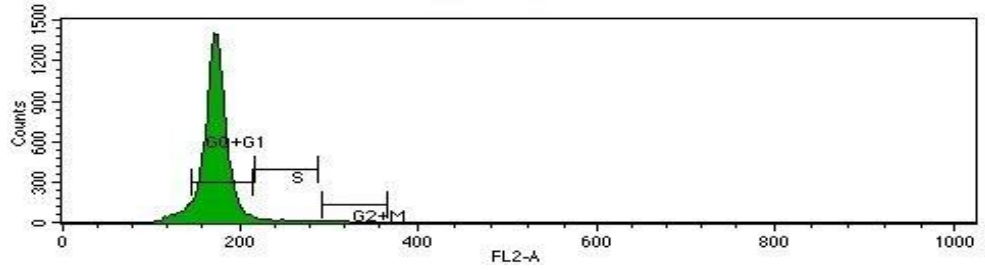
Şekil 4.10: Deney gruplarına ait eritrosit görüntüleri (A: Kontrol grubu, B: Ginogen, C: Triploid).

4.8 AKIM SİTOMETRİSİ ÖLÇÜMLERİNE AİT VERİLER

Akım sitometrisi ploidi tespiti için her bir deneme grubundaki 3 adet balıktan kan örneği alınmıştır. DNA miktar ölçümü G0+G1 sonuçlarına göre karşılaştırmalı olarak yapılmış; triploid grubun kontrol grubuna göre daha yüksek, ginogen grubun ise kontrol grubuyla benzer miktarda DNA ya sahip olduğu tespit edilmiştir. G0+G1 değerlerinin oranı hesaplandığında; G/D DNA miktar oranının 1,016638, T/D DNA miktar oranının ise 1,978029 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5-6-7) (D:Kontrol, G:Ginogen, T:Triploid).

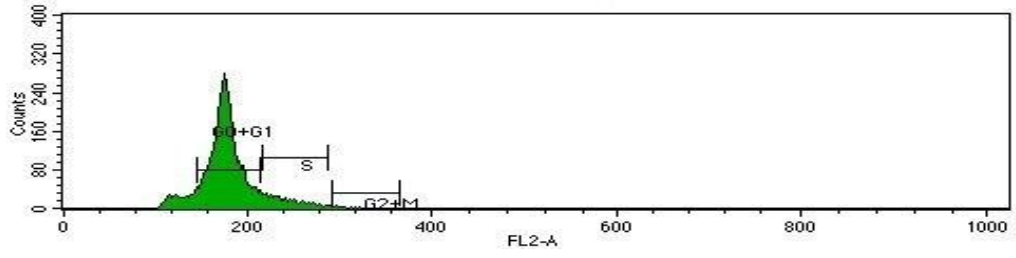
Tablo 4.5: Kontrol grubu akım sitometrisi sonuçları.

İşaretleyici	Sol, Sağ	Total %	Ortalama	CV
Hepsi	0, 1023	75,18	171,73	10,47
G0+G1	144, 213	69,96	172,50	6,88
S	215, 286	1,26	237,42	7,87
G2+M	291, 364	0,10	303,41	2,65



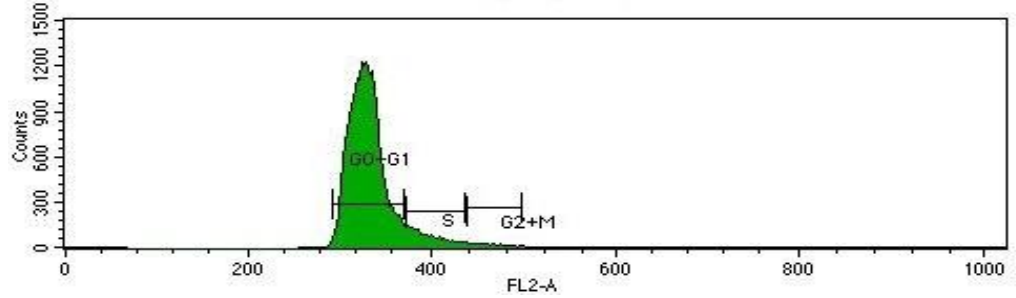
Tablo 4.6: Ginogen diploid grup akım sitometrisi sonuçları.

İşaretleyici	Sol, Sağ	Total %	Ortalama	CV
Hepsi	0, 1023	42,36	178,02	16,42
G0+G1	144, 213	34,58	175,37	8,18
S	215, 286	4,03	239,18	7,78
G2+M	291, 364	0,14	299,14	2,50



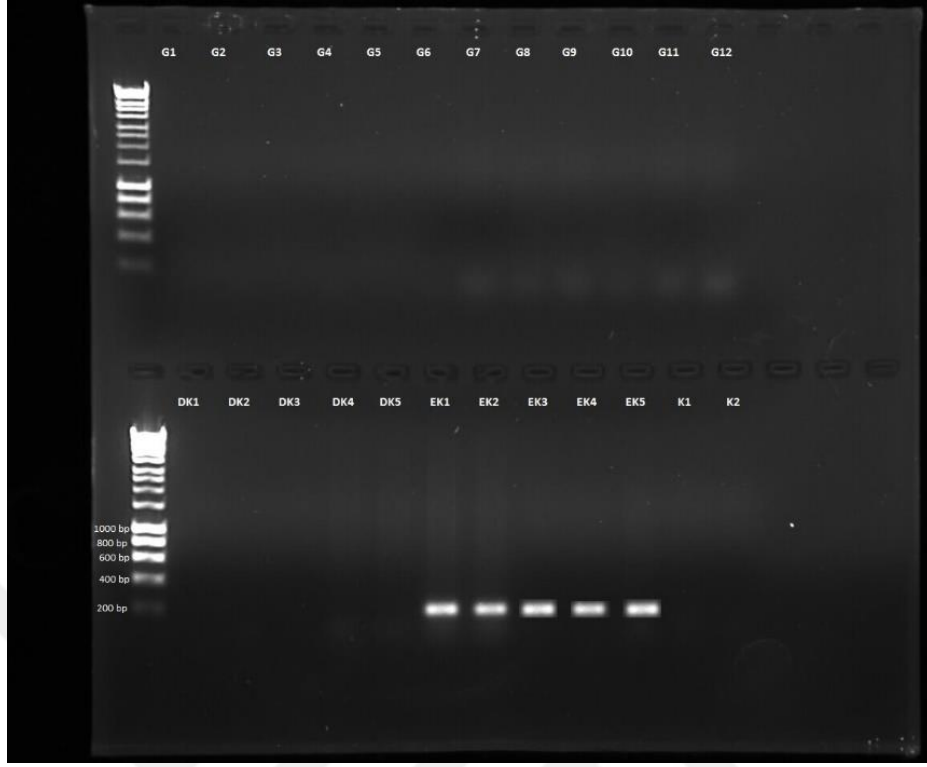
Tablo 4.7: Triploid grup akım sitometrisi sonuçları.

İşaretleyici	Sol, Sağ	Total %	Ortalama	CV
Hepsi	0, 1023	35,54	399,58	18,41
G0+G1	105, 183	32,28	341,21	11,14
S	185, 252	2,78	409,37	8,66
G2+M	249, 311	0,44	448,15	5,50



4.9 MOLEKÜLER TANI

Şekil 4.11’de yüzgeç dokularından elde DNA’dan çoğaltılan sdY geni görüntüsü verilmiştir. Olgun erkek Karadeniz alabalığından alınan yüzgeç dokusu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Ginogen diploid gruptan rastgele alınan 1-2 gr ağırlığında ki balıklar ginogenetik olup olmadıklarının tespiti için taranmıştır. Yirmi kez tekrarlanan bu taramalarda (herbir taramada rastgele seçilen toplam balık adedi=12) %100 oranında ginogenetik üretim gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Kontrol gruplarından rastgele alınan örneklerin sonuçları ise %55 dişi ve %45 erkek olarak tespit edilmiştir (G: Ginogenetik, EK: Erkek kontrol, DK: Dişi kontrol, K:Kontrol).



Şekil 4.11: Ginogenetik Karadeniz Alabalığında sdY gen tespiti.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında; mühendislik ve bilgisayar bilimlerinden yararlanarak genetik ve moleküler tekniklerin birlikte kullanımıyla suda yaşayan canlıların ıslahı, mevcut özelliklerinin değiştirilmesi veya bu canlılara yeni özellikler kazandırılması yönünde yapılan çalışmalara temel oluşturan ginogen ve androgen balık üretimi çalışmalarından ginogenetik balık üretim tekniği Karadeniz alabalığı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince spermatolojik özellikler UV uygulamasından önce ve sonra tespit edilmiştir. Sperma motilite yüzde ve sürelerinin tespiti yapıldığı gibi osmotik basınç değerleri de üreme dönemi boyunca örnek alınarak tespit edilmiştir. Ayrıca Hank's sulandırma solüsyonunun osmotik basıncındaki farklılıkların sperma motilite yüzdesi ve süresine etkisi de belirlenmiştir. Bu çalışmalar larval yaşama oranını etkileyen en önemli faktörlerden biri olan sperm kalitesi ve spermatolojik özellikleri ginogen balık üretimi süresince en iyi seviyede olması ve ginogen Karadeniz alabalıklarının yaşama oranının yükseltilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Diploid yapının sağlanması amacıyla gerçekleştirilen sıcak şok uygulamasının optimizasyonu çalışmada yumurta hücresinin en düşük seviyede fiziksel hasara maruz bırakılarak yaşama oranının en üst seviyede olması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Sperm kalitesini ölçmede; hareketli spermatozoanın yüzdesi, hareketlilik süresi, sperm konsantrasyonu, spermatokrit ve seminal plazma kompozisyonu verileri kullanılır (Billard ve diğ., 1981; Köprücü ve Gür, 1999). *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis* ve *Salmo salar* üzerine yapılan araştırmalar, bu balıklarda sperm hareketlilik süresinin mevsimlere göre değiştiğini göstermektedir. Yumurtlama mevsiminde aktif olan gökkuşağı alabalığı spermatozoaları 30-35 saniye hareketlidirler. Yumurtlama sezonu sonuna doğru hareketlilik süresi 15 saniye gibi kısa bir süreye düşer (Benau ve Turner, 1980). Ayrıca, gökkuşağı alabalıklarında yumurtlama sezonunda aktif olan spermatozoa oranı yumurtlama dönemi sonrası büyük oranda azalır (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984). Çalışmamda ise erken üreme döneminden geç üreme dönemine kadar sperm örneği alınmış ve spermatolojik özellikleri tespit edilmiştir. Elde ettiğim verilere göre erken dönemde, Eylül ayında Karadeniz alabalığı sperminin motilite yüzdesi %30-40, motilite süresi 10 saniye ve osmotik basıncı 130-140 mOsm kg⁻¹ iken üreme döneminde, Kasım-Ocak ayları arasında motilite yüzdesinin >%90, motilite süresinin 45 saniye ve osmotik basıncının 280-300 mOsm kg⁻¹ olduğu belirlenmiştir.

Chourrout (1982) dişi *Oncorhynchus kisutch* ve erkek *Salmo trutta* kullanarak ginogen balık üretim çalışması gerçekleştirmiştir. Çalışmasında sperm seminal plazmasını kullanarak 1:4 (sperm:sulandırıcı) oranında spermayı sulandırarak 1-8 dk. arası sürelerde UV ışınlamasını 20 cm mesafeden maruz bırakmıştır. Yaşama oranları incelendiğinde haploid grupta gözlenme aşamasına kadar hayatta kalan olmadığı, larval yaşama oranları incelendiğinde kontrol ve 8dk.'lık UV ışınlaması sonrası uygulanan sıcak şokla (26°C'de döllenmeden 25 dk. sonra 20 dk. süre ile) elde edilen ginogen grubun (%65-70) yüzdelerinin istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmasında ise UV ışınlaması 1:20 oranındaki sperm:sulandırıcı karışımına 20 cm mesafeden 3600 Kj/cm² enerji verilerek gerçekleştirilmiştir (>%70 motilite). Tüm deneme gruplarında haploid gruplarda gözlenme aşamasına kadar hayatta kalan embriyo olmamıştır. Mayo-ginogen grupta en yüksek larval yaşama oranı 28,5°C sıcaklık şoku uygulanan grupta %79,61±1,25 olarak tespit edilmiştir.

