

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARADENİZ KALKAN BALIĞI (Psetta maxima Linnaeus,1758)
YUMURTA KALİTESİNİN BLASTOMER MORFOLOJİSİ İLE
TAHMİN EDİLMESİ VE TRİPLOİD UYGULAMASININ
YUMURTA KALİTESİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

İlhan AYDIN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

Rize 2008

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

**KARADENİZ KALKAN BALIĞI (Psetta maxima Linnaeus,1758)
YUMURTA KALİTESİNİN BLASTOMER MORFOLOJİSİ İLE
TAHMİN EDİLMESİ VE TRİPLOİD UYGULAMASININ
YUMURTA KALİTESİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

İlhan AYDIN

Rize üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Su Ürünleri Yüksek Mühendisi”
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02/01/2008

Tezin Savunma Tarihi : 23/01/2008

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hamdi ÖĞÜT

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Süleyman AKHAN

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Kerim SERBEST

Rize 2008

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı'nda başlamış Rize Üniversitesinin kurulması ile Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı'nda yapılmıştır. Bu çalışmanın tüm denemeleri Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Deniz Balıkları Kuluçkahanesi'nde yürütülmüştür.

Ülkemizde Karadeniz kalkanının yavru üretimi son on yıldır başarıyla yapılmaktadır. Üretilen yavruardan bir kısmı deneme maksatlı özel sektör işletmelerine verilmektedir. Yakın gelecekte özel sektörün yavru üretimine girmesi beklenmektedir. Yumurta kalitesini gösteren kriterlerin oluşturulmasına ihtiyaç vardır. Yetiştiricilikte triploidi, balıkların kalitatif ve kantitatif özelliklerinin artırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem yumurtanın erken gelişme döneminde uygulanmaktadır. Bu çalışma, kalkan balığı kuluçkahanelerinde üretim yapacakların kaliteli yumurta gruplarını önceden tahmin ederek üretimde başarı sağlamaları ve kalkan balığında soğuk şok ile triploid uygulama yapabilmeleri ve soğuk şok uygulamasının yumurta kalitesine etkilerinin belirlenmesi amacıyla çalışılmıştır.

Hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen başta annem, babam, eşim ve oğlum olmak üzere tüm aileme, yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ'a, çalışmalarımı destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma ve Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü idaresine teşekkürlerimi sunarım.

Rize, 2008

İlhan AYDIN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Kalkan Balığının Sistematikteki Yeri ve Morfolojisi.....	3
1.2.1. Sistematikteki yeri.....	3
1.2.2. Morfolojisi.....	4
1.3. Dağılımı ve Biyo-Ekolojik Özellikleri.....	5
1.4. Kalkan Balığı Yetiştiriciliği.....	6
1.5. Ekonomik Önemi.....	8
1.6. Balık Yetiştiriciliğinde Yumurta Kalitesi.....	10
1.7. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Triploidi.....	12
1.7.1. Triploid oluşturma mekanizması.....	14
1.7.2. Triploidizasyon uygulamasında kullanılan yöntemler.....	14
1.8. Önceki Çalışmalar.....	16
1.8.1. Yumurta kalitesi.....	16
1.8.2. Triploidi.....	18
1.9. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı.....	21
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Araştırmada kullanılan damızlık balıklar.....	23
2.1.2. Araştırma ünitesi.....	23

2.1.2.1	Sağım ünitesi ve kullanılan malzemeler	24
2.1.2.2.	Hormon hazırlama seti	25
2.1.2.3.	Soğuk şok uygulama ekipmanı.....	26
2.1.2.4.	Yumurta kuluçka ünitesi ve kullanılan malzemeler	27
2.1.2.5.	Araştırmada kullanılan diğer araç ve gereçler.....	28
2.2.	Metot	28
2.2.1.	Hormon hazırlama ve uygulama	28
2.2.2.	Yumurtaların sağımı ve döllenişmesi	29
2.2.3.	Triploidizasyon (Soğuk su şoku uygulaması)	32
2.2.4.	Yumurtaların kuluçkalanması	33
2.2.5.	Embriyonik gelişimin incelenmesi.	34
2.2.6.	Erken dönem yaşam oranlarının karşılaştırılması	35
2.2.7.	Erken dönem blastomer morfolojisi ve yaşam oranı arasındaki ilişki	36
2.2.8.	Verilerin istatistiksel analizleri.....	36
3.	BULGULAR	38
3.1.	Döllenişme ve Çıkış Oranları.....	38
3.2.	Soğuk Şok Uygulaması ve Yumurtaların Kuluçkalanması.....	38
3.3	Embriyonik Gelişim	39
3.4.	Erken Dönem Yaşam Oranlarının Karşılaştırılması.....	44
3.5.	Erken Dönem Blastomer Morfolojisi ve Yaşam Oranı Arasındaki İlişkisi.....	54
4.	TARTIŞMA.....	62
4.1.	Döllenişme ve Çıkış oranları.....	63
4.2.	Soğuk Şok Uygulaması	63
4.3.	Embriyonik Gelişime Ait Sonuçlar	64
4.4.	Erken Dönem Yaşam Oranlarının Karşılaştırılması.....	65
4.5.	Erken Dönem Blastomer Morfolojisi ve Yaşam Oranı Arasındaki İlişki	66
5.	SONUÇLAR	69
6.	ÖNERİLER	71
7.	KAYNAKLAR.....	72
	ÖZGEÇMİŞ	79

ÖZET

Bu çalışmada, Karadeniz kalkan balığı yumurtalarının blastomer morfolojisi incelenerek yumurta yaşam oranı ile ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, triploid bireyler oluşturmak için uygulanan soğuk şokun yumurta kalitesi üzerine etkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Anormallikler blastomerlerin 4-8'li aşamasında, 1) asimetrik hücre, 2) büyüklüğü farklı hücre, 3) birbirinden ayrık hücre, 4) kenarları belirgin olmayan hücre şeklinde tasnif edilmiştir. Yaşam oranları döllenmeden itibaren larva çıkışından 1 gün sonrasına kadar takip edilmiştir.

Şok grubundaki anormallikler beş anaçın üçünde önemli ölçüde olmak üzere kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir.

Yaşam oranları açısından yalancı kontrol ile şok grubu arasındaki farkın ve yalancı kontrol ile kontrol arasında ise farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir. Ancak, şok grubunun yaşam oranının kontrol grubundan 1., 4. ve 5. anaçlar da önemli oranda düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Normal blastomer oranları ile yaşama oranları arasında önemli bir pozitif ilişki görülmüş iken asimetrik hücre anormalliği ve hücre büyüklüğü farklı olan yumurta anormalliği ile yaşam oranları arasında önemli bir korelasyon ($\alpha=0,05$, $n=10$) görülmemiştir. Fakat bu anormallikler ile şok grubu yumurtaların yaşam oranları arasında negatif ilişki belirlenmiştir. Kenarları belirgin olmayan hücre anormalliği ile yaşam oranı arasında önemli negatif bir ilişki belirlenmiştir.

Blastomerlerde asimetrik hücre veya hücrelerin farklı büyüklükte olması hassasiyetin ve ayrık hücre veya kenarları belirgin olmayan hücre anormalliklerinin görülmesi ise kalitenin kötü olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, erken dönem blastomer morfolojisi yumurta kalitesinin tahmininde kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Karadeniz kalkan balığı, blastomer morfolojisi, yumurta kalitesi triploid, soğuk şok

SUMMMARY

Predicting Egg Quality Based on Blastomere Morphology and Investigating of the Effect of Triploid Induction in Black Sea Turbot

In this study, blastomere morphology of Black Sea turbot eggs and its relationship with egg viability was investigated. In addition, determination of cold shock effect on eggs in the triploid experiment was purposed.

Abnormalities in blastomere cleavage (stage 4-8) were categorized as 1) asymmetric blastomere, 2) inequality of blastomere size, 3) poor adhesion blastomere and 4) poor definition of blastomere margins. Viability was observed from fertilization to one day after hatching.

Cleavage abnormalities were higher in shock groups than control groups, however, significantly in 3 out of 5 females.

There was no significant difference between sham control groups and shock groups in term of survivals at any of the day. Moreover, there was no generally difference between sham control groups and control groups, though only significantly in term of survivals at third and fourth days in 1 out of 5 females. Survivals were lower in shock groups than control groups, however, significantly in 3 out of 5 females($p < 0.05$).

Significant positive linear correlation between normal cell rate and egg viability was observed whereas no correlation between asymmetric cell abnormality rate or inequality of blastomere size rate and egg viability ($\alpha = 0,05$, $n = 10$). On the other hand, there was significant negative linear correlation between these abnormalities and shock groups egg viability. Negative linear correlation between poor adhesion blastomere rate and egg viability was found. Furthermore there was significant negative linear correlation between poor definition of blastomere margins rate and egg viability ($\alpha = 0,05$, $n = 10$).

Asymmetric blastomere and inequality of blastomere size was sign of vulnerability while poor adhesion blastomere and poor definition of blastomere margins was sing of poor egg quality. Consequently, blastomere morphology can be used egg quality estimation.

Key words: Black sea turbot, blastomere morphology, egg quality, triploid, cold shock

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Karadeniz kalkan balığı, <i>Psetta maxima</i>	4
Şekil 2. Kalkan balığının Avrupa kültür üretim miktarı ve pazar değeri (URL-1).	9
Şekil 3. Balıklarda poliploidi (triploid, tetraploid) oluşumu. (Reddy ve ark., 1990'dan alınarak yeniden düzenlenmiştir).....	15
Şekil 4. Karadeniz kalkan balığı A) göz tarafı, B) kör tarafı (Orijinal)	23
Şekil 5. Yassı balıklar için kullanılan sağım masası (Orijinal)	24
Şekil 6. Kanülasyon seti (Orijinal)	25
Şekil 7. Hormon hazırlama seti. A) LHRH-a toz, B) Pelet hazırlama aparatı, C) LHRH-a pelet D) Kakao yağı, E) Kolesterol, F)Etanol, G) Havan ve havaneli (Orijinal)	26
Şekil 8. Soğuk şok uygulamasında kullanılan malzemeler. A) Soğutmalı inkübatör, B) Süre ölçer, C) Dijital termometre, D) Yumurtaların muhafaza edildiği beher, E) Soğuk şok ortamı (Orijinal).....	27
Şekil 9. 50 litrelik şeffaf polietilen yumurta kuluçka tankı. A) Su girişi, B) Hava girişi, C) Drenaj borusu, D) Su çıkışı (Orijinal)	28
Şekil 10. Damızlık balıkların markaları. A) Plastik marka, B) Balığın dorsal kas içine yerleştirilen elektronik marka, C) Marka okuyucu (Orijinal)	30
Şekil 11. Soğuk su şoku uygulama düzeni (Orijinal).....	31
Şekil 12. Yeni sağılmış kalkan balığı yumurtaları (Orijinal).....	32
Şekil 13. Sıcaklık kontrollü inkübatör (Orijinal)	36
Şekil 14. Soğuk şok uygulamasının yapıldığı beherlerdeki deniz suyu sıcaklık değişimi. Ortalama değerler \pm standart hata. Noktalı dikey çizgi soğuk şokun başlama zamanını gösterir.	39
Şekil 15. İkili hücre aşamasında normal görünümlü yumurtalar.	40
Şekil 16. Dörtlü hücre aşamasında normal görünümlü yumurtalar.	40
Şekil 17. Sekizli hücre aşamasında normal görünümlü yumurtalar.	40
Şekil 18. Beş farklı anacın kontrol ve şok gruplarında gözlenen toplam normal ve anormal hücrelere sahip yumurtaların oranları.	42
Şekil 19. Sekizli hücre aşamasında asimetric hücre görünümlü yumurtalar.	42
Şekil 20. Sekizli hücre aşamasında farklı büyüklükte hücrelere sahip yumurtalar.....	43

