

## Bölüm 13

# KÜLTÜR BALIKÇILIĞINDA GENETİK KAYNAKLARIN KORUNMASI: UYGULAMALAR ve SORUNLAR

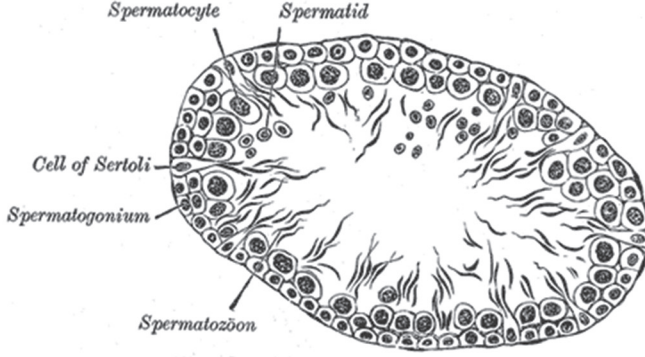
Serhat ENGİN<sup>1</sup>

### BALIK SPERMINİN SU ÜRÜNLERİNDEKİ ÖNEMİ VE SPERM KALİTESİ

Memeli spermelerinin doğal koşullarda döllemesi gereken yumurta sayısı balık spermeleri ile kıyaslandığında binlerce hatta yüz binlerce kez balık spermelerinin döllemesi gerekenden daha azdır. Ayrıca dış dölleme ile üreyen canlılar döllemenin gerçekleştiği güvenli bir ortamdan, anne rahminden yoksundur. Buna karşın balıklardaki yumurta sayısı olağan üstü derece fazladır ancak sperm sayısı ve sperm yaşamı bu denli uzun değildir. Bu kısıtlılığın olumlu yanı doğadaki popülasyonu sağlamasıdır ancak yetiştiricilik koşullarında dezavantaja dönüşmektedir. Yapay döllemenin tam kontrollü laboratuvar ve kültür (hücre kültürü) koşullarından yoksunluğu yetiştiricilikte pratik ve de uygulanabilir çözümlerin üretimini gerektirmektedir. Ancak üretimi yapılan tür sayısının çok fazla olması standart bir metodun oluşturulmasını olanaksız kılmaktadır. Bunun yerine sperm ultra yapısını ve genel fizyolojisini tanıyarak üreme araştırmaları yapan uzmanların türe has optimal prosedürler geliştirmeleri gerekmektedir. Sperm in vivo olarak çoğu zaman in vitro formdan çok daha başarılı olarak saklanabilmektedir. In vitro da gerekli dilüsyon ve artifisyel etmenlere karşın in vivo da doğal olarak gelişmekte, korunabilmektedir. Bu anlamda sperm en önemli karakteristikleri motilite, doğal osmolarite ve enerji ATP stoğudur. Sperm homeostatik dengesi, sitoplazmik inklüzyonları ve ekzojen değişkenler bu kaliteyi dolaylı yada direkt olarak etkilerler.

---

<sup>1</sup> Dr., Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 35040, Bornova-İzmir, e-posta: serhat.engin@ege.edu.tr



Şekil 1. In vivo spermatogenesis, epiteller uzun ve tabakalaşmış olarak görülmektedir.

## SPERMA DONDURMA

Sperm bir gamet hücresidir. Donma işlemi sırasında hücre dışındaki sıvılar hücre içersinden daha önce donmaktadır. Bu esnada dış basınç çok fazla olmaktadır. Hücre iç basıncını dengelemek için dışarıya su vererek bu dengeyi sağlamaktadır. Bu basınç öyle bir noktaya gelir ki hücrenin mikro porları bu sıvı geçişini karşılayamaz. Mikrofilamentler bozulmaya başlar, hücre zarı yıpranır ve geri dönüşümsüz hücre hasarları oluşur. Yani hücre nekroza mağruz kalır.

Bu nedenle donma özelliği daha kontrollü sıvılar bulma zorunluluğu doğmuştur ve fizyolojik ortamın stabilitesi için soğuk koruyucu / cryoprotectant (CPA) kullanılır. Şimdiye kadar ki literatürlere bakıldığında en iyi CPA olarak DMSO'nun kullanıldığı görülmektedir. Ancak DMSO aynı zamanda toksit bir maddedir. Balık spermi dışında, hayvan hücreleri çok özel besleyici ortamlara konulduklarından CPA'ların bu toksit etkisi ile savaşılabilecek kadar besi ortamında beslenebilmektedirler. Ancak sperm dışardan besin alımı çok düşük olduğu için sperm yeterince beslenemez bu problemi çözmek için Extender denen canlılık uzatıcı kimyasallar ilave edilir. Ortamda ki CPA nekrozlarını engellemek için filtre süt tozu, yumurta sarısı, kompleks hayvansal şekerler vb. maddeler ilave edilir. Dondurma işleminden önce sperm immobilizasyon solüsyonuyla seyreltilir (dilute edilir). Aslında bu solüsyon aynı zamanda sukroz, trehaloz, tris gibi extender maddeleri içerir. Sperm bu solüsyon ile seyreltikten sonra karıştırılır ve dilüsyon oluştuğuna emin olunduktan sonra CPA'lar eklenir.