Refstie 'nin (1983) Atlantik somonu (*Salmo salar*) ve gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yapmış olduğu çalışmada radyasyona maruz bırakılmış sperma ile yumurtaların döllenmesini takiben sıcak şok uygulamasının ginogenetik üretim üzerine etkisini araştırmıştır. Sperma ışınlamasını 15 dakika süresince 10⁵ toplam enerji seviyesinde ⁶⁰Co ışını ile gerçekleştirmiştir. 30°C'de 10 dakika şok uygulaması sonucunda hayatta kalan larva olmamış fakat 26°C'de 20 dakika süresince sıcak şok uygulaması sonucunda ise %30-40 larval yaşam oranına sahip olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında ise en düşük sıcaklık şoku derecesi olarak 28°C kullanılmış ve 57,08±1,86'lık, 30°C'deki şok uygulamasında ise %13,91±1,39'luk larval yaşama oranı elde edilmiştir (Tablo 4.3.).

Goryczko ve diğ. (1991) gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) UV radyasyonu kullanarak ginogenetik üretim çalışmasını gerçekleştirmiştir. Dişi albino gökkuşağı alabalığını işaretleyici olarak kullanmış ve üretim metodunun başarısını tespit etmiştir. UV ışınlamasında sulandırıcı olarak sperm seminal plazmasını kullanmış (sperm:seminal plazma, 1:5) ve sperm örneklerine 20 cm mesafeden 83 µW/cm² enerjiye sahip UV lambası kullanarak uygulamıştır. Sıcak şok uygulamasını elektrikli termostatlı küvet içerisinde 28°C'de gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda larval yaşama oranının ginogen grupta %16-20 arasında olduğunu tespit etmiştir. Tez çalışmasında ise 28°C'de gerçekleştirilen sıcaklık şoku sonucunda 57,08±1,86'lık larval yaşama oranı elde edilmiştir. Kalbassi ve diğ. (2009) Aras alabalığında (*Salmo trutta caspius*) gerçekleştirdikleri triploid balık üretim çalışmasında 26, 28 ve 30°C'de sıcak şok

uygulamış ve döllenmeden 10 dk. sonra 10 ve 20 dakika süreyle 28°C’de yaptıkları uygulamada kontrol grubuna oranlayarak yaptıkları istatistiksel analiz sonucunda en yüksek larval yaşama oranını (%90) elde etmişlerdir. Tez çalışmasında ise 28°C’de gerçekleştirilen şok uygulamasıyla elde edilen triploid grupta larval yaşamı oranı $52,05 \pm 1,99$ olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde gökkuşağı alabalığında 28°C’lik şok uygulamasının larval yaşama oranını olumsuz etkilediği fakat aras alabalığı ve karadeniz alabalığında larval yaşama oranını artırdığı gözlenmiştir.

Dietrich ve diğ. (2005) gökkuşağı alabalığı spermatozoasının genetik materyalinin tahrip edilmesi ve sperm motilitesine UV ışınlamasının etkisini ölçmek amacıyla çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Sperm sulandırma oranını 1:40 olarak kullanılmış ve Billard ve Cosson’un 1992 yılında yapmış oldukları çalışmada kullandıkları sperm hareketsizleştirme solüsyonunu kullanmışlardır. UV ışınlamasını ise Goryczko ve diğ.’nin 1991 yılında yapmış oldukları çalışmadaki gibi uygulayarak sperm motilitesine etkisini tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucu olarak 0 dakikalık ve 5 dakikalık UV ışınlaması sonrası sperm motilitesinde (0.dk:%90, 5.dk:%85) istatistiksel olarak fark gözlemlememişlerdir. 5 dakikalık UV ışınlamasıyla haploid yapıyı sağlayabilmiş ve diploid ginogen grupta gözlenme oranını %37,5, yumurtadan çıkış oranını da %1-3 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise 1:20 sulandırma oranı kullanılmış ve UV ışınlaması sonrası sperm motilitesi >%70, optimum UV ışınlama dozu 3600 Kj/cm^2 olarak tespit edilmiş, gözlenme oranının ise 28,5°C’lik grupta $89,59 \pm 2,18$ olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz haploid grupta gözlenme aşamasına kadar hayatta kalan yumurta olmadığı, sonuçların Dietrich ve diğ.’nin sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Michalik ve diğ. (2015) homolog ve heterolog sperm kullanarak kahverengi alabalıklarında mito-ginogenetik üretim çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma boyunca inkübasyon su sıcaklığı 6-8°C olarak ayarlanmıştır. Sperm sulandırma oranı ve UV ışınlaması Goryczko’ya göre (1991) belirlenerek uygulanmıştır. Diploidizasyon için döllenmeden 450 dk. sonra 10.000 psi değerinde hidrostatik basınç uygulanmıştır. Kontrol grubuyla haploid grupların gözlenme aşamasında yaşama oranlarının benzer olduğu (K:%82,88-94,95, H:%87,83-84,99) mito-ginogen grubun ise düşük olduğu (MG:%37,35-37,73) tespit edilirken daha sonrasında yumurtadan çıkış aşamasına kadar haploid grubun tamamının öldüğü görülmüştür. Bu tez çalışmasında da Karadeniz alabalığında mayo-ginogenetik üretim gerçekleştirilmiş ve deneme

süresince inkübasyon su sıcaklığı 7-10°C olarak ayarlanmıştır. Çalışmamızda kontrol grubuna oranlanan haploid grup döllenme oranı değerleri Michalik ve diğ.'nin çalışmasıyla benzerlik göstermekte (>%98)dir. Fakat ginogen bireylerin yaşama oranları karşılaştırıldığında bu tez çalışmasında elde edilen en iyi gözlenme oranı (%89,59±2,18) ile Michalik ve diğ.'nin çalışması arasındaki farklılığın mitotik ginogenlerde meydana gelebilecek fiziksel deformasyon ve homolog lethal gen ile ilintili olabileceği düşünülmektedir. Larval yaşama oranları karşılaştırıldığında 12,78±2,18 ile tez çalışmasında elde edilen 79,61±1,25'lik orandan çok düşük olduğu tespit edilmiştir.

Polonis ve diğ. (2018) mitoginogen ve mayoginogen balık üretimi için dişi gökkuşağı alabalığı yumurtası ve kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) sperması kullanmışlardır. Sperm sulandırma oranını 1:40 olarak belirlemiş ve UV ışınlamasını UV-C 30W'lık lamba ile 20 cm mesafeden 11 dk. boyunca manyetik karıştırıcı kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Doğal seminal plazma ile Suni seminal plazmanın sperm sulandırıcısı olarak kullanımının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda çaprazlama yapıldığından (♀Dişi G. alabalığı X Erkek *Salmo trutta*) gözlenme aşamasında hayatta kalan embriyo olmasına rağmen serbest yüzme aşamasına gelindiğinde tüm bireylerin öldüğü tespit edilmiştir. Haploid gruplarda gözlenme aşamasına kadar çok yüksek oranda ölümle karşılaşmış ve sonrasında tamamının öldüğü tespit edilmiştir. Diploidizasyon için hidrostatik basınç 9000 psi değerinde mayoginogen balık eldesi için döllenmeden 35 dk. sonra mitoginogen üretimi için 350 dk. sonra uygulanmıştır. Çalışmamızda ise Hank's dengeli tuz solüsyonu sulandırıcı olarak 1:20 oranında kullanılmıştır. Diploidizasyon için sıcak şok döllenmeden 15 ve 20 dk. sonra uygulanmış 20. dakikada ki şok uygulamasının larval yaşama oranına daha iyi etki ettiği istatistiksel olarak ortaya konmuştur ($P<0.05$). Kontrol grubu (%61,8 ± 1,08) ve ginogen diploid (%57,8±4,38) gruplar arasında larval yaşama oranlarında fark olmadığı ($P>0.05$) tespit edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında döllenmeden 15 dk. sonra gerçekleştirilen şok uygulamasının 20 dk. sonra gerçekleştirilen şok uygulamasına göre daha iyi etki gösterdiği ve 79,61±1,25'lik larval yaşama oranının 28,5°C'lik sıcaklık şoku ile daha yüksek oranda elde edildiği belirlenmiştir.

Alabalıklarda yumurtaların gözlenme, çıkış ve larvaların ilk yüzmeye başlama süreleri salmonid türleri arasında farklılık göstermektedir. Baki ve diğ.'nin (2007) kuluçkahane kökenli Karadeniz alabalıkları için %98,04, Alp ve diğ. (2010) ise Karadeniz alabalıklarında döllenme

oranını %90,17 olarak bildirmiştir. Bu tez çalışmasında ise triploid ve diploid gruplar arasında döllenme oranı açısından bir farklılığın olmadığı diğer çalışmalarla benzer değerlerde olduğu (>%95) ortaya konulmuştur.

Crozier ve Moffett (1989), Preston (2013), Jagiello ve diğ. (2017) kahverengi alabalıklarda (*Salmo trutta*) yapmış oldukları çalışmalarda elde ettikleri sonuçlarla bu çalışmada elde edilen döllenme oranı ve larval yaşama oranlarına ait verilerin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Embriyolojik gelişim safhaları incelendiğinde bu çalışmada Karadeniz alabalığı yumurtalarının gözlenme aşamasına 220-230 gün derecede geldiği; literatür incelendiğinde Alp ve ark.'nın (2010) ve Delihasan Sonay (2013)'ın Karadeniz alabalığında elde ettiği sonuçlarla benzerlik gösterdiği (Tablo 2) tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sıcak şok uygulaması ve süresi sonuçları Crozier ve Moffett (1989) Preston (2013) ve Jagiello (2017) Kahverengi alabalıklar (*Salmo trutta*) üzerinde yapmış oldukları sıcak şok süresi ve uygulama zamanıyla karşılaştırıldığında sonuçların benzerlik gösterdiği (28°C'de %90,45±3,55) tespit edilmiştir. Crozier ve Moffet (1989), kahverengi alabalıkta 28°C'de 10 dk. süreyle döllenmeden sonra farklı dakikalarda (5,10,15,20 ve 25. dk.) yapmış olduğu çalışmasında 28°C'de 10 dk süreyle 5-15 dakikalarda en yüksek triploid oranını (%88,2-100), 20-25.dakikalarda ise en düşük triploid oranını bulmuştur. Quillet ve diğ. (1991), kahverengi alabalıklarda 28°C'de döllenmeden sonra 10-15 dakika sürelerle sıcaklık şoku uygulamasında çok fazla ölüme neden olmadan tamamı triploid popülasyon elde etmişlerdir. Çalışmamızda, 28,5°C'lik sıcaklık şoku kullanılan denemede 81,11±1,5'lik larval yaşama oranına sahip tamamı triploid bireyler elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında sıcak şok derecesine göre ayrılan deneme grupları arasında döllenme oranları karşılaştırılması istatistiksel olarak önemli bir fark gözlemlenmemiştir ($P>0.05$). Gözlenme oranları karşılaştırıldığında ise kontrol grubuna göre diploid ginogen ve triploid grupların gözlenme oranlarının düşük olduğu, farkın istatistiksel olarak olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Sıcaklık şoku dereceleri arasında gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları karşılaştırıldığında; 28,5°C'de ki şok uygulamasının 28 ve 29°C'de ki şok uygulamalarına göre daha iyi sonuç verdiği istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). 30 ve 31°C'de ki şok uygulamalarının ise diğer tüm gruplara göre gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarının istatistiksel önemli düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). 28,5°C'lik sıcaklık şoku derecesinde deneme grupları arasında larval yaşama oranları

incelendiğinde kontrol, ginogen diploid ve triploid grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$) (Tablo 10).