Şekil 21. Birbirinden ayrıık görünümde hücrelere sahip yumurtalar.	43
Şekil 22. Sekizli hücre aşamasında kenarları belirgin olmayan görünümde hücrelere sahip yumurtalar.	44
Şekil 23. Soğuk şok uygulaması sırasında yumurtada görülen çatlamalar.	44
Şekil 24. Döllenmeden 1 gün sonra gastrula safhasında yumurta.	47
Şekil 25. Döllenmeden 1 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata	47
Şekil 26. Döllenmeden 2 gün sonra embriyo oluşum safhası.	48
Şekil 27. Döllenmeden 2 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata	48
Şekil 28. Döllenmeden 3 gün sonra embriyo safhası.	49
Şekil 29. Döllenmeden 3 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata	49
Şekil 30. Döllenmeden 4 gün sonra embriyo safhası.	50
Şekil 31. Döllenmeden 4 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata	50
Şekil 32. Döllenmeden 5 gün sonra yeni çıkmış prelarva.	51
Şekil 33. Döllenmeden 5 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtalardan çıkan prelarvaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata	51
Şekil 34. Döllenmeden 6 gün sonra prelarva.	52
Şekil 35. Döllenmeden 6 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtalardan çıkan prelarvaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata,	52
Şekil 36. Soğuk şok uygulanan, yalancı kontrol ve kontrol grubu yumurtaların 1., 2., 3., 4., 5. anaçların ayrı ayrı ve genel olarak yaşam oranları	53
Şekil 37. Döllenme oranları ile yaşam oranları arasındaki doğrusal pozitif ilişki* $\alpha=0,05$	54
Şekil 38. Normal blastomer görünümünde hücre oranları (%) ile 1., 2., 3., 4. gündeki yumurtaların, 5. günde yeni çıkmış ve 6. günde 1 günlük prelarvaların yaşam oranları arasındaki doğrusal pozitif ilişki. * $\alpha=0,05$	55
Şekil 39. Hücrelerin asimetric olma anormalliği (%) ile döllenmeden sonraki 6. günde 1 günlük prelarvaların yaşam oranları arasındaki ilişki.	56
Şekil 40. Asimetric blastomer görünümüne sahip hücre oranları (%) ile şok grubu yaşam oranları arasındaki ilişkiler	57

Şekil 41. Asimetrik hücrelerin oranları (%) ile şok grubu yaşam oranları arasındaki doğrusal negatif ilişkiler. * $\alpha=0,05$	57
Şekil 42. Hücre büyüklüğü anormalliği (%) ile yaşama oranları arasındaki ilişki.....	58
Şekil 43. Hücre büyüklüğü anormalliği (%) ile 1 günlük şok grubu prelarvaların yaşama oranları arasındaki ilişki.....	58
Şekil 44. Hücre büyüklüğü anormalliği (%) ile 1 günlük şok grubu prelarvaların yaşama oranları arasındaki önemli doğrusal negatif ilişki. * $\alpha=0,05$	59
Şekil 45. Normal blastomerli yumurta oranları (%) ile yaşama oranları arasındaki önemli doğrusal pozitif ilişki. * $\alpha=0,05$	60
Şekil 46. Normal blastomerli yumurta oranları ve asimetrik hücre anormalliği oranları (%) ile yaşama oranları arasındaki önemli doğrusal pozitif ilişki. * $\alpha=0,05$	60
Şekil 47. Birbirinden ayırık hücre anormalliği oranları (%) ile yaşam oranları arasındaki doğrusal negatif ilişkiler.	61
Şekil 48. Kenarları belirgin olmayan hücrelerin oranları (%) ile yaşam oranları arasındaki ilişki. * $\alpha=0,05$	61

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Deniz balıklarında görülen blastomer morfolojisi anormallikleri (Rideout ve ark., 2004)	35
Tablo 2. 45 litrelik kuluçka tanklarındaki döllenmiş yumurtalara ait çıkış oranları.....	38
Tablo 3. Normal ve anormal blastomer tiplerinin kontrol ve şok grubundaki oranları (%).	41
Tablo 4. Soğuk şok, yalancı kontrol ve kontrol grubu yumurtalarının döllenmesinden 1, 2, 3 ve 4 gün sonra, larvaların çıkışı ve çıkıştan bir gün sonraki canlılık oranlarının ortalaması.	45
Tablo 5. Yaşama oranının incelendiği deneylerde elde edilen verilere Kruskal – Wallis testi uygulanarak elde edilen p değerleri. * $p < 0,05$ göre gruplar arasındaki fark önemlidir.	46
Tablo 6. Yaşam oranına ait verilere çoklu karşılaştırmalı test uygulanarak bulunan p değerleri. * $P < 0,05$ göre gruplar arasındaki fark önemlidir.	46
Tablo 7. Yumurtalarda gözlenen anormallik tiplerinin değerleri (%) ile yaşam oranları (%) arasındaki ilişkiler. $n=10$ * $\alpha=0,05$, ** 5. gün yumurta çıkışı	56

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliğini ilk defa MÖ 2000 yıllarında başlatan Çin, bugüne kadar dünyanın en fazla su ürünü yetiştiren ülkesi olmuştur. Başta sazangiller olmak üzere çok sayıda türün yetiştiriciliğini yapan bu ülke dünya üretiminin önemli bir kısmını sağlamaktadır. Sazan yetiştiriciliği daha sonra Asya kıtasının büyük bir bölümüne ve batıya doğru Avrupa'ya yayılmıştır. 1930'lu yıllarda Avrupalılar sazan yetiştiriciliğini Filistin'e getirirken Brezilyalı biyologlar hipofiz hormonu kullanarak anaç balığın nasıl olgunlaştırılabileceğini keşfetmişlerdir. Alabalıkların yetiştiriciliği ise 1850'li yıllarda başlamıştır. 1870'li yıllarda gökkuşağı alabalığından alınan dömlü yumurtalar önce Avrupa, daha sonra Japonya ve tüm dünyaya yayılmaya başlamıştır. 1890 yılında Danimarka'da modern alabalık yetiştiriciliği başlamıştır. Somon balıklarının yetiştiriciliği ise 1970'li yıllarda yaygınlaşmıştır (Shepherd, 1988).

Deniz balıkları yetiştiriciliği muhtemelen Endonezya'da M.Ö. 1400 yıllarında gelgit olayı sırasında süt balığı (*Chanos chanos*) yavrularının sahildeki havuzlara stoklandığı zaman başlatılmıştır. Özellikle Tayvan ve Endonezya gibi uzakdoğu ülkelerinde süt balığı yetiştiriciliği hala önemli bir endüstridir (Shepherd, 1988). Bununla beraber, deniz balıkları yetiştiriciliğindeki son gelişmelerin büyük bir kısmı 1960'lı yıllarda sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) yetiştiriciliğindeki gelişmelerle Japonya'da meydana gelmiştir. Daha sonra bu ülkede kırmızı mercan (*Pagrus major*) son olarak da orkinos (*Thunnus thynnus*) yetiştirilmeye başlanmıştır. 1970'li yıllarda Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika ülkeleri somon balığını ve 1980'li yıllarda Akdeniz ülkeleri levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarını yetiştirmeye başlamışlardır. Kuzey Avrupa'da ise kalkan (*Scophthalmus maximus*) ve morina (*Gadus morhua*) yetiştiriciliği geliştirilmiştir. Son yıllarda ise Akdeniz'de ton balığı yetiştirilmeye başlanmıştır (Pillay, 2005).

Avcılık yoluyla gerçekleştirilen dünya su ürünleri üretimi 1996–2005 yılları arasında 93–95 milyon ton civarındadır. Dünyada ilk üç sırayı Çin, Peru ve ABD almaktadır. Kıyı uzunluğu 8333 km olan ülkemiz avcılık yoluyla su ürünleri üretiminde yaklaşık 500 bin ton ile 32. sırada yer almaktadır (FAO, 2007). Diğer taraftan dünya akuakültür üretimi 1950'lerden itibaren artmaya başlamış ve bu artış 1990'lı yıllardan

sonra katlanarak 2006 yılında 56 milyon tona ulaşmıştır. Dünyanın sınırlı kaynaklarına karşı nüfus artışı devam etmektedir. Artan nüfusun protein ihtiyacını karşılamada avcılık yoluyla üretim yetersiz kalmaktadır. Bu sebepten dolayı su ürünleri kültür üretiminin önemi daha da artmakta ve vazgeçilmez duruma gelmektedir.

Kalkan balığı yetiştiriciliği çalışmaları 1970'lerde İngiltere'de, daha sonra Fransa ve İspanya'da başlamıştır. 1992'de kalkan balığı üretiminin % 50 civarında artmasına karşın ticari satış ağının güçlendirilememesinden dolayı bu sektörde bir kriz meydana gelmiştir. Bu krizin bir diğer nedeni de kalkan balığı çiftliklerinin küçük olması ve maliyetlerin yüksek olmasıdır. Sektör bu krizden sonra yeniden yapılanmaya başlamış ve bunun sonucu olarak üretim miktarında ve üretim yapan ülkelerin sayısında artış meydana gelmiştir. Avrupa kalkan balığı üretimi 1985'te 40 tondan hızla artarak 2005 yılında 6800 tonun üzerine çıkmıştır (URL-1).

Atlantik kalkanının biyoekolojisi, yavru üretimi ve kültür araştırmaları özellikle İngiltere, Fransa ve İspanya'da çalışılmıştır. Son yıllarda ticari olarak Avrupa, Şili ve Çin'de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Lei Jilin ve ekibi (Yellow Sea Balıkçılık Araştırma Enstitüsü, Qingdao, Çin) ilk olarak 1992'de kalkan balığı yavrularını İngiltere'den Çin'e getirmişlerdir. Bu tarihten sonra Çin'de kalkan balığı üzerinde çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Çin'de ilk deneysel yavru üretimi ise 1996 yılında gerçekleştirilmiştir. 1999 yılından sonra üretilen larvalar ile Çin'in özellikle güney bölgelerinde yetiştiricilik çalışmaları başlamıştır (Ma ve ark., 2006). Karadeniz kalkanının yavru üretimi ilk olarak 1990'da Rusya Federasyonu'nda yapılmış (Maslova, 2002) ve daha sonra 1997'de Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SÜMAE)'nde yavru üretim tekniklerinin geliştirilmesi çalışmaları başlamış (Hara ve ark., 2002) ve halen devam etmektedir.