CPA'lar kendi içersinde geçirgenlik gösteren ve göstermeyen olarak iki gruba ayrılır. Geçirgenlik gösterenler etilen, glikol, DMSO, gliserol, metanol gibi kimyasallardır.

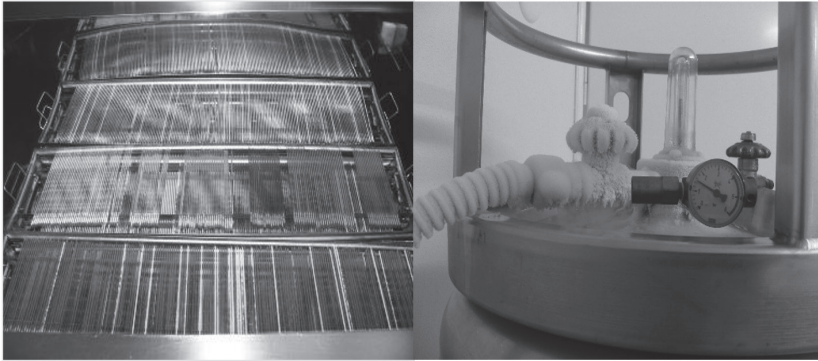
Uzun süreli dondurma işlemlerinde spermde akrozom bölgesinin deformasyonunu engellemek için örnek önce sıvı azot buharına yaklaşık 10 dk maruz bırakılır ardından sıvı nitrojene batırılır. Asla direk sıvı nitrojen tankına konmaz bu spermin termik şoka girmesine neden olur.



**Şekil 2.** Erkek damızlık balıktan sağım yöntemi ile sperma alımı



**Şekil 3.** Spermanın payetlere çekilmesi



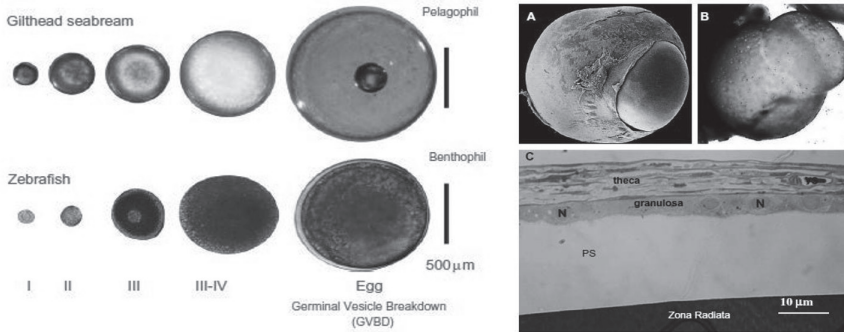
**Şekil 4.** Payetlerin kanistere dizilmesi ve sıvı nitrojen tankına alınması

Günümüzde balık spermalarının uzun süreli korunumu ile ilgili çalışmalar hız kazanmış ve özellikle kültür balıkçılığında birçok probleme çözüm olanağı sağlamıştır. Bu avantajlar genel olarak şu şekilde sıralanabilir;

1. Erkek ve dişi gametlerinin senkronizasyonunun sağlanması
2. Yeterli miktardaki spermın istenilen zamanda kullanılması
3. Anaç yönetiminin kolaylaştırılması
4. Gametlerin transferi
5. Spermaların yaşlanmasının önlenmesi
6. Bilimsel çalışmalarda yıl boyu ihtiyaç duyulan spermın karşılanması
7. Evcilleştirilmiş popülasyonlardaki genetik çeşitliliğin korunması
8. Nesli tükenmekte olan türlerin güvenlik altına alınması; erkek
9. Salgın hastalıkların engellenmesinde (Engin, 2012).