Siyang ve Suwen (1987) yapmış oldukları çalışmalarında *Ctenopharyngodon idellus*, *Magalobrama terminalis* türlerinde eritrosit nukleus çap ölçümünü gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında T/D eritrosit nukleus çap oranının $>1,5$ olduğunu tespit etmişlerdir. Benfey ve diğ.'nin (1984) yapmış oldukları çalışmada *Salmo salar* türünde triploid oranını belirlemek amacıyla eritrosit nukleus çap ölçüm değerlerini kullanmışlardır. Elde ettikleri verilere göre T/D oranlarının $1,38$ olduğunu tespit etmişlerdir. Garcia Abiado ve diğ.'nin (1999) yapmış oldukları dişi *Stizostedion vitreum* ve erkek *Stizostedion canadense* triploid çalışmasında, triploidi oranını eritrosit çap ölçüm değeri yardımıyla belirlemişlerdir. T/D oranının yapmış oldukları çalışmada $1,7$ olduğunu tespit etmişlerdir. Akhan ve diğ.'nın (2011), Delihasan Sonay'ın (2013) diploid ve triploid Karadeniz alabalıkları arasında yapmış oldukları eritrosit ölçüm değerleri çalışmamda yapmış olduğum ölçüm değerleriyle benzerlik göstermektedir. Sıcak şok uygulamasının başarısının ortaya konulması amacıyla yavru balıklardan alınan kan örneklerinden eritrosit ve eritrosit çekirdek çap ve hacim ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Genel olarak eritrosit çap ölçümüyle ilgili literatürler incelendiğinde T/D oranının $>1,5$ olduğu belirlenmiş ve bu çalışmamızda elde ettiğimiz T/D $>1,5$ oranıyla benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Akım sitometrisi ölçümleri ploidi seviyesinin belirlenmesi amacıyla akuakültür çalışmalarında kullanılmaktadır (Morgan ve diğ., 1993; Chilmonczyk ve Monge, 1999; Kfoury Jr ve diğ., 1999; Scharsack ve diğ., 2001). Bu tez çalışmasında da diploid ve triploid yapının tespiti amacıyla akım sitometrisi kullanılmıştır.

Propidyum iyodür (PI) kullanılarak yapılan ölçüm değerleri incelendiğinde kontrol ve diploid ginogen grupların G0+G1 değerlerinin birbiri arasındaki oranının ≈ 1 olduğu ve triploid/ginogen diploid oranının ise $>1,5$ olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5, 4.6 ve 4.7). Pierrez ve Ronot (1991) yapmış oldukları çalışmada diploid ve triploid gökkuşağı alabalığından elde ettikleri kan örneklerini akım sitometrisi yardımıyla eritrosit DNA miktar analizini gerçekleştirmişlerdir. Triploid bireylerin akım sitometrisi sonuçlarının diploid bireylere göre DNA boyutlarının farklı olduğu G0+G1 değerlerinin T/D oranının $1,5$ 'den büyük olduğunu tespit etmişlerdir.

Kahverengi alabalık, gökkuşaağı alabalığı ve diğ er balık türlerinde Ciudad ve diğ . (2002), Liu ve diğ . (2007), Preston (2013) ve Zheng ve diğ . (2017) tarafından yapılan akım sitometrisi analiz sonuçları incelendiğ inde; G0+G1 değerlerinin kontrol ve diploid ginogen gruplar arasındaki oranının ≈ 1 olduğu ve triploid/ginogen diploid oranının ise $>1,5$ olduğu, çalışmamda elde ettiğim değerlerle benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Salmonid erkeklerine spesifik sdY geni (Y-kromozom bağlantılı eşey belirleme geni) Y-kromozom tabanlı eşey belirleme geni PZR tabanlı cinsiyet belirleme çalışmalarında son yıllarda moleküler tanı metodu olarak kullanılmaktadır (Morinha ve diğ ., 2012; Vanpe ve diğ ., 2013; Yano ve diğ ., 2013). Yano ve diğ . (2012), Angles D'Auriac ve diğ . (2014) ve Quemere ve diğ . (2014)'nın yapmış oldukları çalışmalar incelendiğ inde jel içerisinde çalışmada kullanılan balık örneklerinden kit yardımıyla elde edilen genomik (gDNA) ya da complementer (cDNA)  rneklerinde sdY gen varlığı ya da yokluğunun tespiti gerçekleştirilmiş ve çalışmalarında uygulamış oldukları bu metod sayesinde dişi balık oranını erken yaşta ve doğru bir şekilde tespit edebilmişlerdir.

Bu  alışmalar incelendiğ inde Yano ve diğ . (2012), Angles D'Auriac ve diğ . (2014) kullanmış oldukları primer setlerinin baz uzunlukları farklılık gösterdiği görülmektedir. Tez çalışmasında ise Quemere'nin (2014) kullanmış olduğu sdY primer çiftinin aynısı kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca çalışmada yeni sdY geni primer setleri dizayn edilerek sonuçlar incelenmiştir. Elde edilen verilere göre sdY-1 ve sdY-2 primer setlerinden benzer sonuçlar elde edilirken sdY-3 primer setinde bant oluşumu ger ekleşmediğ inden gen tespiti yapılamamıştır. Çalışmamda dizayn edilen bu 2 yeni primer'in etkin bir şekilde sdY geni taramalarında kullanılabileceği gösterilmiştir.

Sonuç olarak; ginogenetik karadeniz alabalığı üretimi aşamalarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında, Karadeniz alabalığının spermatolojik özelliklerinin mevsimsel değişimi belirlenmiş, uygun sperm sulandırma solüsyonu ve oranı tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, yüksek yaşama oranına sahip mayoginogenetik Karadeniz alabalığı üretimi için uygun spermatozoa UV ışınlama şiddeti ve süresi optimize edilmiştir. Daha sonrada, genomik DNA'sı UV ile tahrip edilmiş sperma ile döllenen yumurtalarda diploid yapıyı korumak veya normal spermle döllenen yumurtalarda triploid yapıyı sağlamak üzere 2.kutup cisimciğinin ayrılmasını engelleyecek sıcaklık şokunun optimal derecesi, uygulama zamanı ve süresi belirlenmiştir. Ayrıca eritrosit çap ölçümü, karyotip analizi, akım sitometrisi ile DNA

miktar ölçümü yapılmış ve deneme balıklarının ploidi seviyeleri başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra salmonidlere özgü erkeklik geni, *sDY* kullanılarak mitogenetik Karadeniz alabalığı uygulamalarımızın başarısı larval aşamadaki balıkların genetik cinsiyet oranları üzerinden güvenilir bir şekilde doğrulanmıştır. Dahası, çalışmamızda cinsiyetin *sDY*, erkeklik geni üzerinden moleküler tespitinde kullanılabilir 2 yeni primer seti geliştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen sonuçların ileride tamamı dişi ginogenetik Karadeniz alabalık popülasyonları kullanılarak yürütülebilecek ve Karadeniz alabalığının yetiştiriciliğine pozitif katkıda bulunabilecek hastalıklara karşı dirençli soy üretimi, gen haritalaması ve tespiti gibi çalışmaların dizayn edilebileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abuín, M., Clably, C., Martínez, P., 1996, A NOR-associated repetitive element present in the genome of two *Salmo* species (*Salmo salar* and *Salmo trutta*). *Genome* 39: 671-679
- Artieri, C. G., Mitchell, L. A., Ng, S. H., 2006, "Identification of the sex-determining locus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) on chromosome", 2. *Cytogenet. Genome Res.*, 112 (1-2): 152-159.
- Akhan, S., Delihasan Sonay, F., Okumus, İ., Köse, Ö.&Yandi, I., 2011, "Inter-specific hybridization between Black Sea trout (*Salmo labrax* Pallas, 1814) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)". *Aquaculture Research*, 2011, 42, 1632^1638.
- Aksungur, N., Çakmak, E., Aksungur, M., Başçınar, N., Kurtoğlu, İ.Z., Firidin, Ş., Çavdar, Y. ve Zengin, B., 2009, Karadeniz Alabalığında Yavru ve Filetoluk Büyütme Çalışmaları, Doğal Alabalık Çalıştayı: Sürdürülebilir Yetiştiricilik, Koruma ve Balıklandırma, Ekim, Trabzon, Bildiriler Kitabı, 106-112.
- Alavi, S.M., Cosson, J., 2006, Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol Int.*;30(1):1-14.
- Aldridge, F. J., R. Q. Marston & J. V. Shireman, 1990, Induced triploids and tetraploids in bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*, verified by multiembryo cytoflowrimetric analysis. *Aquaculture* 87: 121–131.
- Allen, Jr. S. K., 1983, Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317–328.
- Allendorf, R.W., Seeb, J.E., Knudsen, K.L., Thorgaard, G.H., Leary, R.F., 1986, Gene-centromere mapping of 25 loci in rainbow trout. *J. Heredity* 77:307-312.
- Alp, A., Erer, M., Kamalak, A., 2010, Eggs Incubation, Early Development and Growth in Frys of Brown Trout (*Salmo trutta macrostigma*) and Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 10:387-394.
- Amanze, D., Iyengar, A., 1990, The Micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization, *Development*, 109, 495.
- Anglès d'Auriac M.B., Urke, H.A., Kristensen, T., 2014, A rapid qPCR method for genetic sex identification of *Salmo salar* and *Salmo trutta* including simultaneous elucidation of interspecies hybrid paternity by high-resolution melt analysis. *J. Fish Biol.*, 84(6):1971-7. doi: 10.1111/jfb.12401.
- Anonim, 2018, *Fishbase veri tabanı, Balık taksonomisi* <https://www.fishbase.de/summary/FamilySummary.php?ID=76>. [Ziyaret tarihi: 11.05.2018]

- Arai, K., 1984, Developmental genetic studies on salmonids: morphogenesis, isozyme phenotypes and chromosomes in hybrid embryos. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 31: 1–94.
- Arai, K., 1986, Effect of allotriploidization on development of the hybrids between female chum salmon and male brook trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52: 823–829.
- Arai, K., Wilkins, N., 1987, Triploidization of Brown trout (*Salmo trutta*) by heat shock, *Aquaculture*, 64, 97-103.
- Arai, K. 2001, Genetic improvement of aquaculture fin fish species by chromosome manipulation techniques in Japan, *Aquaculture*, 197, 205.
- Aras, M.S., Çetinkaya, O., Karataş, M., 1997, Anadolu Alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*, Dum., 1858)'in Türkiye'deki Bugünkü Durumu, Akdeniz Balıkçılık Kongresi, Nisan, İzmir, Bildiri Kitabı, 605-611.
- Arslan, T., Phelps, P., Osbourne, A., 2009, Effects of oestradiol-17 β or 17A-methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Aquaculture Research*, 40 (16), 1813-1822.
- Arslan, T., Güven, E., Baltacı, M.A., 2010, Hormonal cinsiyet dönüşümü metodu kullanılarak monoseks gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 16:361-368.
- Arslan, T., Erdoğan, F., Erdoğan, M., 2012, Fonksiyonel erkekleştirilmiş gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 18:227-234.
- Atmaca, S., 2017, *Gökkuşağı Alabalığında (Oncorhynchus mykiss) Germ Hücre İzolasyonu Üzerine Bir Çalışma*. Yüksek Lisans Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bachtrog, D., Mank, J.E., Peichel, C.L., Kirkpatrick, M., Otto, S.P., Ashman, T.L., Hahn, M.W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., Vamosi, J.C., 2014, Tree of Sex Consortium. *PLoS Biol.* 1;12(7):e1001899. doi:10.1371/journal.pbio.1001899.
- Bagenal, T. B., 1969, Relationship between Egg Size and Fry Survival in Brown Trout *Salmo trutta* L.. *Journal of Fish Biology*, 1: 349–353. doi:10.1111/j.1095-8649.1969.tb03882.x
- Baki, H., Çakmak, E., Baki, B., Altuntaş, C., 2015, III.Nesil (F3) Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1814) anaç ağırlığı ve kuluçka verimi ilişkisi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(7):550-555.
- Baksi, M., Means, J.C., 1988, Preparation of chromosomes from early stages of fish for cytogenetic analysis. *J. Fish Biol.* 32: 321–325.
- Bar, W., Hummel, K., 1991, DNA fingergrinting: its applications in forensic casework. pp.349-355 in T.Burke ve diğ., eds, *DNA fingerprinting: approaches and applications*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.