Kalkan balığı üreticisi ülkelerin başında gelen İspanya'nın yıllık üretimi 1998'den itibaren artarak 2005'de 4275 tona ulaşmıştır. Bu değer dünya üretiminin % 70'ini oluşturmaktadır. Fransa'nın kalkan balığı üretimi 1993'te 150 ton iken 1997'de 980 tona çıkmış, 2005'de 800 ton olmuştur. Bu yıllarda Portekiz'in üretimi ise ortalama 540 ton/yıl düzeyindedir. Avrupa'da bu ülkelerden başka Hollanda, İrlanda, İzlanda ve Norveç de kalkan balığı üretimi yapmakta olup (URL-2) son dönemlerde Şili ve Çin de kalkan balığı üretimi yapan ülkeler arasına katılmıştır.

Türkiye'de 2005 yılında 38 408 ton levrek, 28 463 ton çipura ve 57 659 ton alabalık olmak üzere yetiştiricilik üretimi toplam 128 943 tondur (TÜİK, 2007). Türkiye'de son yıllarda yeni türlerin yetiştiriciliğine ilgi artmaktadır. Kalkan balığı yetiştiriciliği

çalışmaları Japonya Uluslararası İşbirliği Ajansı (JICA) ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ortak çalışmasıyla Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 1997 yılında "Karadeniz'de Kültür Balıkçılığının Geliştirilmesi" projesiyle başlamıştır. Bu projeyle kalkan balığının yavru üretim tekniklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. 10 yıldır kalkan balığını kültüre alma faaliyetleri başarıyla yürütülmektedir. Üretilen kalkan balıklarından bir kısmı stokların zenginleştirilmesi için yapılan pilot çalışma çerçevesinde markalanarak doğaya bırakılmış, bir kısmı deneme üretimi amacıyla özel sektöre verilmiş, bir kısmı araştırma yapılması amacıyla üniversitelere verilmiş, bir kısmı da damızlık stoku oluşturmak ve çeşitli araştırmalar yapmak amacıyla SÜMAE'nde muhafaza edilmiştir.

Kalkan balığı avcılık yoluyla üretimi 1967'den 2006 yılına kadar 300 ton ile 5398 ton arasında değişim göstermekle birlikte ülkemiz deniz balıkları avcılığı içindeki payı % 0.1 dir. Kalkan balığının avcılık yoluyla üretiminin % 91'i Karadeniz bölgesinden sağlanmaktadır (TÜİK, 2007).

1.2. Kalkan Balığının Sistematikteki Yeri ve Morfolojisi

1.2.1. Sistematikteki yeri

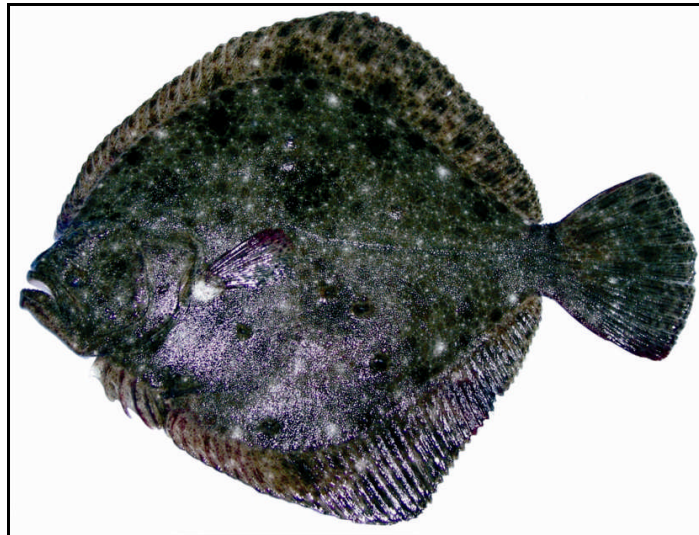
Sınıf	: Kemikli balıklar (<i>Osteichthyes</i>)
Alt sınıf	: Işın yüzgeçliler (<i>Acanthoptergii</i>)
Bölüm	: Hakiki kemikli balıklar (<i>Teleostei</i>)
Takım	: Yassı Balıklar (<i>Pleuronectiformes</i>)
Aile	: Kalkan Balıkları (<i>Scophthalmidae</i>)
Cins	: <i>Psetta</i> (<i>Scophthalmus</i>)
Tür	: <i>Psetta maxima</i> (Linnaeus, 1758) : <i>Scophthalmus maximus</i> , <i>Psetta maxima maeotica</i>

14 aile ve 716 türü içine alan yassı balıklar (Munreo, 2005) takımının bir üyesi olan kalkan balığının sistematikteki yerine ilişkin çeşitli çalışmalar olmasına rağmen isimlendirmede tam birlik sağlanamamıştır. Karadeniz kalkan balığının Atlantik kalkanından morfolojik olarak farklı olduğu (vücudun her iki yanındaki kemiksi dikenlerden dolayı) ancak taksonomik olarak aynı oldukları bildirilmiştir (Amoaka ve ark., 2001; Nielsen, 1986). Karadeniz kalkanı, Amoaka ve ark., (2001) tarafından *Psetta maxima* olarak ifade edilirken, Froese ve Pauly (2007), tarafından *Psetta maxima maeotica*

olarak isimlendirmektedir. Chanet (2003), Karadeniz’de yaşayan kalkan balığının *Psetta maxima maeotica* olarak ifade edildiğini bildirmektedir. Bununla birlikte aynı yazar Karadeniz kalkanının *Scophthalmus maximus* ile aynı tür içinde değerlendirilmesinin en ılımlı yaklaşım olduğunu ifade etmektedir. Amoaka ve ark., (2001) Karadeniz’de iki alt türden bahsetmişler fakat bu alt türlerin kolayca ayırlamayacağını bildirmişlerdir. Buna göre çeşitli kaynaklarda kullanılan *Scophthalmus* ve *Psetta* cins isimleri birbirlerinin sinonimleridir.

1.2.2. Morfolojisi

Kalkan balığı üstten yassı, dairesel, asimetric, gözler sol tarafta yerleşik ve küçük, ağız büyük, yan çizgiler her iki tarafta yerleşiktir. Bazılarında sayıları değişiklik arz eden tüberküller (kemiksi yapılar/çiviler) mevcuttur. Sırt ve karın yüzgeçlerinde dallanma yoktur ve bu yüzgeçler sırt ve karın bölgesi boyunca yayılmaktadırlar. Balığın vücut rengi griden siyahımsı kahverengine doğru değişiklik arz etmektedir. Balık, bulunduğu ortama göre renk değişimi göstermektedir. (Amoaka ve ark., 2001). Deri kalın ve kaygandır. Balığın sağ tarafı beyaz, bazen de kahverengi-siyah lekeler olabilir. Kalkan balıklarının bazılarında vücudun belirli ya da çeşitli yerlerine dağılmış olarak irili ufaklı koyu kahverengi veya siyahımsı noktalar, halka şeklinde lekeler veya haleler bulunur (Akşiray, 1954; Slastenenko, 1956) (Şekil 1).



Şekil 1. Karadeniz kalkan balığı, *Psetta maxima*

1.3. Dağılımı ve Biyo-Ekolojik Özellikleri

Kalkan Balığı Kuzey Afrika'dan başlayıp Avrupa'nın Atlantik kıyıları boyunca uzanan bölgede, Akdeniz'de ve Karadeniz'de görülmektedir (Liewes 1984, Amoaka ve ark., 2001).

Karnivor olan kalkan balığı yavruları yumuşakçalar ve kabuklular ile beslenmektedirler. Kalkan balıkları 10 cm boydan itibaren diğer balıkları avlamaya başlayarak beslenmelerini sürdürürler. Mezgit, kaya balıkları, barbun ve hamsi gibi birçok demersal ve pelajik balık türleriyle beslenirler. Beslenme faaliyetleri üreme döneminde azalmakla birlikte özellikle sonbaharda artarak yıl boyu devam etmektedir (Liewes, 1984).

Kalkan balıkları üremek için ilkbaharda kıyı şeridinde yakın yerlere doğru göç yaparlar Üreme faaliyetlerinden sonra tekrar derin sulara doğru hareket ederler. Kalkan balıklarının yumurtlaması su sıcaklığına bağlı olarak Nisan-Haziran ayları arasında gerçekleşmekte özellikle Mayıs ayında yoğunlaşmaktadır (Slastenenko, 1956; Genç ve ark., 1998).

Karadeniz'deki kalkan balıklarının ilk eşeyssel olgunluk yaşı, çeşitli bilim adamlarınca farklı olarak bildirilmektedir. Bulgaristan kıyılarında yapılan bir araştırmada, kalkan balıklarının 2 yaşında da eşeyssel olgunluğa ulaşabildikleri, ancak eşeyssel olgunluğun daha çok 3 ve 5 yaşlarında meydana geldiği saptanmıştır (Ivanov ve Beverton, 1985). Genç vd. (1998)'ne göre ise dişi balıklar 4 yaşında Mart-Haziran aylarında üremeye başlamaktadırlar.

Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Deniz Balıkları Kuluçkahanesi şartlarında tutulan dişi balıkların bazılarında 24 aylık iken doğal yolla yumurta alınmıştır (Hara ve ark., 2002).

Doğadan yakalanan kalkan balıkları yakalandıklarından 2 yıl sonra ve en az erkekler 2,5-3 kg ağırlıkta dişiler ise 3,5-4 kg ağırlıkta üremeye başlarlar. Kuluçkahanede üretilen dişi balıklar ise 4-5 yaşında (2,5 kg) ve erkekler ise 3-4 yaşında (>2 kg) gamet vermeye başlarlar. Doğal koşullar uygulandığında erkeklerden kasım ayından eylül ayına kadar sperm elde edilebilmektedir. Dişilerin gonad gelişimi mart sonu nisan başı gibi başlamaktadır. Yumurta elde edilmeye mayıs ortasında başlanmakta ve ağustos başına kadar sürmektedir. Kalkan balığı, yumurtalarını üreme dönemi içinde, partiler halinde bırakan bir türdür (McEvoy, 1984; Devauchelle, 1988).

Nasır ve Poxton (2001)'a göre kalkan yavruları yerleştirildikleri ince kumlu, kumlu, çakıllı ve kalın çakıllı tank zeminlerinde saklanmak için ince kumlu zeminleri tercih

etmektedirler. Ayrıca doğadaki balıklar aktif olmasına karşın kuluçkahanede yetiştirilen balıklar evcilleşme sürecinde pasiftirler.

1.4. Kalkan Balığı Yetiştiriciliği

Kalkan balığı yetiştiriciliği çalışmaları 1970'lerde İngiltere'de (İskoçya) daha sonra Fransa ve İspanya'da başlamıştır. 1990'ların başında kalkan balığı yavru üretim tekniklerinin gelişmesi, üretim miktarı ve işletme sayısının oldukça artmasını sağlamıştır.