## OOSİT DONDURMA

Oosit dondurma ve saklama prosedürü spermaya uygulanan işlemlerden daha karmaşık ve başarı oranı daha düşüktür. Bunun ana nedenleri başında spermaya oranla daha büyük hücre hacmi, yumurtada bulunan koryon ve kriyoprotektanların düşük hücre geçirgenliği olarak sıralanabilir. Günümüzde zebra balığı ve diğer deniz ve tatlı su balıkları ile çalışmalar yapılmıştır. Kriyoprotektan toksisitesi, soğutma hassasiyeti, membran geçirgenliği ve oositlerin farklı gelişim aşamalarında veya yumurtalık fragmanlarındaki kriyoprezervasyon (soğutma oranları, vitrifikasyon) test edilmiştir (Zhang ve diğ., 2007; Godoy ve diğ., 2013; Streit Jr. ve diğ., 2014). Yapılan çalışmalarda dondurulan oositlerin çözündürme protokollerinin geliştirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır (Seki ve diğ., 2008, 2011; Tsai ve diğ., 2010).



Şekil 5. Çipura ve Zebra balığı yumurta dondurma (Lubzens ve diğ., 2010)

## EMBRIYO DONDURMA

Balık embriyo dondurulması ve saklanması bilim insanları için her zaman ilgi çekici bir konu olmuştur. Geçmişte birçok kez yapılan başarısız denemelerden sonra günümüzde embriyo dondurma protokollerinin geliştirilmesi sayesinde başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Balık embriyosunun başarılı şekilde dondurulması hem baba hem de anne genomunun korunmasını sağlar; Su ürünleri açısından bakıldığında, başarılı balık embriyo kriyoprezervasyonu, balık çiftliklerinde genetik seçim programlarının kurulmasını ve yönetimini önemli ölçüde kolaylaştıracaktır.

Balık embriyo dondurma ve saklanmasında karşılaşılan güçlükler 4 başlık altında toplanmıştır. Bunlar; balık embriyoları düşük yüzey / hacim oranına, büyük yumurta sarısı büyüklüğüne, düşük membran geçirgenliğine ve yüksek soğutma hassasiyetine sahiptir (Hagedorn ve diğerleri, 1997a, b; Zhang ve Rawson, 1998; Zhang ve diğerleri, 2003).

Son 10 yılda embriyo dondurma çalışmaları *Scophthalmus maximus* (Cabrita ve diğ. 2003, Robles ve diğ. 2003), *Paralichthys olivaceus* (Chen and Tian 2005, Edashige ve diğ. 2006, Zhang ve diğ. 2005), *Pagrus major* (Ding ve diğ. 2007), *Sillago japonica* (Rahman ve diğ. 2011), *Sparus aurata* (Robles ve diğ. 2007), *Pseudopleuronectes americanus* (Robles ve diğ. 2005), *Labeo rohita* (Ahammad ve diğ. 2003), *Cyprinus carpio* (Dinnyes ve diğ. 1998), *Tinca tinca* (El-Battawy ve Linhart 2009), *Rhinelepis aspera* (Fornari ve diğ. 2014), *Piaractus mesopotamicus* (Neves ve diğ. 2014), *Piaractus brachypomus* (Pessoa ve diğ. 2014), *Oryzias latipes* (Valdez ve diğ. 2005, Zhang ve diğ. 2012), *Misgurnus anguillicaudatus* (Yasui ve diğ. 2011), *Danio rerio* (Liu ve diğ. 2001, Martínez-Páramo ve diğ. 2009, Robles ve diğ. 2004) türlerinde gerçekleştirilmiştir ancak tam bir başarı sağlanamamıştır.

Sonuç olarak germ hücrelerinin dondurularak saklanması ve muhafazası su ürünleri yetiştiriciliği için birçok avantajı beraber getirecektir. Özellikle nesli tükenmekte olan türler ile yetiştiricilikte anaç balık bulmada ki güçlüklerin önüne geçilebilecektir. Sperma dondurulması yanında yumurta ve embriyo saklanması çalışmaları yapılmasına karşılık standart bir prosedürden bahsetmek henüz erkendir. Bu nedenle konu ile ilgili çalışmaların artırılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

- Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D., Jana, B.B., 2003. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* 46, 2–16.
- Cabrita, E., Robles, V., Chereguini, O., de Paz, P., Anel, L., Herraiz, M.P., 2003. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology* 60, 463–473.