- Başçınar, N., Sonay, F.D., 2009, Balıklarda Biyoteknolojik Uygulamalar ve Hibridasyon, Doğal Alabalık Çalıştay: Sürdürülebilir Yetiştiricilik, Koruma ve Balıklandırma, Ekim, Trabzon, Çalıştay Bildiri Kitabı, 67-76.
- Beaumont, A.R., Hoare, K., 2003, *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*, Blackwell Science, 0-632-05515-4.
- Benau, D., Turner, C. 1980, Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Res*, 3, 247- 257.
- Bencsik I., Pacala N., Caprita R., Dronca D., Dumitrescu G., Bencsik-Theilen A., Caraba V. and Petculescu-Ciochina L., 2011, Diploid gynogenesis induced by heat shock after activation with UV-irradiated sperm in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Science and Bio.*, 44(1).
- Benfey, T.J., Sutterlin, A.M., Thompson, R.J., 1984, Use of erythrocyte measurements to identify triploid salmonids. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 41: 980–984.
- Bhise, M., Khan, T. 2002, Androgenesis: The best tool for manipulation of fish genome. 26 Turk I zooloji 317-325.
- Bilgin,B., 2004, Düzce ili ve Çevresindeki Gökkuşuğu Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Üretim Tesislerindeki Balıklarda Kromozom Farklılıklarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- Billard, R., Bry, C., Gillet, C., 1981, Stress, environment and reproduction in teleost fish.
- Billard, R., Cosson, M.P., 1992, Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261 (2), 122-131.
- Blaxhall, P.C., 1975, Fish chromosome techniques—a review of selected literature. *Journal of Fish Biology*, 7: 315-320. doi:[10.1111/j.1095-8649.1975.tb04605.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04605.x)
- Blazquez, M., Piferrer, F., 2004, Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell. Endocrinol.*, 219: 83-94.
- Bouvet, J., 1976, Enveloping layer and periderm of the trout embryo (*Salmo trutta fario* L.) 20U. *Cell Tissue Res.*;170(3):367-82. PubMed PMID: 954062.
- Bowles, J., Schepers, G., Koopman, P., 2000, Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol.*, 15;227(2):239-55.
- Bozkurt, Y., Yavas, İ., 2013, Preliminary Study on Hybridization of Brown Trout (*Salmo trutta macrostigma*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Cryopreserved Sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, IJA_66.2014.958, 6 pages.

- Braat, A.K., Speksnijder, J.E., Zivkovic, D., 1999, Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol.* 43(7):745-60.
- Bromage, N. R.; Roberts, R. J., 1995, Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 424.
- Bullock, A.M., 1978, Laboratory Methods in Fish Pathology, Ed. By Roberts R.J., Bailliere Tindall, London.
- Burke, T., Bruford, M.W., 1987, DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327:149-152.
- Burke, T., Davies, N.B., Bruford, M.W., Hatchwell, B.J., 1989, Parental care mating behavior of polyandrous dunnocks *Primella modularis* relating to paternity by DNA fingerprintin. *Nature*, 249-338.
- Burke, T., Hanotte, O., Bruford, M.W., Cairns, E., 1991, In: DNA fingerprinting approaches and applications (eds. T. Burke, G. Dolf, A.J. Jeffrey ve R. Wolff), p.154. Birkhauser Verlag, Basel.
- Burns, E. R., J. F. Anson, W. G. Hinson, J. L. Pipkin, M.G. Kieve ve R. C. Goetz, 1986, Effect of fixation with formalin on flow cytometric measurement of DNA in nucleated blood cells. *Aquaculture* 55: 149–155.
- Büyükhatoğlu, S., Holtz, W., 1984, Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 37(1):63-71. DOI: 10.1016/0044-8486(84)90044-9
- Bye, V.J., R.F.Lincoln., 1986, Comercial methods for the control of sexual maturation in Rainbow trout. *Aquaculture*, 57:299-300.
- Cal, R.M., Vidal, S., Camacho, T., Piferrer, F., Guitian, F.J., 2005, Effect of triploidy on turbot haematology. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part A, 141. p. 35-41.
- Can, A., 2014, *Kök Hücre*, Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara.
- Carrillo, M., S. Zanuy, M. Blázquez, J. Ramos, F. Piferrer, E.M. Donaldson, 1993, Sex control and ploidy manipulation in sea bass, p. 512. in International Conference of Aquaculture 1993, EAS Spec. Publ. 19.
- Carter, R.E., Mair, G.C., Skibinski, D.O.F., Parkin, D.T., Beardmore, J.A., 1991, The application of DNA fingerprinting in the analaysis of gynogenesis in tilapia. *Aquaculture*, 95: 41-52.
- Caputo, V., Giovanott, M., Nisi Cerioni, P., Splendiani, A., Olmo, E., 2009, Chromosomal study of native and hatchery trouts from Italy (*Salmo trutta* complex, Salmonidae): conventional and FISH analysis. *Cytogenet Genome Res.*, 124:51–62. doi: 10.1159/000200088.
- Cassani, J.R., Caton, W.E., 1986a, Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture*, 55, 43–50.

- Castelli, M., 1994, Study on sex determination in the common barbel (*Barbus barbus* L.) (Pisces, Cyprinidae) using gynogenesis, p.509-519. In A.R. Beaumont (ed.) *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London. 539 p.
- Castro, J., Rodriguez, S., Padro, B.G., Sanchez, L., Martinez, P., 2001, Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.) *Heredity*, 86:291–302. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00834.x.
- Chai, C., Chan, W.K., 2000, Developmental expression of a novel *Ftz-F1* homologue, *ff1b* (NR5A4), in the zebrafish (*Danio rerio*). *Mech. Dev.*, 91: 421-426.
- Chaiton, J.A., Allen, S.K., 1985, Early detection of triploidy in the larvae of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, by flow cytometry. *Aquaculture*, 48(1), 35-43.
- Chen, R., Lou, B., Xu, D., Zhan, W., Takeuchi, Y., Yang, F., 2017, Induction of meiotic gynogenesis in yellow drum (*Nibea albiflora*, Sciaenidae) using heterologous sperm and evidence for female homogametic sex determination. *Aquaculture*, 479:667-674.
- Cherfas, N.B., Kozinsky, O., Rothbard, S., Hulata, G., 1990, Induced diploid gynogenesis and triploidy in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. 1. Experiments on the timing of temperature shock. *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh*, 42, 3–9.
- Chevassus, B., R. Guyomard, D. Chourrout, E. Quillet, 1983, Production of viable hybrids in salmonids by triploidization. *Genet. Sci. Evol.*, 15: 519–532.
- Chiang, E. F., Pai, C. I., Wyatt, M., Yan, Y. L., Postlethwait, J., Chung, B., 2001, Two *sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.*, 231: 149-163.
- Chilmonczyk, S., Monge, D., 1999, Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish and Shellfish Immunology* 9:319-333.
- Chourrout, D., 1980, Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Develop.*, 20(3 A), 727-733.
- Chourrout, D., 1982, Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm. *J. Exp. Zool.*, 223: 175-181. doi:[10.1002/jez.1402230209](https://doi.org/10.1002/jez.1402230209).
- Chourrout, D., 1984, Pressure induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36, 111–126.
- Chourrout, D., 1986, Techniques of chromosome manipulation in rainbow trout: a new evaluation with karyology. *Theoretical and Applied Genetics*, 72: 627-632.
- Chourrout, D., Quillet, E., 1982, Induced Gynogenesis in the Rainbow Trout: Sex and Survival of Progenies Production of All-Triploid Populations, *Theoretical and Applied Genetics*, 63:201-205.

- Ciudad, J., Cid, E., Velasco, A., Lara, J.M., Aijon, J., Orfa, A., 2002, Flow cytometry measurement of the DNA contents of G0/G1 diploid cells from three different teleost fish species. *Cytometry*. 48:20–25. doi: 10.1002/cyto.10100.
- Civelek, R.O., 2012, Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811) Larvalarının Düşük Tuzluluklarda Besin Kesesi Tüketimi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Colihueque, N., P. Iturra, N. Diaz, A. Veloso, and F. Estay, 1992, Karyological analysis and identification of heterochromosomes in experimental gynogenetic offsprings of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Rev. Brasil Genet.*, 15:535-546.
- Colihueque, N., Iturra, P., Diaz., N.F. ve Veloso, A., 1996, Further evidence of chromosome abnormalities in normal and haploid gynogenetic progenies of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.*, 276, 70-75.
- Colombo, L., Barbaro, A., Libertini, A., Benedetti, P., Francescon, A., Lombardo, I., 1995, Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.. *J. Appl. Ichthyol.*, 11: 118–125.
- Crandell, P.A., Matsuoka, M.P., Smoker, W.W., 1995, Effects of timing of stripping and female on the viability of gynogenetic and non-gynogenetic diploid pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Aquaculture*, 137(1-4):109-119.
- Croizer, W.W., Moffett, I.J.J., 1989, Experimental Production of Triploid Brown Trout, *Salmo trutta* L., Using Heat Shock. *Aquaculture and Fisheries Management*, 20, 343-353.
- Crozier, W.W., Moffett, I.J.J., 1989, Application of an electrophoretically detectable genetic marker to ploidy in brown trout (*Salmo trutta* L.) triploid used by heatshock. *Aquaculture*, 80: 231–239.
- Cruea, D. D., 1969, Some Chemical and Physical Characteristics of Fish Sperm, Transactions of the American Fisheries Society, 98:4, 785-788, DOI: 10.1577/1548-8659(1969)98[785:SCAPCO]2.0.CO;2.
- Culling F.A. 1963. Handbook of Histopathological Techniques, second edition, London, 553 pp.
- Çakmak, E., Aksungur, N., Firidin, Ş., Çavdar, Y., Kurtoğlu, İ.Z., 2005, Doğal ve Kuluçkahane Kökenli Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*, PALLAS 1811) Anaçlarında Üreme Özelliklerinin İrdelenmesi. Ulusal Su Günleri, 28-30 Eylül 2005, Trabzon.
- Çakmak, E., Kurtoğlu, İ. Z., Çavdar, Y., Firidin, Ş., Aksungur, N., Başçınar, N., Esenbuğa, H., Zengin, B., 2008, Karadeniz Alabalığının Yetiştiriciliği ve Balıklandırma Amacıyla Kullanımı, Proje Sonuç Raporu. (TAGEM/HAYSÜD /2001/ 07/ 01/ 20) Trabzon. 128 s.
- Çakmak, E., 2009. Karadeniz Alabalığı Konusunda Yürütülen Proje Çalışmaları Tanıtımı. Doğal Alabalık Çalıştayı: Sürdürülebilir Yetiştiricilik, Koruma ve Balıklandırma, Ekim, Trabzon, Bildiriler Kitabı, 5-9.

- Çelikkale, M.S., 2002, İçsu Balıkları Yetiştiriciliği, I, 3. Baskı, K.T.Ü. Basımevi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Yayını, No:2, 195 s., Trabzon.
- Çiftçi, Y., Eroğlu, O., Firidin, Ş., Erteken, A. ve Okumuş, İ., 2009, Ülkemizde kahverengi alabalıkların genetik dağılımı. Doğal Alabalık Çalıştayı, Ekim, Trabzon, 19-30.
- Dahm, R., Geisler, R., ve Nusslein, C., 2005, Zebrafish (*Danio rerio*) Genome and Genetic, Robert A. Meyers, encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine, 2nd Edition, vol 15. , *Volhard Max Planck Institute for Development Biology*, Tübingen, Germany.
- Dawley, R. M., R. J. Schultz, K. A. Goddard, 1987, Clonal reproduction and polyploidy in unisexual hybrids of *Phoxinus eos* and *Phoxinus neogaeus* (Pisces: Cyprinidae). *Copeia* 1987: 275–283.
- Davis, J. M., 2002, Basic Cell Culture (Practical Approach), ISBN-0199638535.
- Degani, G., 1985, The Influence of 17 Methyltestosterone on body composition of Eels *Anguilla anguilla*, *Aquaculture* 50, 23-30.
- Delihasan, S., Triploid Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811) Üretimi ve Büyüme Potansiyeli ve Et Kalitesinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Şubat, 2013.
- Demers, S., Davis, K., Cucci, T.L., 1989, A Flow Cytometric Approach to Assessing the Environmental and Physiological Status of Phytoplankton. *Cytometry*, 10, 644-652.
- Deng, G. Y., Chen, L., Wang, X., Oshiro T., 2001, Sex reversal and gonadal development of triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Zoologica Sinica*, 47,1,71-78.
- Deng, Y., Oshiro, T., Higaki, S., Takashima, F., 1992, Survival, growth and morphometric characteristics in diploid and triploid hybrids of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Suisan Zoshoku* 40, 121–129 in Japanese with English summary.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I. 1993, Sturgeon fishes, developmental biology and aquaculture, *Springer-Verlag*, Berlin.
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002, Sex Determination and Sex Differentiation in Fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208:191-364.
- Dietrich, G.J., Szpyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L., Ciereszko, A., 2005, Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8):1809-22.
- Diter, A., Quillet, E., Chourrout, D., 1993, Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 42, 777-786.