Damızlık balıklar doğadan ve yetiştiricilikten temin edilebilmektedir. Yumurta alımını kontrol etmek için LHRH-a (Hara ve ark., 1998) ve GnRh-a hormonu (Mugnier, 2001) pelet halinde dişilere uygulanmaktadır. Kalkan balıklarından üretimde kullanılacak miktarda döllenmiş yumurta doğal yumurtlama ve döllenme yolu ile elde edilmemektedir (Aydın ve ark., 2003). Bundan dolayı suni döllenme için sağım yapılmaktadır (Chereguini, 1999). Yumurtaların suni olarak döllenmesinde kuru, yarı kuru ve yaş döllenme metotları kullanılmaktadır (Chereguini ve ark., 1999; Hara ve ark., 2002; Maslova, 2002; Kjørsvik ve ark., 2003).

Larva üretiminde, *Isochrysis galbana* – *Tetraselmis sp.* karışımı (Kjørsvik ve ark., 2003) ve *Nannochloropsis sp* gibi alg türleri yeşil su tekniğinin sağlanması ve rotiferlerin beslenmesi için kullanılmaktadır. Yumurtadan çıktıktan 2 gün sonra tanklara, 10 adet /ml olmak üzere rotifer (*Brachionus sp.*) ilave edilmektedir (Moteki ve ark., 2001). Larvalar 2. günden 30. güne kadar rotifer ile 10. günden 45. güne kadar *Artemia* ile daha sonra ticari toz yemler ile beslenmektedir (Şahin, 2001).

Kalkan balığı larvalarının 16–19°C'de, 70 günlük büyüme döneminde morfolojik gelişimleri üç bölüme ayrılmaktadır. Yumurtadan çıkıştan sonraki 0–2 gün önlarva safhasıdır. Bu dönemde yeni çıkmış larvanın boyu 2.5 mm, gözleri renklenmemiş, ağız açılmamış ve anüs oluşmamıştır. Larvalar su yüzeyine yakın baş aşağı suda asılı olarak dururlar. 3–29. günler post larva safhasıdır. Larvaların gözlerinin renklenmesi, ağız ve anüs açılması üçüncü günde gerçekleşmektedir. 4. günde ilk yem alımı, on ikinci günde ise aktif yem alımı başlamaktadır. Dorsal ve anal yüzgeç ışınları yirmi beşinci günde tamamlanmaktadır. 30–70. günler arası larval evreden yavru evresine geçiş dönemi olup göz göçü başlamakta, balık tank dibine yönelmektedir. 51. günde pektoral yüzgeçteki ışın sayısının ergin bireyinki gibi tamamlandığı gözlenmektedir. Kalkan balıklarının yaşam oranı 0–40. günlerde yaklaşık % 10, 40–110 günlerde ise % 75'in üstündedir. Kalkan

yavrularında renk bozukluğu, gözün göç edememesi, solungaç kapağının kapanmaması gibi anormallikler görülmektedir (Çiftçi ve ark., 2002).

Yumurtadan yeni çıkmış larvalar 20 adet/litre yoğunluğunda stoklanmaktadır. Kullanılan su 5 µ'luk filtreden geçirilmekte ve UV ile sterilize edilmektedir. Dördüncü günden itibaren su değişimine, tank sifonlanmasına ve yağ uzaklaştırıcının (yüzey tarayıcı) kullanılmasına başlanmaktadır (Şahin, 2001).

Kalkan balıklarının yetiştiriciliği ön büyütme ve büyütme olarak ikiye ayrılmaktadır. Kuluçkahanede 4-5 ayda yaklaşık 10 g ağırlığa ulaşan balıklar 50-60 g ağırlığa ulaşacakları 4-5 aylık bir dönem için ön büyütme alınmaktadır. Bu dönemde stok yoğunluğu 10 kg/m² olarak başlamakta ve 30 kg/m²'ye kadar çıkmaktadır. Ön büyütme sonunda ilk boylama yapılmaktadır. İşletmeler arasında değişmekle birlikte hastalıklara karşı balıklara aşı yapılmakta, kullanılan yetiştiricilik suyu UV ile muamele edilmekte ve periyodik olarak ayda bir formalin banyosu uygulanmaktadır. Bu dönemde balıkların büyümesi su sıcaklığı başta olmak üzere çevre şartları ve yavru kalitesine bağlı olarak değişmektedir. Dokuz ay sonunda 200 g ağırlığa ulaşan işletmeler olduğu gibi 60-75 g ağırlıkta kalanlar da vardır. En yüksek risk balık ölümleridir. Su kalitesinin iyi olduğu şartlarda yaşam oranı % 75-85'dir. Bu dönemde 0,8 yem değerlendirme oranı sağlanmaktadır (Person Le-Ruyet, 2002).

Kalkan balıklarının büyütme döneminde karaya kurulu açık yada kapalı devre yetiştiricilik sistemleri kullanılmaktadır. Yüzer kafesler deneme mahiyetinde kullanılmış, uygun olmadıkları görülmüş ve terk edilmişlerdir (Person Le-Ruyet, 2002; Aksungur ve ark., 2003). Yetiştiricilik sisteminde uygulanan stok yoğunluğu 300 g balıklar için 30-35 kg/m², 750 g ve daha ağır balıklar için 45 kg/m²'dir. Kalkan balıkları tank tabanını kullanır ve genellikle birbiri üzerine yatarlar bundan dolayı yüksek yoğunlukta stoklanabilirler. Yetiştiricilikte en az iki kez boylama yapılmalıdır. Yemlemede yüzer yemler tercih edilmektedir. Elle serbest yemleme yapılmalı ve balıklar yemlendikten bir saat sonra yemmeyen yemler sifonlanmalıdır. Büyütme döneminde beklenen yem değerlendirme oranı 1,2-1,3 tür. Kalkan balıkları genellikle 3 yılda 3 kg ağırlığa ulaşmaktadır. Su sıcaklığı kalkan balığı yetiştiriciliğinde önemli bir faktördür. 14-18 °C'de 3 yılda 2-2,5 kg ağırlık elde edilirken, 9-19°C' de 3 yılda 1-1,5 kg ağırlığa ulaşılmaktadır (Person Le-Ruyet, 2002).

Balıkların büyümesi üzerinde ekolojik faktörler sınırlayıcı ve belirleyicidir. Sıcaklık, tuzluluk ve ışık bilinen belirleyici faktörlerdir. Atlantik kalkanında optimum

büyüme 10 g ağırlıktaki bireyler için 16–20°C ve 40–50 g bireyler için 16–19 °C dir. 14°C'nın altındaki ve 20°C'nın üzerindeki sıcaklıklarda büyüme yavaşlar ve durur. Su yüzeyinde 200 lüks ışık büyümede ve yem alımında olumsuz etki yaratmamaktadır. Maksimum büyüme için gerekli olan minimum oksijen miktarı 6mg/l dir. Oksijen miktarı 3 mg/l olduğunda büyüme durmaktadır ve öldürücü konsantrasyon 0.75–1.3 mg/l dir. (Person Le-Ruyet, 2002). Kalkan balıkları % 10 gibi çok düşük tuzlu ortamlara adapte edilebilirler. 3 g'lık balıklar da % 19 tuzluluktaki büyüme % 35 tuzluluktaki büyümeye göre % 8 daha yüksektir. 18–22°C su sıcaklığı ve % 20 tuzluluk yavru yetiştiriciliği için uygundur (Imsland ve ark., 2001).

Kalkan balıklarında büyüme döneminde bireysel farklılıklar görülmektedir, bu farklılıkların sadece yetiştiricilik şartları ile açıklanması yeterli olmayabilir. Cinsiyet, bireysel büyüme farklılığını oluşturan etkenlerdendir. Kalkan balıklarının dişileri erkeklerinden daha büyüktür. Büyüklük farkı 500 g dan itibaren görülmeye başlar ve yaş ilerledikçe devam eder. Erkek balıklar 2 yaşında, dişilerden 1 yıl önce ve 1 kg dan daha düşük ağırlıkta cinsel olgunluğa ulaşırlar. Bu durum, balığın pazar boyuna ulaşmadan önce cinsel olgunluğa ulaşarak ağırlık kaybetmesini önlemek için tüm dişi ve/veya steril stok üretimine olan gereksinimi gösterir. Bunun yanında aynı amaç için cinsi olgunlaşmanın geciktirilmesi veya geç cinsi olgunluğa ulaşan bireylerin yetiştiricilik amaçlı seleksiyonu da uygulanabilir. Kalkan balıkları için yüksek protein düşük yağ içerikli beyaz balık unundan elde edilmiş yüzer pelet yemlerin kullanılması büyümeyi etkilemektedir (Person Le-Ruyet, 2002).

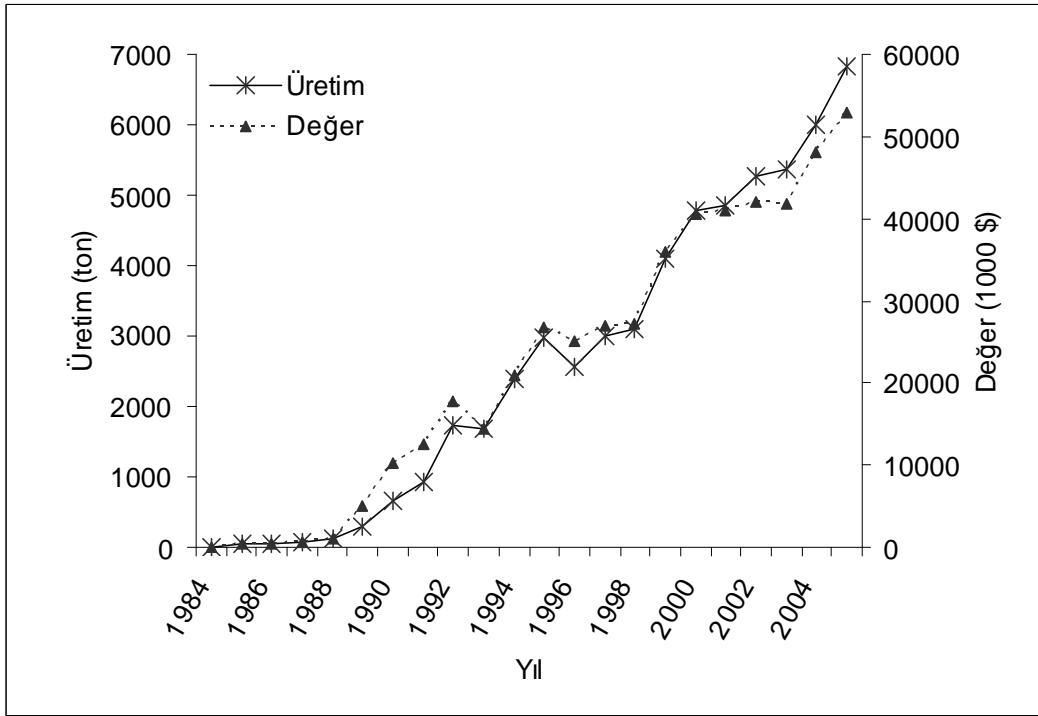
1.5. Ekonomik Önemi

Kalkan balığı dünya üretiminin 2004'deki ticari değeri 50 milyon dolar civarındadır. Üretimin artmasına karşın pazar fiyatında bir düşüş olmadığı görülmektedir (Şekil 2) (URL-2). 3–4 kg ve daha büyük balıklara özellikle İspanya'da talep olmakta ve yüksek fiyattan satılmaktadır. Kalkan 0.5 kg'dan 4 kg ağırlığa kadar pazarlanabilmektedir. Ağırlık artıkça pazar değeri artmaktadır. Yetiştirilen kalkan balıkları genellikle bütün ve taze olarak satılmaktadır. Büyük balıklar fileto halinde satılabildiği halde bu tip satış yapan marketler halen çok azdır. Fakat gelecekte bu tip pazarlamanın daha da gelişme göstereceği beklenmektedir. Kültür balıklarının çoğunluğu ortalama 1 kg (0,8–1,5 kg) ağırlıkta pazarlanmaktadır. Fransız işletmeleri üretimlerinin % 10-20'si büyük balık olarak pazarlanmaktadır (Person-Le Ruyet, 2002). Kalkan balığının satış fiyatı balık ağırlığı

artıkça artmaktadır. Ocak 2007 tarihinde İspanyada kültür kalkanın 1 kg fiyatı, 1–2 kg/adet için 10.40, 2–3 kg/adet için 12.40 ve 3–4 kg/adet için 17.40 avrodur (URL-3).