- Chen, S.L., Tian, Y.S., 2005. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* 63, 1207–1219.
- Ding, F.H., Xiao, Z.Z., Li, J., 2007. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* 68, 702–708.
- Dinnyes, A., Urbanyi, B., Baranyai, B., Magyary, I., 1998. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 50, 1–13
- Edashige, K., Valdez Jr., D.M., Hara, T., Saida, N., Seki, S., Kasai, M., 2006. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. *Cryobiology* 53, 96–106.
- El-Battawy, K.A., Linhart, O., 2009. Preliminary studies on cryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos (work in progress). *Reprod. Domest. Anim.* 44, 718–723.
- Engin, S., 2012. Çipura (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) Spermlerinin Uzun Süreli Korunumu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 151s.
- Fornari, D.C., Ribeiro, R.P., Streit, D.J., Godoy, L.C., Neves, P.R., de Oliveira, D., Sirol, R.N., 2014. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at  $-8^{\circ}\text{C}$ . *Zygote* 22, 58–63.
- Godoy, L.C., Streit Jr., D.P., Zampolla, T., Bos-Mikich, A., Zhang, T., 2013. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology* 67, 347–354.
- Hagedorn, M., Kleinhans, F.W., Wildt, D.E., Rall, W.F., 1997. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology* 34, 251–263.
- Liu, X.H., Zhang, T., Rawson, D.M., 2001. Differential scanning calorimetry studies of intraembryonic freezing and cryoprotectant penetration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Exp. Zool.* 290, 299–310.
- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F., Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks — strategies in research and application. *Aquaculture* 155, 13–30.
- Martínez-Páramo, S., Barbosa, V., Pérez-Cerezales, S., Robles, V., Herráez, M.P., 2009. Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology* 58, 128–133.
- Neves, P.R., Ribeiro, R.P., Streit, D.P.J., Natali, M.R.M., Fornari, D.C., Santos, A.I., Godoy, L.C., 2014. Injuries in pacu embryos (*Piaractus mesopotamicus*) after freezing and thawing. *Zygote* 22, 25–31.
- Pessoa, N.O., Galvão, J.A.S., de Souza Filho, F.G.M., de Sousa, M.L.N.M., Sampaio, C.M.S., 2014. Cooling of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) embryos stored at  $-10^{\circ}\text{C}$ . *Zygote* 23 (3), 453–459.
- Rahman, S.M., Strüssmann, C.A., Majhi, S.K., Suzuki, T., Watanabe, M., 2011. Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. *Theriogenology* 75, 248–255.
- Robles, V., Cabrita, E., Real, M., Alvarez, R., Herraes, M.P., 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* 47, 30–39.
- Robles, V., Cabrita, E., de Paz, P., Cunado, S., Anel, L., Herraes, M.P., 2004. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology* 61, 1367–1379.
- Robles, V., Cabrita, E., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Herraes, M.P., 2005. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology* 64, 1633–1646.
- Robles, V., Barbosa, V., Herraes, M.P., Martinez-Paramo, S., Cancela, M.L., 2007. The antifreeze protein type I (AFP I) increases seabream (*Sparus aurata*) embryos tolerance to low temperatures. *Theriogenology* 68, 284–289.
- Seki, S., Kouya, T., Tsuchiya, R., Valdez, D.M., Jin, B., Hara, T., Saida, N., Kasai, M., Edashige, K., 2008. Development of a reliable in vitro maturation system for zebrafish oocytes. *Reproduction* 135, 285–292.

- Seki, S., Kouya, T., Tsuchiya, R., Valdez Jr., D.M., Jin, B., Koshimoto, C., Kasai, M., Edashige, K., 2011. Cryobiological properties of immature zebrafish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. *Cryobiology* 62, 8–14.
- Streit Jr., D.P., Godoy, L.C., Ribeiro, R.P., Fornari, D.C., Digmayer, M., Zhang, T., 2014. Cryopreservation of embryos and oocytes of south american fish species. In: Yamashiro, H. (Ed.), *Recent Advances in Cryopreservation*. Intech.
- Tsai, S., Rawson, D.M., Zhang, T., 2010. Development of in vitro culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies. *Theriogenology* 74, 290–303.
- Valdez, J., Delgado, M., Miyamoto, A., Hara, T., Edashige, K., Kasai, M., 2005. Sensitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. *Theriogenology* 64, 112–122.
- Yasui, G.S., Fujimoto, T., Sakao, S., Yamaha, E., Arai, K., 2011. Production of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) germ-line chimera using transplantation of primordial germ cells isolated from cryopreserved blastomeres. *J. Anim. Sci.* 89, 2380–2388.
- Zhang, T., Rawson, D.M., 1998. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology* 37, 13–21.
- Zhang, T., Liu, X.-H., Rawson, D.M., 2003. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 59, 1545–1556.
- Zhang, T., Isayeva, A., Adams, S.L., Rawson, D.M., 2005. Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants. *Cryobiology* 50, 285–293.
- Zhang, T., Rawson, D., Pekarsky, I., Blais, I., Lubzens, E., 2007. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes. In: Babin, P., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.), *The Fish Oocyte*. Springer, Netherlands, pp. 411–436.
- Zhang, Q.-J., Zhou, G.-B., Wang, Y.-P., Fu, X.-W., Zhu, S.-E., 2012. Cryoprotectants protect medaka (*Oryzias latipes*) embryos from chilling injury. *CryoLetters* 33, 107–116.