- Don, J. R., Avtalion, R.R., 1988a, Comparative study on the induction of triploidy in tilapias using cold and heat shock techniques. *J. Fish. Biol.* 32: 665–672.
- Don, J.R., Avtalion, R.R., 1988b, Production of viable tetraploid tilapias using cold shock technique. *Israel J. Aquacult.* 40: 17–21.
- Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1982, Sex Control in Fish with Particular Reference to salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 39, No. 1 : pp. 99-110.
- Doyle, R.W., Talbot, A.E., 1986, Effective population size and selection in variable aquaculture stocks. *Aquaculture*, 57:27-35.
- Dube, P., Blanc, J.M., Chouinard, M., Noüe, J., 1991, Triploidy induced by heat shock in brook trout (*Salvelinus fontinalis*), *Aquaculture*, 92, 305-311.
- Dunham, R.A., 2004, Gynogenesis, Androgenesis, Cloned population and nuclear transplantation, aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic Approaches, Section 4, 54-64.
- Dunnington, E.A., O. Gal, Y. Plotsky, A. Haberfeld, T. Kirk, A. Golberg, U. Lavi, A. Cahaner, P.B. Siegel, J. Hillel, 1990, DNA Fingerprints of Chickens Selected for high and low body weight for 31 Generations. *Animal Genetics* 21:247-257.
- Eenennaam, A.L.V., Eenennaam, J.P.V., Medrano, J.F. ve Doroshov, S.I., 1996. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in White sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture* 147: 177-189.
- Ekici A., Yamaner G., "Effect of Different Concentration of NaCl as an activation solution on motility of black sea Trout (*Salmo trutta labrax*) sperm", 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, PORTEKIZ, 17-20.09.2013
- Ekici, A., 2007, Döllenmiş zebra balığı (*Danio rerio*) yumurtalarına gen (gfp) transferi üzerinde bir araştırma, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ekici, A., 2011, Sazan Balıklarında Islah Çalışmaları, Sazan Balığı Üretim Tekniği, Edt. TİMUR, M., İstanbul Üniversitesi Yayını, 978-975-404-892-6.
- Ekici, A., Aktopraklıgil, D., Timur, M., Akkoç, T., Bağış, H., 2010, The Effect Of Linear Versus Circular Vector On Enhanced Green Fluorescent Protein (Egfp) Expression In Transgenic Zebrafish (*Danio rerio*), *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol.9(8), pp.1232-1236.
- Ekici A., Baran A., Yamaner G., Özdaş Ö.B., Sandal A.İ., Güven E., Baltacı M.A., 2012, Effects Of Adding Different Doses Of Taurine On Freezing To Glucose-Based Extender Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Semen, *Journal of Biotechnology&Biotechnological Biotechnology Equipment*, vol.26, pp.3113-3115.
- Ekmath, A.E., Doyle, R.W., 1990, Effective population size and rate of inbreeding in aquaculture of Indian major carps. *Aquaculture*, 85: 293-305.

- Erbaş, H.İ., Başçınar, N., 2013, Yemleme Sıklığının Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811)'nın Sperm ve Yumurta Kalitesine Etkisinin Belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6(1):11-16.
- FAO, 2013, Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013 Summary information Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013 reports.
- Felice, D.D., Rash, E.M., 1969, Chronology of spermatogenesis and spermiogenesis in poeciliid fishes. *J. Exp. Zool.*, 171:191-208.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Martínez, G., Ramos, J., Piferrer, F., 1997, Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 152. p. 287-298.
- Felip, A., Piferrer, F., Carrillo, M., Zanuy, S., 2001a, Comparative growth performance between diploid and triploid sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over the first four spawning seasons. *J. Fish Biology*, 58. p. 76-88.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001b, Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 111. p. 175-195.
- Felip A. (ed.), Carrillo M. (ed.), Herráez M.P. (ed.), Zanuy S. (ed.), Basurco B. (ed.), 2009, Protocol K - Erythrocyte measurements [Practical guide of protocols: methods of verification of the ploidy]. *Advances in fish reproduction and their application to broodstock management: a practical manual for sea bass*. Zaragoza : CIHEAM / CSIC-IATS, p. 71-74 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 63)
- Fiajshans, M., Rab, P., Dobosz, S., 1992, Frequency analysis of active NORs in nuclei of artificially induced triploid fish. *Theor. appl. Genet.* 85: 68–72.
- Firidin, Ş., Çakmak, E., Aksungur, N., 2012, Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1811)'nın Embriyonal Gelişiminin İncelenmesi. *Yunus Araştırma Bülteni*, (2):7-16.
- Galay-Burgos, M., Llewellyn, L., Mylonas, C.C., Canario, A.V., Zanuy, S., Sweeney, G.E., 2004, Analysis of the Sox gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 137:279-284
- Galbreath, P.F., Samples, B.L., 2000, Optimization of thermal shock protocols for induction of triploidy in brook trout. *North American Journal of Aquaculture* 62, 249–259.
- Galbusera, P., Volckaert, F.A.M., Ollevier, F., 2000, Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation, *Aquaculture* 185: 25-42.
- Garcia-Abidao, M., Dabrowski, K., Christensen, J., Czesny, S., Bajer, P., 1999, Use of Erythrocyte Measurements to Identify Triploid Saugeyes. *North American Journal of Aquaculture*, 61:4, 319-325.

- Gasparini, C., Peretti, A. ve Pilastro, A., 2009. Effects of mating opportunities on sperm allocation in guppies (*Poecilia reticulata*), *Biol. Lett.*, doi: 0413.
- Geldiay, R., 1968, Kazdağı Silsilesi Derelerinde Yaşayan Alabalık (*Salmo trutta* L.) Populasyonları Hakkında, VI. Milli Türk Biyoloji Kongresi Tebliğler, 65-77.
- Geldiay, R., Balık, S., 1996, Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No:46. Ders Kitabı. Dizin No:16, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- George, T., Pandian, T.J., Kavumpurath, S., 1994, Inviability of YY Zygotes of the Fighting Fish, *Betta splendens*. *The Israeli Journal of Aquaculture– Bamidgheh* 42(1), 3-9.
- German Poloe, A., Richard Denniston, S., Reggio, C., Robert Godke, A. ve Tiersch Terrence, R., 2001, Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by introplasmic sperm injection, *Biology of Reproduction*, 65, 961-966.
- Gomelsky, B., Cherfas, N.B., Gissis, A., Hulata, G., 1998, Induced diploid gynogenesis in white bass. *Prog. Fish Cult.* 60: 288–292.
- Gorshkov, S., Gorshkova, G., Hadani, A., Gordin, H., Knibb, W., 1998, Chromosome set manipulations and hybridization experiments in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Isr. J. Aqua.* Bamidgheh 50 (3): 99–110.
- Goryczko, K., Dobozy, S., Makinen, T., Tomasik, L., 1991, UVirradiation of rainbow trout sperm as a practical method for induced gynogenesis, *J. Appl. Ichthyol.* 7, 136-146.
- Grier, H.J. ve Taylor, R.G., 1998, Testicular maturation and regression in the common snook. *J. Fish Biol.*, 53:512-542.
- Gürgün, V., Halkman, A. K., 1990, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği, yayın no:7.
- Hallerman, E.M., Beckman, J.S., 1988, DNA-level polymorphism as a tool in fisheries science. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science*, 45: 1075-1087.
- Halm, S., Martinez-Rodriguez, G., Rodr'iguez, L., Prat, F., Mylonas, C., C., Carrillo, M., 2004, Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER α , ER β 1 and ER β 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 223: 63-75.
- Halm, S., Rocha, A., Miura, T., Prat, F., Zanuy, S., 2007, Anti- Mullerian hormone (AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene*, 388: 148-158.
- Han, H.S., Mannen, H., Tsujimura, A., Taniguchi, N., 1992, Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(11): 2027-2031.
- Hofsten, J. V., Olsson, P., 2005, Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2005, 3: 63.

- Hollebecq, M.G., Chambeyron, F., Chourrout, D., 1988, Triploid common carp produced by heat shock. In: *Reproduction in Fish. Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. Colloque no. 44, *Institute National de Recherches Agronomiques*, Paris, France, pp. 207–212.
- Howell, B.R., S.M. Baynes, D. Thompson, 1995, Progress towards the identification of the sex-determining mechanism of the sole, *Solea solea* (L.), by the induction of diploid gynogenesis. *Aqua. Res.* 26: 135–140.
- Hsu, H. J., Lin, G., Chung, B.C., 2003, Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros: differential control by *wt1* and *ff1b*. *Development*, 130: 2107–2116.
- Ihssen, P.E., McKay, L.R., McMillan, I., Phillips, R.B., 1990, Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: Cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 119. p. 698–717.
- Jagiello K, Zalewski T, Dobosz S, Michalik O, Ocalewicz K., 2017, High Rate of Deformed Larvae among Gynogenetic Brown Trout (*Salmo trutta m. fario*) Doubled Haploids. *Biomed Res Int.*;2017:2975187. doi: 10.1155/2017/2975187.
- Jamieson, B.G.M., 1991, *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*, Cambridge University Press.
- Jeffrey, A.J, Wilson, V., Thein, S.L., Weatherall, D.J., Ponder, B.A., 1986, DNA “fingerprints” and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *American Journal of Human Genetics*, 39:111–24.
- Jiang, Y., 1993, Transgenic fish - gene transfer to increase disease and cold resistance. *Aquaculture*, 111:31–40.
- Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R., Dong, Q., 2009, Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm, *Aquaculture* 290 165–171.
- Johnson, O. W., P. R. Rabinovitch, F. M. Utter, 1984, Comparison of the reliability of a Coulter counter with a flow cytometer in determining ploidy levels in Pacific salmon. *Aquaculture* 43: 99–103.
- Johnson, K.R., Wright, J.E. Jr., 1986, Female brown trout x Atlantic salmon hybrids produce gynogens and triploids when backcrossed to male Atlantic salmon. *Aquaculture* 57:345–358.
- Johnson, K.R., Wright, L.E. Jr., 1987, Linkage relationships reflecting ancestral tetraploidy in salmonid fish. *Genetics* 116:579–591.
- Johnstone, R., 1991, *Production and performance of triploid Atlantic Salmon in Scotland*. In: V.A. Pepper [ed.], *Proceedings of the atlantic canada workshop on methods for the production of non-maturing salmonids*: February 19–21, 1991.
- Johnstone, R., 1992, *Production and Performance of Triploid Atlantic Salmon in Scotland*. *Scottish Aquaculture Research Report*, Number 2, ISSN 0964 9484.

- Johnstone, R., R. F. Lincoln, 1986, Ploidy estimation using erythrocytes from formalin fixed salmonid try. *Aquaculture* 55: 141–148.
- Jonas, G. Wilson-Leedy, Rolf, L.I., 2007, Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters, *Theriogenology*, vol. 67, 3, 661-672.
- Jungalwalla, P.J., 1991, Production of nonmaturing Atlantic Salmon in Tasmania. In: V.A. Pepper [ed.], Proceedings of the atlantic canada workshop on methods for the production of non-maturing salmonids: February 19-21, Dartmouth, Nova Scotia.
- Kaastrup, P., Hørlyck, V., 1987, Development of a simple method to optimize the conditions for producing gynogenetic offspring, using albino rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, females as an indicator for gynogenesis, *Journal of Fish Biology* (1987), 31 (Supplement A), 29-33.
- Kalbassi, M.R., Dorafshan, S., Pourkazemi, M., Amiri, B.M., 2009, Triploidy Induction in the Caspian Salmon, *Salmo trutta caspius*, by Heat Shock, *Journal of Applied Ichthyology*, 25, 104-107.
- Karami, A., Eghtesadi A.P., Syed, M.A., 2015, Chromosome preparation in fish: effects of fish species and larval age. *Int. Aquat. Res.*, 7: 201, <https://doi.org/10.1007/s40071-015-0104-z>.
- Karayücel, İ., Genetic studies on sex determination and coluration in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). PhD thesis, Institute of Aquaculture University of Stirling, Scotland, UK. May, 1999.
- Karayücel, İ., Karayücel, S., 2000, *Balıklarda kromozom manipülasyon teknikleri: Androgenesis ve Ginogenesis.*, O.M.Ü. Sinop Su Ürünleri Fakültesi.
- Karayücel, İ., Karayücel, S., Bircan, R. 2001, Tek eşeyli veya steril balık üretim metotları. *Türkiye Su Ürünleri Dergisi*, 2, 17-19.
- Karayücel, İ., Karayücel, S., Penman, D., McAndrew, B., 2002, Production of androgenetic Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. : Optimisation of heat shock duration and its application time to induce diploid androgenesis. *Israel Journal of Aquaculture. Bamidgeh*. 54(4): 145-156.
- Kavumpurath, S., T. J. Pandian, 1990, Induction of triploidy in the zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton). *Aquacult. Fish. Mgmt* 21: 299–306.
- Kavumpurath, S., T.J. Pandian, 1992, The development of all-male sterile triploid fighting fish (*Betta splendens* regan) by integrating hormonal sex reversal of broodstock and chromosome-set manipulation. *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh* 44(4): 111–119.
- Kavumpurath, S., T.J. Pandian, 1994, Induction of Heterozygous and homozygous diploid gynogenesis in *Betta splendens* (Regan) using hydrostatic pressure. *Aquaculture Fisheries Mgmt*, 25:133-142.