Asya ülkelerinde ve bazı Avrupa ülkelerinde canlı kalkan balığına olan talepteki artış bu tip pazarlamaya işletmelerin ilgisini artırmaktadır. Özel ön hazırlık ve ambalajlama ile kalkan balıkları susuz olarak 2 gün yaşayabilmektedir. Susuz nakilde, 18 saat sonra % 85'in üzerinde balık hayatta kalabilmektedir (Person-Le Ruyet, 2002).

Karadeniz'de en fazla avlanan ekonomik dip balıkları mezgit, barbunya ve kalkan balığıdır. Kalkan balığı adı geçen diğer balıklara göre daha değerli olup 2005 yılında taze-soğutulmuş 1030 kg kalkan balığı ihraç edilmiştir (TÜİK, 2007).



Şekil 2. Kalkan balığının Avrupa kültür üretim miktarı ve pazar değeri (URL-1).

Karadeniz'de en fazla avlanan ekonomik dip balıkları mezgit, barbunya ve kalkan balığıdır. Kalkan balığı adı geçen diğer balıklara göre daha değerli olup 2005 yılında taze-soğutulmuş 1030 kg kalkan balığı ihraç edilmiştir (TÜİK, 2007).

1.6. Balık Yetiştiriciliğinde Yumurta Kalitesi

Kaliteli yumurta elde etmek başarılı balık üretimi için zorunlu ve önemli bir gereksinimdir. Kuluçkahane şartlarında balıklardan doğal yolla yumurta elde edilebildiği gibi, sağımlı yolla da yumurta elde edilmektedir. Yumurtalar ve bu yumurtalardan elde edilecek yavruların yüksek kalitede olması önemlidir. Kaliteli yumurta; yüksek dölleme ve yumurtadan çıkış oranı sergileyen, larva döneminde yüksek yaşama kabiliyeti olan, sağlıklı ve hızlı büyüme potansiyeline sahip larvaların üretilebildiği yumurtalar olarak tanımlanabilir.

Yumurta kalitesini etkileyen iç (yumurtaya ait) ve dış (çevresel) faktörler hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Damızlık balığın genetik yapısı, beslemede kullanılan yem, stres, kötü su kalitesi veya yumurtanın aşırı olgunlaşması yumurta kalitesinin düşük olmasının nedenlerinden sayılabilir (Kjørsvik, 1990; Brooks ve ark., 1997; Okumuş, 2003).

Yumurta kalitesi, ticari kuluçkahaneler için önemli bir parametre olup üretilen larvaları sayı ve kalite yönünden sınırlandırabilir. Kuluçkahaneler, damızlıkların performanslarını değerlendirmek, iş gücü ve kuluçka tankları gibi kaynakların etkin kullanımı için yetiştiricilik sistemlerinde kullanacakları yumurtaların kalitelerini değerlendirmeye yönelik pratik yöntemlere ihtiyaç duyarlar (Shields ve ark., 1997). Yüksek yumurta kalitesinden elde edilebilecek olumlu sonuçlar yetiştiricilik koşullarından ve çevre şartlarından dolayı maskelenebilmektedir (Bromage, 1995).

Ticari kuluçkahanelerde yumurta kalitesini değerlendirmek için yumurtanın yüzmesi (Lahnsteiner ve Patarnello, 2004), yağ damlacıklarının sayısı ve blastomer morfolojisi (Shields ve ark., 1997), dölleme ve çıkış oranı gibi kriterler kullanılmaktadır. Ayrıca *Gadus morhua* 'da yumurta büyüklüğü (Knutsen ve Tilseth, 1985), *Melanogrammus aeglefinus*'da yumurtanın kuru madde oranı (Trippel ve ark., 2000) yumurta kalite kriteri olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında kahverengi alabalık *Salmo trutta fario* 'da yağ damlacıklarının dağılımı incelenerek kötü ve iyi yumurtalar seçilebilir (Mansour, 2007). Bir başka yöntem ise yumurtası kullanılan her anaç balığa ait dölleme oranları ve larva performansları kayıt altına alınarak en iyi performansı sergileyen anaçlar tespit edilmesidir (Bromage, 1995).

Bu çalışmalardan yumurta kalite göstergelerinin türe özgü olduğu görülmektedir. Bununla birlikte son yıllarda Alp alası (*Salvelinus alpinus*) (Svavarsson ve Jónsson, 2000), Sibirya mersini (*Acipenser baeri*) (Gisbert ve ark.,2000), Atlantik morinası (*Gadus*

morhua) (Zhao ve ark., 2001) gibi türlerde yapılan çalışmalar yumurta büyüklüğü ile yaşam oranı arasında ilişki olmadığını ortaya koymuştur.

Yumurta kalitesini belirlemede kullanılan metotların kuluçkahanelerde uygulanabilmesi için, erken dönemde kalite tespiti yapılabilirdir. Böylece kötü kaliteli gruplar kuluçkahaneyi daha fazla işgal etmeden imha edilebilir (Bromage, 1995; Rideout ve ark., 2004).

Hücre bölünmesi birçok türde yumurta kalitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Erken embriyogenez bir seri mitoz bölünme ile gerçekleşir. Bu durumda eşit büyüklükte simetrik hücreler meydana gelir ki bunlar blastomer olarak adlandırılırlar. Çoğu deniz balığının yumurtaları şeffaftır ve bu özelliklerinden dolayı blastomer morfolojilerinin incelenmesi oldukça kolaydır. Hücreler bölündüklerinde ortaya çıkan normal dışı hücre görünümleri anormal blastomer morfolojisi olarak ifade edilirler (Rideout ve ark., 2004). Anormal blastomere sahip yumurtaların açılma oranları normal blastomere sahip yumurtaların açılma oranlarından daha düşüktür (Mc Evoy, 1984; Kjörsvik ve ark., 2003).

Yumurtaların erken dönem hücre bölünmeleriyle ilgili birçok çalışmada detaya inilmemiştir. Shield vd. (1997)'de ifade edildiği gibi anormallikler birçok değişik tipte ortaya çıkmaktadır. Bunlar asimetrik hücre pozisyonu, büyüklükleri eşit olmayan hücreler, hücrelerin birbiriyle temas yüzeyinin az olması, hücre bölünme çizgisinin belirgin olmaması, hücreler arasında boşluk benzeri yapıların görülmesidir. Bu anormallikler ayrı ayrı ele alınmadığında her birinin etkisi tam olarak ortaya konamamıştır.

Shield vd. (1997) Atlantik halibutunda (*Hippoglossus hippoglossus*), Rideout vd. (2004) morinada (*Melanogrammus aeglefinus*), Valin ve Nissling (1998) ve Rani (2005) Atlantik morinasında (*Gadus morhua*) blastomer morfolojisini detaylandırarak değerlendirmiştir.

Kalkan balıklarının larval yaşam oranı düşüktür (Devauchelle ve ark., 1988). Karadeniz kalkanı ile Atlantik kalkanının ilk aydaki ölüm oranları birbirine benzemektedir. İlk yoğun ölümler larva çıkışından 3–4 gün sonra başlamaktadır. Bu dönemde ölen larvaların önemli kısmını anormaller oluşturmaktadır. Karadeniz kalkanın yaşam oranı yumurta ve larva kalitesi, uygun larval yem ve büyütme tankındaki su kalitesi ve hijyen tarafından belirlenmektedir. Yumurta ve larva kalitesi döllenme ve çıkış oranları ile tahmin edilmektedir. Yüksek döllenme ve çıkış oranına (>% 75) sahip larvaların yetiştiricilik için uygun olabileceği düşünülür. Anormal larva oranı da kalite kriteri olarak

değerlendirilebilir. Bir diğer yöntem ise yumurtaların bir boyaya batırılması ve boyanın yumurta tarafından emilmesi temeline dayanır. Renklenen yumurtaların oranı ve rengin tonu kullanılarak yumurta kalitesi tahmin edilmeye çalışılır (Maslova, 2002).

Atlantik kalkan balıklarında yumurta dölleme oranı ile yaşam oranı ve normal blastomer oranı ile metamorfoz tamamlama ve normal pigmentasyon arasında pozitif ilişki bulunmuştur. Genel olarak dölleme oranının yüksek olduğu gruplarda normal blastomer yüzdesi, yaşam oranı ve metamorfoz tamamlama ve pigmentasyon başarısı yüksektir (Kjørsvik ve ark., 2003). Karadeniz kalkanında dölleme oranı ile çıkış oranı arasında ilişki gözlenmemiştir (Aydın ve Polat, 2007).

1.7. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Triploidi

Poliploidi, organizmaların ilave olarak bir veya daha fazla kromozom setine sahip olmaları şeklinde tanımlanabilir. Normal (diploid) balıkların hücre çekirdeklerinde $2n$ sayıda kromozom, triploid balıkların hücre çekirdeklerinde ise $3n$ sayıda kromozom bulunmaktadır. Kendiliğinden oluşan poliploidiye bazen doğada rastlanabilir. Poliploidi, özellikle triploidi bazı omurgasızlarda ve bazı düşük omurgalılarda kolayca uygulanabilir ve yaşayan canlılar üretilebilir. Avrupa Birliği mevzuatına göre (90/220/CEE 23 Nisan 1990) poliploidi, genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) olarak mütalaa edilmez (Piferrer ve ark., 2006).

Balıkların birçoğunda dış dölleme gerçekleşmektedir. Bu da kromozom sayılarında değişiklik yapmaya izin verir. Thorgaard (1983), poliploid balık üretmek için kromozom manuplasyonları 1970'lerin ortalarından itibaren araştırılmaya başlandığını rapor etmiştir. İlk yıllarda çalışmalar salmonlar ve üzerinde yoğunlaşmıştı. Doğal olarak triploid oluşumu ilk kez gökkuşuğu alabalığında Cuellar ve Uyeno (1972) tarafından rapor edilmiştir (Dillon, 1988).

Yetiştiriciliği yapılan türlerin çoğu triploidi uygulamasına uygundur. Büyük yumurtaya sahip balıklarda, sıcaklık şokuyla yapılan uygulamaların sonuçlarında farklılıklar görülür. Bu durumda, basınç uygulaması ve tetraploidler ile diploidlerin çaprazlanması türe bağlı olarak daha güvenilir sonuçlar verebilir. Soğuk şok ve basınç uygulaması küçük yumurtalı balıklar (sazanlar, deniz levreği, kalkan, çipura) için uygundur (Piferrer ve ark., 2006).

Triploid uygulanacak yumurtanın kalitesi, en iyi yaşam oranının elde edilmesi ve üretimin optimize edilmesi için çok önemlidir. Triploid uygulaması, kötü kaliteli

yumurtada, ikinci mayoz bölünmenin başlatılması için gerekli zamanı farklı seviyelerde ortaya koyar. Bu da triploid uygulamasının etkisinin azalmasıyla sonuçlanır. Özellikle uygulama zamanı, süresi, yoğunluğunun tam olarak belirlenmesi ve uygulanması gerekir (Piferrer ve ark., 2006).

Triploid organizmanın steril oluşu ve doğal popülasyona kaçmasıyla oluşacak genetik etkinin sınırlı oluşundan dolayı çeşitli uluslararası organizasyonlar (NASCO, FAO, ICES) tarafından yetiştiricilikte ve balıklandırmalarda kullanılması tavsiye edilmektedir. Ayrıca triploidinin kullanımı, genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) doğal stoklara bulaşması probleminin çözümü için önerilmektedir. GDO'ların doğaya açık ortamlarda yetiştiriciliğinin yapılması durumunda, organizmanın % 100 steril olarak üretilmesi ve kontrol edilmesi önemlidir. Diğer durumlarda ise yüksek oranda sterillik istenir (Piferrer ve ark., 2006).

Triploid uygulaması büyük miktarlarda yumurta için düşünülüyorsa yeterli üretim için uygun sistemin kurulması gerekir. Bazı durumlarda triploid uygulamasında gelişmenin erken dönemlerinde ölümler görülür. Triploidin uygulanmasından beklenen fayda ile yem harcamaları yapılmadan görülen bu ölümler dengelenebilir (Piferrer ve ark., 2006).

Triploid türlerin performansı türe özgüdür. Son zamanlarda satışa sunulan cinsi olgunluğa ulaşmış istiridye ve salmonların organoleptik kalitelerini devam ettirmek veya arttırmak için işletmelerde triploid uygulaması yapılmaktadır. İstiridyelerde triploid, yaşama ve büyüme oranını artırır. Balıklarda (kalkan ve salmon) ise, triploid uygulama ile diploidlerin cinsel olgunluğa erişmeleriyle ortaya çıkan büyümenin baskı altına alınması engellenir ve bu dönemde görülen ölümler azalır. Yetiştiricilik şartlarının ideal olması durumunda triploidlerin performansı ile ilgili sorun yaşanmaz, fakat kötü yetiştiricilik şartlarında diploidlerden daha düşük performans sergilerler (Piferrer ve ark., 2006).

Ticari yetiştiricilik yapan işletmelerde balıkların satıştan önce cinsel olgunluğa ulaşmaları bir sorundur. Cinsel olgunluğa ulaşmış balıkların büyümeleri yavaşlamakta, et kaliteleri bozulmakta ve yüksek ölüm oranları görülmektedir. Steril triploid balıkta gonad gelişmeyeceği için balığın büyümesi duraksamadan devam edecek, et kalitesinde bozulma olmayacak ve ölümler azalacaktır (Gjedrem, 2005).

Yapılan çalışmalar da triploidlerde gametogenezin görülmediği ortaya konmuştur. Balıklarda tamamen steril dişiler oluşurken, erkeklerin testislerini geliştirebildikleri ve Atlantik salmonu gibi türlerin dölleme özelliği olmayan sperm ürettikleri görülmüştür. Kalkan, levrek ve çipura gibi türlerin triploid erkekleri ise sperm üretmezler. Triploid ile

tam sterillik elde edildiğini ortaya koymak için bir birini izleyen iki üreme döneminde ele alınan türde gonad gelişiminin görülmemesi gerekir (Piferrer ve ark., 2006).

Tetraploidinin elde edilmesi teorik olarak mümkündür ancak pratik olarak oldukça zordur. Yaşayabilen tetraploidler sadece Pasifik istiridyesinde ve gökkuşuğu alabalığında elde edilmiştir. Pasifik istiridyesinde diploid ile tetraploidlerin çaprazlanması ile % 100 triploidler elde edilmiştir (Piferrer ve ark., 2006).

1.7.1. Triploid oluşturma mekanizması

Triploid balık üretimi, fiziksel ve kimyasal uygulamalar veya tetraploid ve diploid balıkların çaprazlanması sonucu elde edilmektedir. Yumurta ve spermin bir araya gelmesiyle döllenme gerçekleşmiş olur. 2. kutup hücresinin hücre içinde kalmasını sağlamak ve döllenmiş hücrenin ilk bölünmesini engellemek için döllenmeden kısa bir süre sonra döllenmiş yumurtaya sıcaklık veya basınç şoku uygulanır. Bu uygulamalara bağlı olarak triploid veya tetraploid balık üretimi gerçekleştirilir (Şekil 3) (Gjedrem, 2005).

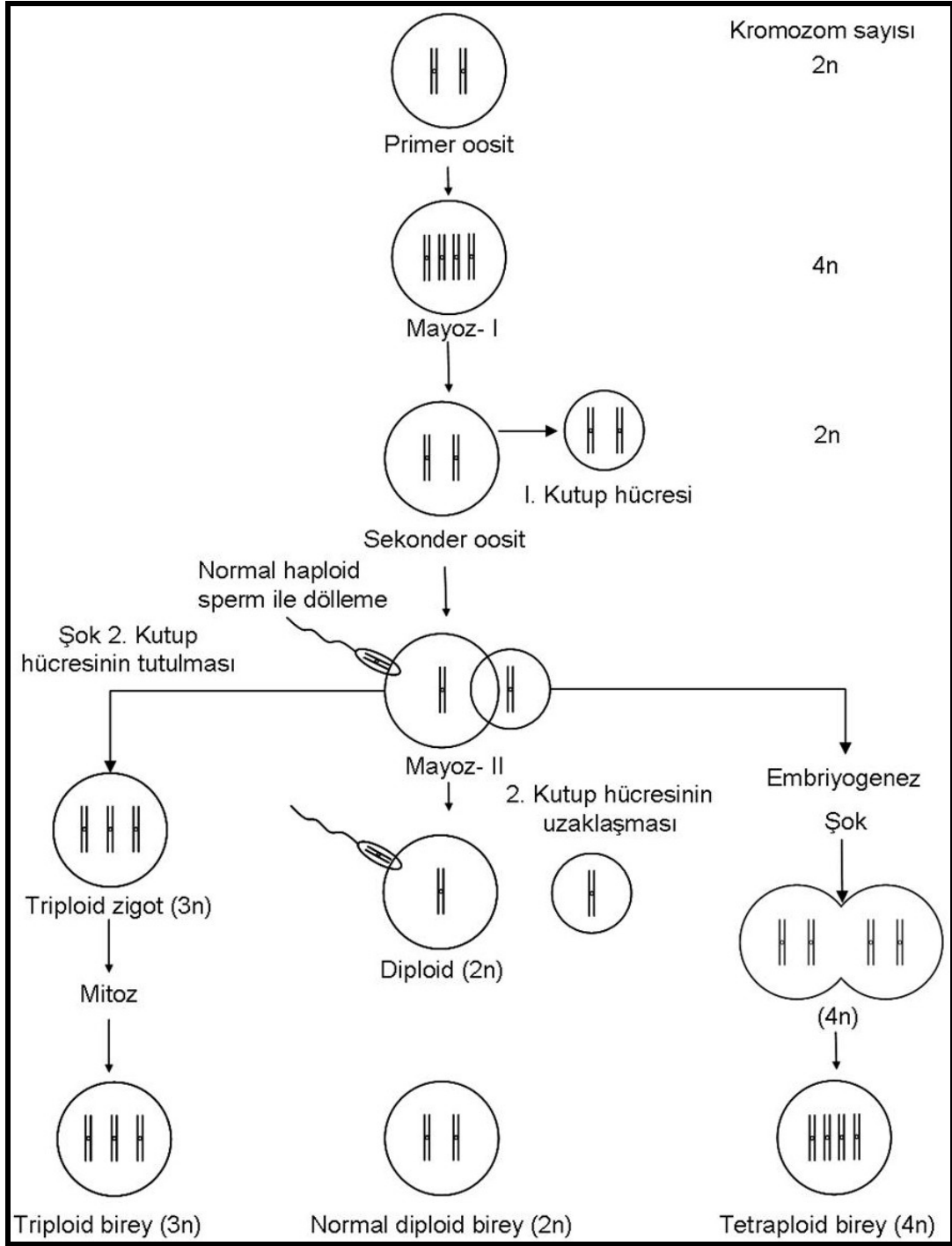
1.7.2. Triploidizasyon uygulamasında kullanılan yöntemler

Triploid birey yaygın olarak basınç, kimyasal ve sıcaklık şoklarından birinin döllenmiş yumurtalara uygulanması ile üretilmektedir.

Yaygın olarak 5 000 den 10 000 psi ye kadar olan hidrostatik basınç kullanılmaktadır. Barfin pisi (*Verasper moseri*) balıklarında 0,650 N/m² lik basınç, döllenmeden 6 dakika sonra, 6 dakika süreyle uygulanmıştır (Mori ve ark., 2006). Deniz levreklerine 2 dakika süre ile 8 000 psi (Peruzzi ve Chatain, 2000), sazan balıklarında 7116 ile 8225 psi (Linhart ve ark., 1991), Alp alası (*Salvelinus alpinus*) balıklarında döllenmeden 200, 250, 300 veya 350 derece dakika sonra 5 dakika süre ile 9500 psi (Loopstra ve Hansen, 2006) olarak uygulanmıştır.

Kabuklulara uygulanan kimyasal şoklarda Sitokalsin B kullanılmaktadır (Troup ve ark., 2005). Mallia vd. (2006), istiridyede, Sellars vd. (2006), karideste ve Liu vd. (2004) tarakta triploid oluşturmak için 6-dimetilaminopurin (6-DMAP) kullanmışlardır.

Sıcaklık şoku ise oldukça yaygın olarak kullanılan ucuz ve kullanılan materyalin tehlike arz etmediği yöntemdir. Yüksek sıcaklık genellikle soğuk su türlerinde uygulanırken, soğuk şok ise ılık su türlerinde uygulanmaktadır (Beaumont ve Hoare, 2003; Özden, ve ark., 2003; Gjedrem, 2005).