- Kenanoğlu, O., Yılmaz, S., Ergün, S., Akı, C., 2013, A Preliminary Study on the Determination of Triploidy by Chromosome Analysis at the Different Stages of Development in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Marine Science and Technology Bulletin*, 2 (2), 17-21.
- Kerby, J.H., Harell, R.M., 1990, *Hybridization, genetic manipulation, and gene pool conservation of striped bass*, p.159-190. In R.M. Harell, J.H. Kerby and R.V. Minton [Eds.], *Culture and Propagation of Striped Bass and Its Hybrids*. Striped Bass Committee Southern Division American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Kfoury Jr, J.R., Kuroda, A., Nakaysu, C., Fukuda, H., Okamoto, N., 1999, Analysis of rainbow trout peripheral blood leukocytes separated by flow cytometry cell sorting. *Fish Pathology*, 34:1-6.
- Klüver, N., 2007, Differential expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) and anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the teleost Medaka. *Dev. Dyn.*, 236, 271-281.
- Kocabaş, M., 2009, Türkiye Doğal Alabalık (*Salmo trutta*) Ekotiplerinin Kültür Şartlarında Büyüme Performansı ve Morfolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Komen, H., Thorgaard, G., 2007, Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review, *Aquaculture*, 369 150-173.
- Komen, J., Bongers, A.B.J., Richter, C.J.J., van Muiswinkel, W.B., Huisman, E.A., 1990a, Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). II: The production of homozygous gynogenetics clones and and F1 hybrids. *Aquaculture* 92: 127–142.
- Komen, J., P. J. M. van den Dohblesteen, W. J. Slierendrecht ve W. B. van Muiswinkel, 1990b, Skin grafting in gynogenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). The development of histocompatible clones. *Transplantation* 49: 788–793.
- Kondo, M., Froschauer, A., Kitano, A., 2002, Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene*, 295: 213-222.
- Köprücü, K., Gür, S., 1999, Gökkuşığı Alabalığı *Oncorhynchus mykiss* W'nın Sperma ve Yumurta Kalitesinin Dölverimi Üzerine Etkisi. Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 9(1-2),81-86.
- Krisfalusi, M., Cloud, J.G., 1996, Effects of exogenous 17 β -estradiol on early growth and gonadal development of diploid and triploid female rainbow trout, *Developmental Genetics*. 19, 302-308.
- Krisfalusi, M., Wheeler, P., Thorgaard, G.H., Cloud, J.G., 2000, Gonadal Morphology of Female Diploid Gynogenetic and Triploid Rainbow Trout, *Journal of Experimental Zoology*, 286:505-512.

- Kudo, S., 1980, Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Development Growth Diff.*, 22, 403.
- Kurita, J. , Oshiro, T. , Takashima, F. and Sakaizumi, M., 1995, Cytogenetic studies on diploid and triploid oogenesis in interspecific hybrid fish between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *J. Exp. Zool.*, 273: 234-241. doi:10.1002/jez.1402730308
- Kusunoki, T., Arai, K., Suzuki, R., 1994, Production of viable gynogens without chromosome duplication in the spinous loach *Cobitis biwae*. *Aquaculture*, 119(1):11-23.
- Lecommandeur, D., Haffray, P., Philippe, L., 1994, Rapid flow cytometry method for ploidy determination in salmonid eggs. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 345-350.
- Lincoln, B., Bye, V.J., 1989, Genetic techniques for the commercial control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.), *Aquaculture*, A Biotechnology in Progress.
- Linhart, O., Kvasnicka, P., Flajshans, M., Kasal, A., Rab, P., Palecek, J., Slechta, V., Hamackova, J., Prokes, M., 1995, Genetic studies with tench, *Tinca tinca* L.: Induced meiotic gynogenesis and sex reversal. *Aquaculture*, 132(3-4):239-251.
- Liu, S.J, Qin, Q.B., Xiao, J., Lu, W.T., Shen, J.M., Li, W., 2007, The formation of the polyploid hybrids from different subfamily fish crossings and its evolutionary significance, *Genetics*, 176, pp. 1023-1034.
- Lone , K.P., Ridha, M.T., 1993, Sex Reversal and Growth of *Oreochromis spilurus* (Günther) in Brackish and Sea Water by Feding 17- α -methyltestosterone. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24, 593-602.
- Lou, Y.D., Purdom, C.E., 1984, Polyploidy induced hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 25, 345–357.
- Lubieniecki K.P., Lin S., Cabana E.I., Li J., Lai Y.Y., Davidson W.S., 2015, Genomic Instability of the Sex-Determining Locus in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *G3 (Bethesda)*, 5(11):2513-22. doi: 10.1534/g3.115.020115.
- Lutz, C.G., 2001, Practical genetics for aquaculture. Blackwell Publishing ISBN 0-85238-285-5.
- Malison, J.A., Kayes, T.B., Held, J.A., Barry, T.B., Andamundson, C.H., 1993, Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock, and spermatozoa inactivation. *Aquaculture*, 110, 229-242.
- Manickam, P., 1991, Triploidy induced by cold shock in the Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.), *Aquaculture*, 94:377-379.
- Manning, A.J., Crim, L.W., 2000, The induction of triploidy in the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (Storer). In: *Reproductive Physiology of Fish 2000*. Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen, Bergen, Norway.

- Manolakou, P., Lavranos, G., Angelopoulou, R., 2006, Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 4: 59.
- Manti, A., Papa, S., Boi, P., 2015, What Flow Cytometry Can Tell Us About Marine Micro-Organisms Current Status and Future Applications Department of Earth, Life and Environmental Sciences, University of Urbino “Carlo Bo”, Italy, <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/37421.pdf>.
- Martinez, P., Vinas, A.M., Sanchez, L., Diaz, N., Ribas, L., Piferrer, F., 2014, Genetic architecture of sex determination in fish: applications to sex ratio control in aquaculture. *Frontiers in Genetics*, 5:340.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., 2002, DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 30, 559–563. doi:10.1038/nature751
- McCarter, N.H., 1988, Verification of the production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with hydrostatic pressure. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 22, 501–505.
- Michalik, O., Dobosz, S., Zalewski, T., Sapota, M., Ocalewicz, K., 2015, Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the Brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus 1758). *Reprod Domest Anim.*, 50(2):256-262. doi: 10.1111/rda.12480.
- Millot, S., Péan, S., Labbé, L., Kerneis, T., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Bégout, M.L., 2014, Assessment of genetic variability of fish personality traits using rainbow trout isogenic lines. *Behav Genet.* Jul;44(4):383-93. doi:10.1007/s10519-014-9652-z.
- Miura, T., Miura, C., Konda, Y., Yamauchi, K., 2002, Spermatogenesis preventing substance in Japanese eel. *Development*, 129: 2689-2697.
- Moran, P., Martinez, J.L., Garcia-Vazquez, E., Pendas, A.M., 1996, Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Cytogenet Cell Genet., 75:145–150. doi: 10.1159/000134466.
- Morgan, J.A.W., Pottinger, T.G., Rippon, P., 1993, Evaluation of flow cytometry as a method for quantification of circulating blood cell populations in salmonid fish. *Journal of Fish Biology* 42:131-141.
- Morinha, F., Cabral, J.A., Bastos, E., 2012, Molecular sexing of birds: a comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology* 78(4):703–714
- Nagoya, H., Okamoto, H., Nakayama, I., Araki, K., Onozato, H., 1996, Production of androgenetic diploids in amago salmon, *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fisheries Science*, 62: 380-383.
- Nagy, A., Rajki, K., Horváth, I., Csányi, V., 1978, Investigation on carp, *Cyprinus carpio* L. gynogenesis. *Journal of Fish Biology*, 13:215-224.

- Ninua, L., Tarkhnishvili, D., Gvazava, E., 2018, Phylogeography and taxonomic status of trout and salmon from the Ponto-Caspian drainages, with inferences on European Brown Trout evolution and taxonomy. *Ecology and Evolution*, vol:8, issue:5.
- Okumuş, İ., 2002, Rainbow Trout Broodstock Management and Seed Production in Turkey: Present Practices, Constraints and the Future. *Turkish J. Fisheries and Aquatic Sciences*, 2: 41-56.
- Okumuş, İ., Kurtoğlu, İ.Z. ve Atasaral, Ş., 2004, General Overview of Turkish Sea Trout (*Salmo trutta* L.) Populations, In:Harris, G. and Milner, N. (eds.), *Sea Trout: Biology, Conservation and Management*, 115-126.
- Onozato, H., 1984, Diploidization of Gynogenetically Activated Salmonid Eggs Using Hydrostatic Pressure, *Aquaculture*, 43:91-97.
- Opperman, K., 1953, Die Entwicklung von Forelleneiern nach Befruchtung mit radiumbestrahlten Samenfäden. *Arch. mikroskop. Anat.*, 83, abt. II (H. Iu4):141–89.
- Oral, M., 2017, “Insights Into Isogenic Clonal Fish Line Development Using High-Throughput Sequencing Technologies”, UNIVERSITY OF STIRLING Institute of Aquaculture Genetics and Reproduction, Ocak, 2017.
- Oshiro, T., Deng, Y., Higaki, S., Takashima, F., 1991, Growth and survival of diploid and triploid hybrids of masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 1851–1857 In Japanese with English summary .
- Ottera, H., Thorsen, A., Peruzzi, S., Dahle, G., Hansen, T., Karlsen, O., 2011, Induction of meiotic gynogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*) , *Journal of Applied Ichthyology* vol. 27, issue 6 , 1298-1302.
- Overturf, K., 2009, *Molecular Research in Aquaculture* (p. 395). Iowa 50014-8300, USA: Wiley-Blackwell.
- Özdemir, H., Artaç, H., 2013, Akım sitometri ve temel özellikleri. *Selçuk Pediatri*, 1(1), 12-15.
- Özdemir, R.C., Ekici, A., 2017, Different Heat Shock Application Effect on Gynogenetic Production of Zebrafish (*Danio rerio*). *Fish. Aqua. J.*, 8:2. DOI: 10.4172/2150-3508.1000196.
- Özden, O., Güllü, K., 1996, Experiments on sexual revision using hormones in cultured fish, *E.Ü.Su Ürünleri Dergisi*, Cilt 13, No.1-2, 199-210.
- Özden, O., Güner, Y., Kızak, V., 2003, *Tatlı Su Balık Kültüründe Uygulanan Bazı Biyoteknolojik Yöntemler*. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 20, 3-4, 563-574.
- Palti, Y., Li, J.J., Thorgaard, G.H., 1997, Improved efficiency of heat and pressure shocks for producing gynogenetic rainbow trout. *Progressive Fish-Culturist* 59, 1–13.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998, Ploidy Induction and Sex Control in Fish. *Hydrobiologia*, 384(1):167-243.

- Paschos, I., Natsis, L., Nathanailides, C., Kagalou, I., Kolettas, E., 2001, Induction of gynogenesis and androgenesis in Goldfish, *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 195-198.
- Penman Dj, Piferrer F., 2008, Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev. Fish. Sci.*, 16(S1):16-14. doi:10.1080/10641260802324610.
- Pelegri, F., Schulte-Merker, S., 1999, Gynogenesis-Based Screen for Maternal-Effect Genes in the Zebrafish, *Danio rerio*, in: Detrich, H.W., Westerfield, M., Zon, L.I. (Eds.) *The Zebrafish: Genetics and Genomics*, Methods in Cell Biology Series, Vol. 60, Academic Press, San Diego, CA, p.1-20.
- Peruzzi, S., Scott, A. G., Domaniewski, J. C., Warner, G. F., 1993, Initiation of gynogenesis in *Oreochromis niloticus* following heterologous fertilization. *Journal of Fish Biology*, 43: 585-591. doi:[10.1111/j.1095-8649.1993.tb00441.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1993.tb00441.x)
- Peruzzi, S., Chatain, B., 2000, Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* 189: 23-37.
- Peruzzi, S., Kettunen, A., Primicerio, R., Kauric, G., 2007, Thermal Shock Induction of Triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.).
- Phillips, R. B., Zajicek, K.D., Ihssen, P.E. Johnson, O., 1986, Application of silver staining to the identification of triploid fish cells. *Aquaculture* 54: 313-319.
- Phillips, R. B., Pleyte, K.A., Ihssen, E., 1989, Patterns of chromosomal nucleolar organizer region (NOR) variation in fishes of the genus *Salvelinus*. *Copeia* 1: 47-53.
- Pierrez, J., Ronot, X., 1991, Use of Diploid and Triploid Trout Erythrocytes as Internal Standards in Flow Cytometry. *Cytometry*, 12:275-278.
- Piferrer, F., Benfey, T. J., Donaldson, E. M., 1994, Gonadal Morphology of normal and sex-reversed triploid and gynogenetic diploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish Biol.* 45, 541-553.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L., Martínez, P., 2000, Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. *Aquaculture* 188: 79-90.
- Polonis, M., Fujimoto, T., Dobosz, S., Zalewski, T., Ocalewicz, K., 2018, Genome incompatibility between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea trout (*Salmo trutta*) and induction of the interspecies gynogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 5991-5997
- Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., Bozzolla, P., Penman, D.J., Migaud, H., 2013, Optimisation of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 414-415:160-166, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.034>.
- Purdom, C.E., 1968, Radiation-Induced Gynogenesis and Androgenesis in Fish, *HEREDITY*, London, 24, 431-444.