Şekil 3. Balıklarda poliploidi (triploid, tetraploid) oluşumu. (Reddy ve ark., 1990'dan alınarak yeniden düzenlenmiştir)

1.8. Önceki Çalışmalar

1.8.1. Yumurta kalitesi

Ovulasyondan 30–35 saat sonra sağılan yumurta grubunun döllenme oranı %80'den fazla olsa dahi 18–20 saat sonra hepsi ölmektedir. Ovulasyondan 3 saat sonra sağılan balıkların yumurtaları kaliteli görülmektedir. Balık büyüklüğü ile balığın ovulasyon döngüsü arasında bir ilişki yoktur. Ovule olmuş kalkan yumurtasının hızlıca aşırı olgunlaştığı (over ripe), bunun da yumurta kalitesinin düşük olmasının esas sebebi olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle balıkları haftada 2 kez sağımak yerine ovulasyon zamanlarını tespit ederek sağımak kaliteli yumurta elde edilmesinde önemli olabilir (Mc Evoy, 1984),.

Devauchelle (1987), Fransa'da kuluçkahanede tutulan doğadan yakalanmış ve kuluçkahanede üretilmiş kalkan balıklarının yumurtlama davranışlarıyla ilgili çalışma yapmıştır. Bu çalışma alternatif sıcaklık ve ışık koşulları uygulandığında tüm yıl boyunca balıklardan yumurta alınabildiğini göstermiştir. Doğal yolla yumurta alımı gerçekleştirilmesine rağmen döllenmiş yumurtaların ve canlılığını devam ettirenlerin oranı çok düşük çıkmıştır. Yumurtaların çaplarının 0,98-1,19 mm arasında değiştiği, ortalama yumurta verimi doğal yolla yumurta alınanlarda 80 000-200 000 adet /kg ve sağımlı yapılanlarda 260 000-430 000 adet/kg olduğu ve anaçların bir sezon için yumurtlama sayılarının 9'dan fazla olduğu ifade edilmiştir.

Shield vd. (1997), İngiltere'de Atlantik halibutunda (*Hippoglossus hippoglossus*) blastomer morfolojisinin yumurtaların yaşama kabiliyetlerinin tahmin edilmesinde araç olarak kullanılması konusunu çalışmışlardır. Yaş döllenme ile elde edilen yumurtalar 6°C'de inkübe edilmiştir. 8'li hücre aşamasına ulaşan yumurtalar mikroskopta incelenerek tek tek kuluçka edilmiştir. Yumurtalar mikroskop altında yüksek çözünürlükte düşük ışık şartlarında gözlenmiştir. Yumurtalar asimetric hücre, hücrelerin eşit büyüklükte olmaması, hücrelerin birbiriyle temas yüzeyinin az olması, hücre bölünme çizgisinin belirgin olmaması ve hücrelerin arasında ya da etrafında boşluk benzeri yapıların olması şeklinde ifade edilen anormallik tipleri yönünden incelenmiş ve bu anormallikler anormalden normale doğru 1'den 4' e kadar numaralandırılarak değerlendirilmiştir. Döllenme oranları ile çıkış oranları arasında korelasyon görülmemiştir. Her bir anormallik tipinin görülme sıklığı ile çıkış arasında negatif korelasyon olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca yazar, oluşturulan yumurta değerlendirme tekniğinin halibut için kullanılabileceğini, fakat diğer türler için benzer çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır.

Valin ve Nissling (1998), Atlantik morinası (kod) (*Gadus morhua*) üzerinde yaptıkları çalışmada yumurta blastomerlerinde (4–32 hücre) gözlenen düzensizlikler ile yumurta yaşam başarısını incelemiştir. Beherlerde yapılan çalışma ile yumurta çıkışları takip edilmiştir. Ayrıca blastomerleri normal görünümlü ve blastomerleri düzensiz görünümlü yumurtaların resimleri çekilerek tek tek inkübe edilmişlerdir. Larvalar normal ve kıvrık olarak kaydedilmiş ve larvalar aılıktan ölene kadar takip edilmiştir. Blastomer morfolojisi ile döllenme oranı arasında ilişki bulunmamış fakat blastomer morfolojisi ile çıkış oranı arasında ilişki bulunmuştur. Normal görünümlü blastomerlerin çıkış oranı blastomerleri düzensiz olanlardan yüksek gözlenmiş ancak her iki gruptaki anormal (kıvrık) larvaların normallere oranı arasında fark bulunmamıştır. Bununla birlikte düzensiz blastomere sahip yumurtalardan elde edilen larvaların yaşama oranlarının düşük olacağına dair bir belirti olmadığı ifade edilmiştir.

Kjørsvik vd. (2003), Atlantik kalkan balığında yumurta kalitesi konusunda çalışma yürütmüştür. Yumurtalar ‰ 34 tuzlulukta ve 13°C’de inkübe edilmişler, döllenmeden sonra 8-32’li hücre aşamasında döllenme oranı ve normal blastomer yüzdesi tahmin edilmiştir. Larvalar 40 adet/litre yoğunluğunda stoklanmış ve takipleri 37. güne kadar yapılmıştır. 37. günde yavruların yaşam oranı, metamorfozu tamamlama ve pigmentasyon başarısı incelenmiştir. Döllenme oranı iki grupta % 90 ve % 95 olarak gerçekleşirken diğerlerinde % 70’den düşük bulunmuştur. Yüksek döllenme oranlarına sahip yumurta gruplarında blastomerleri normal olanların yüzdeleri % 87 ve % 94 olmuştur. Düşük döllenme görülen gruplarında blastomerleri normal olanların oranı % 40’tan daha düşüktür. Döllenme oranları ve normal blastomer yüzdesi yüksek olanların yaşama oranı, metamorfozu tamamlama ve pigmentasyon başarısı yüksektir. Sadece bir grupta blastomerleri normal olanların yüzdesi nispeten yüksek olmasına rağmen yaşama oranı hepsinden düşük bulunmuştur. Yumurta döllenme oranı ile yaşama oranı arasında pozitif ilişki ve normal blastomer oranı ile yaşam oranı ve metamorfoza tamamlama ve pigmentasyon başarısı arasında pozitif ilişki bildirilmiştir.

Rideout vd. (2004) tarafından Kanada’da *Melanogrammus aeglefinus* ile yürüttükleri çalışmada blastomer morfolojisi ile yumurta kalitesinin tahmin edilmesini çalışmıştır. ‰ 30 tuzlulukta 5–6°C’de doğal ışık rejiminde doğal döllenme ile elde edilen yumurtaları mikroskop altında incelemiş ve anormal ve normal blastomer oranlarını belirlemişlerdir. Yumurtalar 250 ml beherlerde 10 gün süreyle inkübe edildikten sonra çıkan larvalar sayılmıştır. 6 balığa ait 12 yumurta grubunda blastomer morfolojilerini;

asimetrik hücre pozisyonu, büyüklükleri eşit olmayan hücreler, hücrelerin birbiriyle temas yüzeyinin az olması, hücre bölünme çizgisinin belirgin olmaması şeklinde tasnif ederek incelemiştir. Ayrıca ana blastomer grubunun dış kısmında ortaya çıkan hücreler ve ana blastomer grubundan ayrı blastomer oluşumu gibi anormallikler de gözlenmiştir. Yumurta gruplarında her bir anormallik tipi için anormallik yüzdesi arttıkça çıkış oranları azalmaktadır. Bir yumurtada birkaç farklı anormallik tipi gözlenebilmektedir. Asimetrik hücre pozisyonuna sahip olan ve hücrelerin birbiriyle temas yüzeyinin az olması anormallikleri tek başlarına görüldüklerinde ayrı bir beherde inkübe edilmiştir. Tek başına hücrelerin asimetrik olma anormalliği ile yaşam oranı arasında ilişki olmadığı ifade edilmektedir. Bunun yanında anormalliklerden hangisinin düşük yaşam oranının nedeni olduğu tam olarak belirlenememiştir.

Rani (2005) *Gadus morhua* yumurtalarına soğuk şok uygulayarak triploid elde etme işleminin blastomer morfolojisi üzerindeki etkilerini çalışmıştır. Ayrıca yumurtada görülen anormallik tiplerinin yumurta yaşam oranı üzerine etkilerini incelemiştir. 4 farklı anacın yumurtasını kullanarak 4 deney yürütmüştür. Yaptığı çalışmada blastomerlerde görülen anormallik oranlarının soğuk şok uygulanması ile yükseldiğini bildirmektedir. Ancak yumurta yaşam oranları açısından soğuk şok grubu ile kontrol grubu arasında önemli fark görülmediğini beyan etmiştir. Bununla birlikte anormallik oranı ile çıkış arasında bir korelasyon oluşmadığı ifade edilmiştir. Çalışmasının bu türün yumurta kalitesini belirleyici olarak kullanılamayacağını sonucuna varılmıştır.

1.8.2. Triploidi

Piferrer vd. (2000), İspanya'da yaptıkları araştırmada, kalkan balığı için triploidi işlemini döllenmeden hemen sonra soğuk şok uygulanarak çalışmışlardır. İspanya'nın kuzeyindeki Vigo şehrinde 13 – 14 °C sıcaklıktaki deniz suyunda muhafaza edilen balıklardan sağım yoluyla elde edilen yumurtalar suni olarak döllenmiştir. Çalışmada bir veya iki anacın yumurtası birleştirilerek denemeler yapılmıştır. Yaklaşık 5 ml yumurta içeren cam tüpler buz parçacıkları ve deniz suyu bulunan tepsiye yerleştirilerek 0°C, 2°C, 4°C'lerde ayrı ayrı 5, 10, 20, 40 dakika sürelerde soğuk şok uygulanmıştır. Kontrol grupları için herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Oluşturulan yalancı kontrol grubu için yapılan uygulamalar soğuk şok dışında diğer grup (şok grubu) gibidir. Yalancı kontrol grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılması ile muhtemel mekanik etkilerin neden olduğu olumsuzluklar değerlendirilmiştir. Şok süresi arttıkça yaşam oranının azaldığı, bununla

birlikte düşük şok sıcaklıklarının triploid oranını yükselttiği ifade edilmiştir. 0°C’de 20 dakika süre ile uygulanan şok ile % 78,6’dan daha fazla oranda triploid (3n) kalkan elde edilmiştir. Larvaların çıkışından 1 gün sonra yapılan karyolojik çalışma ile kontrol grubu larvaların 2n=44 kromozoma ve şok grubu larvaların ise 3n=66 kromozom sahip oldukları tespit edilmiştir.