- Purdom, C.E., 1983, Genetic engineering by the manipulation of chromosomes, *Aquaculture*, 33, 287.
- Purdom, C.E., 1993, Genetics and Fish Breeding. Chapman & Hall, Fish and Fisheries Series 8.
- Purdom, C.E., Thompson, D., Lou, Y.D., 1985, Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, by the suppression of meiotic and mitotic metaphase, *Journal of Fish Biology*, Volume 27, 73-79.
- Quemere, E., Perrier, C., Besnard, A.L., Evanno, G., Bagliniere, J.L., Guigen, Y., Launey, S., 2014, An improved PCR-based method for faster sex determination in Brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Conservation Genet. Resour. DOI: 10.1007/s12686-014-0259-8.
- Quillet, E., Garcia, P., Guyomard, R., 1991, Analysis of the production of all homozygous lines rainbow trout by gynogenesis, *Journal of Experimental Zoology*, 257: 367-374.
- Quillet, E., Chevassus, B., Devaux, A., 1988, Timing and duration of hatching in gynogenetic, triploid, tetraploid, and hybrid progenies in rainbow trout, *Génét. Sé. Evol.*, 1988, 20 (2), 199-210.
- Rabanal, R., H., 1988, History of Aquaculture, ASEAN/UNDP/FAO Regional Small-Scale Coastal Fisheries Development Project, Manila, Philippines.
- Reed, K.M., Phillips, R.B., 1995a, Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma*, 104:242-251.
- Reed, K.M., Phillips, R.B., 1995b, Molecular cytogenetic analysis of the double CMA3 chromosome in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenetic and Cell Genetics*, 70:104-107.
- Refstie, T., Stoss, J., Donaldson, E.M., 1982, Production of all female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by diploid gynogenesis using irradiated sperm and cold shock. *Aquaculture*, 29:67-82.
- Refstie, T., 1983, Induction of diploid gynogenesis in Atlantic salmon and rainbow trout using irradiated sperm and heat shock. *Canadian Journal of Zoology*, Vol. 61, Number 11, pages 2411-2416.
- Refstie, T., 1984, Production of sterile (triploid) salmonids. *Norsk Fiskeoppdrett* 9, 40-41.
- Rodriguez-Mari, A., Yan, Y. L., Bremiller, R. A., Wilson, C., Canestro, C., Postlethwait, J. H., 2005, Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Mullerian hormone (*Amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene Expr. Patterns*, 5, 655-667.
- Rongyan, J., Changjiang, H., Chenglian, B., Robert, T., 2009, Optimization of activation, collection, dilution, and storage method for zebrafish sperm, *Aquaculture* 290, 165-171.

- Rothbard, S., 1994, Cloning of *Nishiki-Goi*, Japanese Ornamental (koi) Carp. *The Israeli Journal of Aquaculture* – Bamidgeh 46(4), 1994, 171-181.
- Rothbard, S., Rubinstein, I., David, L., 1999, Ploidy Manipulations Aimed to Produce Androgenetic Japanese Ornamental (KOI) Carp, *Cyprinus carpio* L., *The Israeli Journal of Aquaculture* – Bamidgeh 51(1), 26-39.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004, The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234:1-4, 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>.
- Savaş, E., 2001, Diskus balıklarında (*Symphysodon spp.*) larval gelişim ve gelişme üzerine etkili faktörler, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Scharsack, J.P., Steinhagen, D., Leibold, W., Rabe, U., Korting, W., Schuberth, H.J., 2001, Flow cytometric analysis of mitogen-induced activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 48:331-339.
- Schartl, M., 2004, Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 14: 634-641.
- Scott, G., 2008, Molecular characterization and sex-specific tissue expression of estrogen receptor α (*esr1*), estrogen receptor β (*esr2a*) and ovarian aromatase (*cyp19a1a*) in yellow perch (*Perca flavescens*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 149: 126-147.
- Seeb, J.E., Seeb, L.W., 1986, Gene mapping of isozyme loci in chum salmon. *J. Heredity* 77:399-402.
- Shapiro, H.M., 2003, Practical Flow Cytometry. 4th Edition, Wiley-Liss, New York.
- Shelton, C.J., MacDonald, A.G., Johnstone, R., 1986, Induction of triploidy in rainbow trout using nitrous oxide. *Aquaculture* 58, 155–159.
- Shen, X., Cui, J., Yang, G., Gong Q., Gu Q., 2007, Expression Detection of *DMRTs* and Two *sox9* Genes in *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Vertebrata). *J. Ocean Univ. China* (Oceanic and Coastal Sea Research) 6 (2): 182-186.
- Sheperd, J., Bromage, N., 1990, *Intensive Fish Farming*. Oxford, BSP Professional Books.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990, A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
- Siyang, L., Suwen, L., 1987, On the Erythrocyte Nucleus Size and DNA Contents of *Ctenopharyngodon idellus*, *Megalobrama terminalis* and F, Hybrid. *Acta Genetica Sinica*, 14: 142-148.

- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., Sinclair, A.H., 2009, The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261):267-71. doi: 10.1038/nature08298.
- Sola, L., Bressanello, S.P., Suresh, A.V., 1999, Better Growth in All-Female Diploid and Triploid Rainbow Trout, *Transactions of The American Fisheries Society*, 128, 491-498.
- Solar, I.I., Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1984, Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture* 42, 57-67.
- Stanley, J.G., Jones, J.B., 1976, Morphology of androgenetic and gynogenetic grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *J. Fish Biol.* 9: 523-528.
- Stevenson, J.P., 1987, Trout Farming Manual, Second Editions, Fishing New Books, England.
- Stiglec, R., Ezaz, T., Graves, J.A.M., 2007, A new look at the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 117:103-109.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Krauber, D., Singer, F., 1981, Production of clones of homozygous diploid zebrafish, *Nature*, 291, 293.
- Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Popovic, N.T., 2003, Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), *Vet. Med.-Czech*, 48, 2003 (8):215-219.
- Sugama, K., Taniguchi, N., Seki, S., Nabeshima, H., Hasegawa, Y., 1990, Gynogenetic diploid production in the red sea bream using UV-irradiated sperm of black sea bream and heat shock. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1427-1433.
- Sutterlin, A.M., Holder, J., Benfey, T.J., 1987, Early survival rates and subsequent morphological abnormalities in landlocked, anadromous and hybrid (landlocked anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* 64, 157-164.
- Suzuki, R., Oshiro, T., Nakanishi, T., 1985, Survival, growth and fertility of gynogenetic diploids induced in the cyprinid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture*, 48:45-55.
- Şahin, T., 2003, Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Biyoteknoloji, SUMAE Yunus Bülteni, 3, 1, 2-5.
- Tabakoğlu, Ş.F., 2005, *Hipofiz Uygulanmış ve Uygulanmamış Farklı Boy Gruplarına Ait Aynalı Sazan (Cyprinus carpio) 'ların Sperm Kalitelerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tabata, K., 1991, Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57 (5): 845-850.

- Tabll, A., İsmail, H., 2011, The Use of Flow Cytometric DNA Ploidy Analysis of Liver Biopsies in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinom. *Liver Biopsy*: CC BY-NC-SA 3.0 license.
- Takagi, M., Taniguchi, N., Yamasaki, M. ve Tsujimura, A., 1995, Identification of clones induced by chromosome manipulation in ayu *Plecoglossus altivelis* by DNA fingerprinting with RI and non-RI labelled probes. *Fisheries Science*, 61(6): 909-914.
- Taniguchi, N., Han, H.S., Tsujimura, A., 1994, Variation in some quantitative traits of clones produced by chromosome manipulation in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture* 120: 53-60.
- Tave, D., 1986, Genetics for Fish Hatchery Managers. The AVI publishing company, 11.
- Taylor, S.C., 2009, Flow Cytometric Enumeration of the Blood Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and New Zealand Freshwater Crayfish (*Paranephrops planifrons*) (Thesis, Master of Science (MSc)). The University of Waikato, Hamilton, New Zealand. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10289/4572>
- Teskeredzic, E., Donaldson, E.M., 1993, Comparison of hydrostatic pressure and thermal shocks to induce triploidy in Coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*), *Aquaculture*, 117, 47-55.
- Thititananuki, S., Vejaratpimol, R., Pewnim, T., Fast, A.W., 1996, Ethidium bromide nuclear staining and fluorescence microscopy: An alternative method for triploidy detection in fish. *J. World Aqua. Soc.*, 27, 2. p. 213-217
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J., Utter, F.M., 1982, Triploid Rainbow Trout Identified by Flow Cytometry. *Aquaculture*, 29:305-309.
- Thorgaard, G.H., 1983, Chromosome set manipulation and sex control in fish, *Fish physiology*, vol. 9 B. Academic Press, New York, 405-434.
- Thoorgaard, G.H., 1995, Biotechnological approaches to broodstock management, in *Broodstock management and egg and larval quality*, Blackwell Science, Oxford, 76.
- Thorgaard, G.H., Disney, J.E., 1990, Chromosome preparation and analysis, in *Methods for Fish Biology*, edited by C.B. Schreck & P.B. Moyle. Bethesda, Maryland, USA. Am. Fish. Soc. 6: 171-190.
- Timur, M., 2011, *Balık Fizyolojisi*, Nobel Yayınevi, Nobel Basım Evi, 978-591-943- 0, 2. basım.
- Timur, M., Ekici, A., 2009, *Balık Islahı*, Nobel Yayın Dağıtım, Nobel Basım Evi, 978-605-395-200-8.
- Turan, C., 2000, *Applications of Biotechnology in Aquaculture*, (in turkish). IV. Su Ürünleri Sempozyumu, 28-30 Haziran 2000, Erzurum.

- Turgut, T., 2011, İnsan pnömonisinin hayvan modelleri, Göğüs hastalıklarında in vivo ve in vitro araştırma yöntemleri, AVES Yayıncılık, ADA Ofset Matbaacılık Tic. Ltd. Şti., 304.
- TUİK, 2017, Türkiye İstatistik Kurumu, *Su Ürünleri İstatistikleri*, T.C. Başbakanlık, TUİK, Ankara.
- Ueno, K., 1984, Induction of triploid carp and their haematological characteristics. *Journal of Genetics* 59, 585–591.
- Ueno, K., 1989, Autotriploids. In: Suzuki, R. Ed., *Chromosome Manipulation and its Application for Ž . Aquaculture*. Koseisha-koseikaku, Tokyo, pp. 70–81 In Japanese .
- Utter, F.M., Johnson, O.W., Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., 1983. Measurement and potential applications of induced triploidy in Pacific salmon. *Aquaculture* 35, 125–135.
- Ünlü, A., 2004, *Sıcak ve soğuk şok yöntemiyle elde edilen triploid gökkuşığı alabalıklarında (O.mykiss) bazı anatomik ve histolojik bozukluklarının tesbiti üzerine bir çalışma*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Vandeputte, M., Storset, A., Kause, A., Henryon, M., 2008, A review on breeding and reproduction of European aquaculture species: Rainbow trout Present Practices, (*Oncorhynchus mykiss*). Paris, 9 pp.
- Vanpé C, Salmons J., Pais I., Kun-Rodrigues, C., Pichon, C., Meyler, S.V., Rabarivola, C., Lewis, R.J., Ibouroi, M.T., Chikhi, L., 2013, Noninvasive molecular sexing: an evaluation and validation of the SRY- and amelogenin-based method in three new lemur species. *Am J Phys Anthropol* 150:492–503.
- Van Eenennaam, J.P., Medrano, J.F., Vedoroshov, S.I., 1995, *Induction of meiotic gynogenesis and polyploidy in White Sturgeon (Acipenser transmontanus)*, Department of Animal Science University of California.
- Varadaraj, K., Pandian, T.J., 1989a, First report on production of supermale tilapia by integrating endocrine sex reversal with gynogenetic technique. *Curr. Sci.* 8: 434–441.
- Varadaraj, K., Pandian, T.J., 1988, Induction of triploids in *Oreochromis mossambicus* by thermal, hydrostatic pressure and chemical shocks. *Proc. Aquacult. Int. Congr. Vancouver, Canada*: 531–535.
- Varadaraj, K., 1990, Dominant red colour morphology used to detect paternal contamination in batches of *Oreochromis mossambicus* gynogens, *Aquaculture and Fisheries Management*, 21, 163-172.
- Veith, A. M., Froschauer, A., Korting, C., Nanda, I., Hanel, R., Schmid, M., 2003, Cloning of the *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene*, 317: 59-66.
- Vladić, T., Jätrvi, T., 1997, Sperm motility and fertilization time span in Atlantic salmon and brown trout the effect of water temperature. *Journal of Fish Biology*, 50: 1088-1093. doi:10.1111/j.1095-8649.1997.tb01632.x

- Volckaert, F.A.M., Galbusera, P.H.A., Hellemant, B.A.S., van den Heute, C., Vanstaen, D., Ollevier, F., 1994, Gynogenesis in the African catfish (*Clarias gariepinus*). 1: Induction of meiogynogenesis with thermal and pressure shocks. *Aquaculture* 128: 221–233.
- Wakimoto, B.T., Turner, F.R., Kaufman, T.C., 1984, Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 102: 147-72.
- Walczak, H., Haas, T.L., 2008, Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex. *Methods Mol Biol.* 414, 221-39.
- Walker, C., Walsh, G.S., Moens, C., 2009, Making gynogenetic diploid zebrafish by early pressure. *Journal of Visualized Experiments*, 28:5–6. doi: 10.3791/1396.
- Wang, Y., Hammes, F., Roy, K.D., Verstraete, W., Boon, N., 2010, Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, 10, 28(8), 416-24.
- Watanabe, M., Tanaka, M., Kobayashi, D., Yoshiura, Y., Oba, Y., Nagahama, Y., 1999, Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 149: 221-228.
- Wattendorf, R. J., 1986, Rapid identification of triploid grass carp with a Coulter counter and Channalizer. *Progr. Fish Cult.* 48: 125–132.
- Weber, G.M., Lee, C.S., 2014, Current and future assisted reproductive technologies for fish species. *Adv Exp Med Biol.*, 752:33-76. doi: 10.1007/978-1-4614-8887-3_3.
- Weeks, J., 1998, The 1997 survey of trout production in England and Wales. *Trout News* 26:7-16.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990, Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 7213-7218.
- Wolenski, J.S., Hart, N.H., 1987, Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg, *Journal Experimental Zoology*, 243, 259.
- Wolters, W.R., Chrisman, C.L., Libey, G.S., 1982, Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish. Biol.*, 20. p. 253-258.
- Xu, H., Li, M., Gui, J., Hong, Y., 2010, Fish germ cells. *Sci China Life Sci.*, 53(4):435-46. doi: 10.1007/s11427-010-0058-8.
- Yamaner, G., Memiş, D., Baran, A., 2015, Sperm quality and effects of different cryomedia on spermatozoa motility in first-time spawning of cultured Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833)", *Journal Of Applied Ichthyology*, vol.31, pp.71-74.

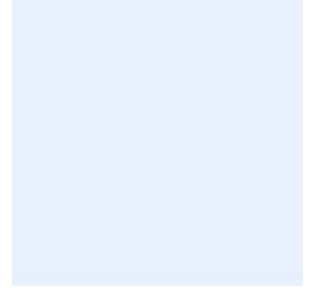
- Yamazaki, F., 1983, Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture* 33, 329–354.
- Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Guiguen, Y., 2012, An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol* 22(15):1423–1428.
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guiguen, Y., 2013, The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol Appl* 6(3):486–496
- Yazıcı, M., Yardımcı, R.E., 2016, Akım Sitometri ve Su Ürünleri Uygulamaları. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research* 2(4): 159-175, doi: 10.3153/JAEFR16018.
- Yentsch, C.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Dortch, Q., Haugen, E., Legendre, L., Murphy, L.S., Perry, M.J., Phinney, D.A., Pom-poni, S.A., Spinrad, R.W., Wood, M., Yentsch, C.S., Zahuranec, B.J., 1983, Flow cytometry and cell sorting: A technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnology and Oceanography*, 28(6), 1275-1280.
- Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Yamamoto, T., Iguchi, T., Abe, S., Kitano, T., 2004, Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322: 508-513.
- Yoshiura, Y., Senthilkumaran, B., Watanabe, M., Yuichi, O., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2003, Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biol. Reprod.*, 68: 1545-1553.
- Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., Takeuchi, Y., 2011, Spermatogonial Transplantation in Fish: A Novel Method for the Preservation of Genetic Resources, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part D 6, 55-61.
- Young, W.P., Wheeler, P.A., Fields, R.D., Thorgaard, G.H., 1996, DNA fingerprinting confirms isogenecity of androgenetically derived rainbow trout lines. *Journal of Heredity*, 87(1): 77-81.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Blázquez, M., Ramos, J., Piferrer, F., Donaldson, E.M., 1994, Production of monosex and sterile sea bass by hormonal and genetic approaches. *Publ. Assoc. Dévelop. Aquac.* 119: 409–423.
- Zhang, Q., Sun X., Qi, J., Wang, Z., Wang, X., Wang, X., Zhai, T., 2009, Sex determination mechanisms in fish. *J. Ocean Univ. China*, 8(2):155-160.
- Zheng, G., Wang, C., Guo, D., Jiang, X., Zou, S., 2017, Ploidy level and performance in meiotic gynogenetic offspring of grass carp using UV-irradiated blunt snout bream sperm, *Aquaculture and Fisheries*, (2017) 1-7.

Zhu, L., Wilken, J., Phillips, N.B., Narendra, U., Chan, G., Stratton, S.M., 2000, Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers. *Genes Dev.*, 14: 1750-1764.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Rahmi Can ÖZDEMİR
Doğum Yeri	ÜSKÜDAR
Doğum Tarihi	12.09.1987
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05395538658
E-Posta Adresi	rozdemir@kastamonu.edu.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Su Ürünleri Fakültesi
Bölümü	Yetiştiricilik
Mezuniyet Yılı	2009
Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Su Ürünleri Yetiştiriciliği
Programı	2012
Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Programı	Su Ürünleri Yetiştiriciliği Programı
Makale ve Bildiriler	

Bilen, S., Kenanoğlu, O.N., Terzi, E., Özdemir, R.C., Sönmez, A.Y., 2018, Immune Response and Growth Performance of Common Mallow (*Malva sylvestris*) in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), *International Congress on Engineering and Life Science*, 26-29 April, 2018, Kastamonu, Turkey.

Bilen, S., Kenanoğlu, O.N., Terzi, E., Özdemir, R.C., Sönmez, A.Y., 2018, Immune Response and Growth Performance of Tetra (*Cotinus coggygia*) in Sea Bream (*Sparus aurata*), *International Congress on Engineering and Life Science*, 26-29 April, 2018, Kastamonu, Turkey.

- Ekici, A. and Ozdemir, R.C., 2014, Spermatozoa Motility Characteristics of Convict Cichlid *Cichlasoma nigrofasciatum* in Long Term Storage. Poster presentation. *Aquagamete-Cost* 2014.
- Evcin, Ö., Ünal, S., Akkuzu, E., Uğış, A., Küçük, Ö. Özdemir, R. C., 2017, Kastamonu Yöresinde Tespit Edilen Su Samuru (*Lutra lutra* L. 1758)'nın Biyoekolojisi Üzerine Araştırmalar. *Uluslararası Taşköprü Pompeiopolis Bilim Kültür Sanat Araştırmaları Sempozyumu*. 10-12 Nisan 2017. Özet Kitabı s:319-320.
- Ozdemir, R.C. and Ekici, A. 2017, Different Heat Shock Application Effect on Gynogenetic Production of Zebrafish (*Danio rerio*), *Fish Aqua J.*, 8:2. DOI: 10.4172/2150-3508.1000196.
- Özdemir R.C., Ekici A., 2014. "Zebra Balığı (*Danio rerio*)'nın Spermatolojik Özellikleri ve Ultraviyole Uygulamasının Sperm Motilitesi ve Döllenme Üzerine Etkisi", *Ulusal Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Gamet Biyolojisi Çalıştayı*, Sakarya, TÜRKİYE, 3-5 Nisan 2014, ss.44-45.
- Özdemir, R. C., 2016, Kastamonu İli Akuakültür Sektöründe Biyoteknolojik Uygulamaların Yeri ve Önemi. *I. Uluslararası Abana Sempozyumu Geçmişten Günümüze Kastamonu/Kent-Kültür-Kimlik*, ISBN-978-605-9269- 60-5, sayfa:375-380.
- Özdemir, R.C. ve Ekici, A., 2016, Ginogenez Uygulamasında Ultraviyole Işınlanmasının Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*) Sperması Üzerine Etkisi. *II. Ulusal Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Gamet Biyolojisi Çalıştayı* 19-21 NİSAN, 2016 MUĞLA. Bildiri Kitabı s:29.
- Özdemir, R.C., 2012, Zebra Balığı (*Danio rerio*) Spermatozoa Motilitesi ve Yoğunluğunun Tespiti Üzerine Bir Araştırma. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, cilt:27, sayı:2, sayfa:35-45.
- Özdemir, R.C., 2018, Effect of Using Different Hypotonic Solution for Chromosome Preparation from Embryonic Tissues of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae, *International Congress on Engineering and Life Science*, 26-29 April, 2018, Kastamonu, Turkey.
- Özdemir, R.C., Bilen, S., Bilen, M.A., Yürüten, K., 2013, Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Üretiminde Bağışıklık Uyarıcılar. 3. *Ulusal Alabalık Sempozyumu*, 24-26 Mayıs 2013. Sayfa 91.
- Özdemir, R.C., Ekici, A., 2018, Ginogenetik Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Üretimi, *Su Bilimlerinde Biyoteknoloji Çalıştayı*, 10-11 Mayıs 2018, İstanbul, Türkiye.
- Özdemir, R.C., Kesbiç, O.S., Acar, Ü., Gültepe, N., Fazio, F., 2016, Effects of pomegrante seed oil on growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *5th International Feed Conference: Present and Future Challenges* 19-20 October 2016 Geel-Belgium. Page:52

- Özdemir, R.C., Özdemir, K.Y., Alagöz, K., Özkan, O., Özçelik, H., ŞAHİN, M.A., 2016. “Kısa Süreli Yumurta Muhafazası Sonrası Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda Embriyolojik Gelişimin İzlenmesi ve Yaşama Oranlarının Belirlenmesi”. II. *Ulusal Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Gamet Biyolojisi Çalıştayı* 19-21 NİSAN 2016, MUĞLA. Bildiri Kitabı s:3.
- Özdemir, R.C., Özdemir, K.Y., Kamberli, E., Özdemir, G., Aslan, Z., 2018, Analyses of Sea Surface Temperature by Wavelet Methodology, *International Symposium Ecology 2018*, 19-23 June 2018 Kastamonu, Turkey.
- Özdemir, R.C., Paruğ, Ş.Ş., 2018, Effect of Water Quality Parameters on Reproduction of Strawberry Conch Snail (*Conomurex luhuanus*) in Marine Aquarium Conditions, *International Congress on Engineering and Life Science*, 26-29 April, 2018, Kastamonu, Turkey.
- Sönmez, A., Kadak, A., Özdemir, R.C., Bilen, S. 2016. Establishing on Heavy Metal Accumulation in Some Economically Important Fish Species Captured from Kastamonu Costal. *Alınleri Zirai Bilimler Dergisi*, 31 (2), 84-90.
- Yürüten, K. ve Özdemir, R.C., 2013, Türkiye’de Ağ Kafes Yetiştiriciliğinde Karşılaşılan Sorunlar ve Çözüm Öneriler, *17. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*, 3-6 Eylül 2013, İstanbul.