Piferrer vd. (2003), önceki çalışmalarının devamı niteliğinde olan bu çalışmada, en uygun şok zamanı ve yoğun miktardaki yumurtalarda triploid uygulamak için gerekli şartlar araştırılmıştır. Uygun zamanı tespit etmek için döllenmeden 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 dakika sonra soğuk şok uygulamaya başlanmış, 20 dakika süre ile $-0,7 \pm 0,3$ °C’ye maruz bırakılmış olup kontrol grupları için her hangi bir uygulama yapılmadan inkübatöre dökülmüştür. Triploidide en iyi değer, soğuk şokun döllenmeden 5–7 dakika sonra başlatıldığı durumlarda gözlenmiştir. Döllenmeden 6-7 dakika sonra başlayan şok ile % 90 dan yüksek triploid oranı elde edilmiştir. Bu çalışma da büyük hacimdeki yumurtalara (150–300ml) triploid uygulaması değerlendirilmiş ve 0°C’nin altındaki sıcaklık uygulamasının etkisi incelenmiştir. Değerlendirmede kullanılan toplam şok sıcaklığı ortalama şok sıcaklığı ile şok süresinin çarpımıyla elde edilmiştir. 0°C’nin altında yoğun miktarda yumurtaya yapılan uygulamanın başarısı için soğutulmuş suyun -2°C olması gerekliliği önerilmiştir. Yumurtaların çıkışı, döllendikten 5 gün sonra yaklaşık 1 gün sürmüş, yaşam oranı çıkıştan 1 gün sonra sayılan larvaların başlangıçtaki yumurta sayısına oranı şeklinde hesaplanmıştır. Yaşam oranı şoka başlama süresi uzadıkça ve şok derecesi düştükçe azalmıştır.

Mori vd. (2004), Japonya’da Barfin pisi balığında (*Verasper moseri*) triploid ve ginogenetik diploid bireyler elde etmek için soğuk şoku ve basınç şoku uygulamıştır. Yumurtalar -1,5°C’de döllenmeden 9 dakika sonra 90 dakika süre ile soğuk şoka maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda, triploid oranı % 90,9 olurken triploidlerin çıkış oranı kontrole göre % 29,2 olmuştur. Spermiler 10 mj/cm² ışınlaması ile genetik olarak etkisiz hale getirilmiştir. Ginogenetik diploid bireyler, yumurtalara döllenmeden 150–240 dakika sonra 6 dakika süre ile basınç şoku (650 kg/cm²) uygulanarak elde edilmiştir.

Mori vd. (2006), triploid Barfin pisi balığı (*Verasper moseri*)’nin yetiştiricilik performansı üzerine Japonya’da yaptığı çalışma ile cinsiyet oranı, cinsel olgunlaşma, büyüme gibi konuları irdelemiştir. Birlikte tutulan triploid balıklarda cinsiyet oranı eşit fakat ayrı ayrı tutulan triploid balıklarda dişilerin oranının daha fazla olduğu belirtilmiştir. Triploid dişilerin gonado somatik indeks (GSI)’leri yumurtlama döneminde dahi oldukça

düşük ve yumurtalıklarının gelişmemiş olduğunu ve bu nedenle triploid dişilerin steril olduğunu ifade etmişlerdir. Triploid erkeklerin ise anormal görünümlü spermatozoa ürettikleri ve döledikleri yumurtalardan yavru elde edilemediği dolayısıyla triploid erkek balıklarında fonksiyonel olarak steril olduklarını belirtmişlerdir. Triploid erkek balıkların diploid balıklardan daha yavaş büyümeekte olduğunu, benzer şekilde triploid dişi balıkların diploid dişilerden yavaş veya aynı miktarda büyüme sergilediğini rapor etmişlerdir.

Peruzzi ve Chatain (2000), deniz levreği yumurtalarında ikinci kutup hücrelerinin tutulması ile ilgili uygun şartları çalışmıştır. Araştırmacıların soğuk şok ve basınç işlemlerinin uygulama sürelerini ve uygulamanın döllenmeden sonra başlama zamanları ile ilgili belirlediği optimum şartlar; soğuk şok için, yumurtaların döllenmeden 5 dakika sonra 15–20 dakika süre ile 0–1°C de tutulmaları, basınç şoku için ise döllenmeden 6 dakika sonra 8500 psi de 2 dakika süre ile muamele edilmeleridir.

Cal vd. (2006), İspanya’da ginogenetik diploid kalkan balığında büyüme ve gonad gelişmesini çalışmıştır. Yumurtaların döllenmesinde kullanılan sperm mor ötesi ışına (30 000 erg mm⁻²) maruz bırakılmıştır. Yumurtalar, 2. polar cisimciği muhafaza edebilmeleri için 13–14 °C sıcaklıktan -1 ile 0°C sıcaklığa döllenmeden 6.5 dakika sonra 25 dakika süre ile maruz bırakılmıştır. Üretilen 33 kontrol 33 ginogenetik kalkan pit tag ile bireysel markalanmıştır. Balıklar normal üretim koşullarında büyütülmüşlerdir. Balıkların gonad gelişimleri incelenmiştir. Bu çalışmadaki kalkan balıklarının 9 aydan 36 aya kadar olan dönemdeki yaşam oranı kontrol grubunda % 96,7, ginogenetikte ise % 87,9 olarak gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda dişi:erkek oranı 1:1, fakat ginogenetikte 1E:3D, bir başka çalışmada ginogenetikte 0E:1D görülmüştür. Bu çalışma ile ginogenetik diploid kalkan balıklarının canlılıkları, büyümeleri, cinsiyet oranları ve gonad gelişimleri incelenmiş ve böylece ginogenetik diploid kalkanın biyolojik verilerinin tespit edilmesi, kültür şartlarına uyarlanması ve türün cinsiyet belirleme mekanizmaları ile ilgili bilgiler elde edilmiştir.

Cal vd. (2006), Kalkan balığında yaptıkları bir diğer çalışmada diploid ve triploid bireylerin büyüme ve gonad gelişimlerini karşılaştırmışlardır. Triploid durumunu belirlemek için 6 aylık balıklarda eritrositlerin boyutları ölçülmüştür. Kontrol grubunun eritrosit boyu $10.0 \pm 0.21 \mu\text{m}$, soğuk sok uygulanmışların boyutu ise $15.0 \pm 0.26 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Yaşama oranı 6 aydan 24 aya kadar olan sürede diploidler için % 86, triploidler için ise % 94 olarak tespit edilmiştir. 24 aydan 48 aya kadar olan sürede ise yaşam oranı diploidler için % 91 ve triploidler için % 100’dür. Bunun nedeni triploid

bireylerde gonad gelişimi dolayısıyla üreme olmadığından, üreme sezonu sonrası ölümler görülmemesidir. Diploid balıklarda 6 aydan 48 aya kadar olan sürede boy, 15.7 cm'den 51.5 cm'ye ve ağırlık 83.8 g'dan 2934.5 g'a ulaşmıştır. Triploidlerde ise aynı sürede boy olarak büyüme, 15.9 cm'den 53.9 cm'ye ve ağırlık 83.6 g'dan 3608 g'a ulaşmıştır. İlk yıllık büyümelerde bir farklılık tespit edilmemiş bununla birlikte ilerleyen aylarda özellikle 24 aydan sonra triploid balıklarda diploid balıklardan daha fazla (ortalama % 11,4) ağırlık artışı görüldüğü belirtilmiştir. Dişilerin gonadosomatik indeksi triploidlerde diploidlerden önemli derecede farklı bulunmuştur. Diploid dişi ve erkeklerin gonadları iyi gelişmiştir. Görsel olarak diploid ve triploidlerin testislerinin benzer olduğu, triploidlerin ovaryumlarının diploidlerinkinden oldukça küçük olduğu gözlenmiştir.

Öztürk (1998), *Oncorhynchus mykiss*'in triploidleştirilmesini yaparak, triploid ve diploidlerin erken hayat dönemlerini karşılaştırmıştır. Kromozom sayım yöntemiyle gruplarda sırasıyla % 80, % 80 ve % 90 lık triploidliğe dönüşüm sağlanmıştır. Yüksek lisans tezi olarak yapılan bu çalışmada triploid balıkların 60. güne kadar olan yaşam oranları diploid balıkların aynı dönemdeki yaşam oranlarından % 20 düşük bulunmuştur.

Ünlü (2004), sıcak ve soğuk şok yöntemiyle elde edilen triploid gökkuşaağı alabalıklarında anatomik ve histolojik gelişim bozukluklarının tespiti üzerine çalışmıştır. Yumurtalar, döllenmeden 26 dakika sonra 27.5°C'de 10 dakika süre ile sıcak şoka, döllenmeden 26 dakika sonra 2-4°C'de 20 dakika süre ile soğuk şoka maruz bırakılmışlardır. Ortalama eritrosit boyu ölçülerek elde edilen triploidleşme oranları, sıcak şok için % 70 ve soğuk şok grubu için % 80 olmuştur. 8 aylık çalışma sonunda diploidler ortalama 173,6 g ağırlığa ulaşırken, sıcak şok grubu 157,4 g ve soğuk şok grubu 172,2 g ağırlığa ulaşmışlardır. Triploid gruplarda daha yüksek oranda iskelet bozuklukları görülmüştür. On dokuz ayın sonunda diploid ve triploid erkeklerin gonad yapısı birbirine benzer bulunmuştur. Diploid dişilerde gonad gelişmesinin normal olduğu gözlenirken, triploidlerin ip benzeri, dejeneratif primer oositler içeren ovaryumlara sahip olduğu görülmüştür.

1.9. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı

Deniz balıklarında yumurta kalitesini belirlemek için üzerinde fikir birliği sağlanan az sayıda metot veya gösterge mevcuttur. Birçok kuluçkahane yüzen yumurtaları iyi, batan yumurtaları kötü olarak değerlendirmektedir. Ovaryumun dış zarının görüntüsü, yumurtanın şekli, yumurtanın şeffaf oluşu, yağ damlacığının dağılışı yumurta kalitesi ile

ilişkilendirilmektedir (Kjørsvik, 1990). Döllenme oranı deniz balıkları için de bir kalite kriteri olarak kullanılabilir. Ancak larva dönemindeki yaşam oranı ile döllenme oranı arasında iyi bir korelasyon görülmemiştir. Son yıllarda yumurtanın döllenmesinden hemen sonra yumurta blastomer morfolojisi incelenerek bazı kriterler belirlenmekte ve bu kriterler yumurta kalitesinin tahmin edilmesinde kullanılmaktadır.

Kalkan balığı yumurtalarının kalitesi değişkenlik göstermektedir. Kuluçkahane çalışanları kaliteli yumurta gruplarını kullanarak iş gücü, yer ve zamandan tasarruf etmek istemektedir. Bu nedenle erken dönemde kalitesi yüksek yumurta gruplarının tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. 4-8'li hücre bölünmesi döllenmeden 2-3 saat sonra gerçekleşmektedir. Bu dönemde yumurta kalitesini belirlemek için kriterler oluşturulması ile kalitesi iyi olan yumurtaların kullanılması kötü olanların imha edilmesi sağlanabilir.

Triploid canlı üreterek, balıkların büyümesinde, et kalitesinde ve yem değerlendirme oranında iyileştirilmeler sağlanmaktadır. Ayrıca steril bireyler oluşturulmaktadır. Triploid uygulaması (soğuk şok) döllenmeden kısa süre sonra yapılmaktadır. Soğuk şok uygulamasının yumurta kalitesi ve yaşam oranı üzerine olan etkilerinin bilinmesi önemlidir. Ülkemizde deniz balıklarında triploid uygulaması ve blastomer morfolojisi çalışmalarına rastlanmamıştır.

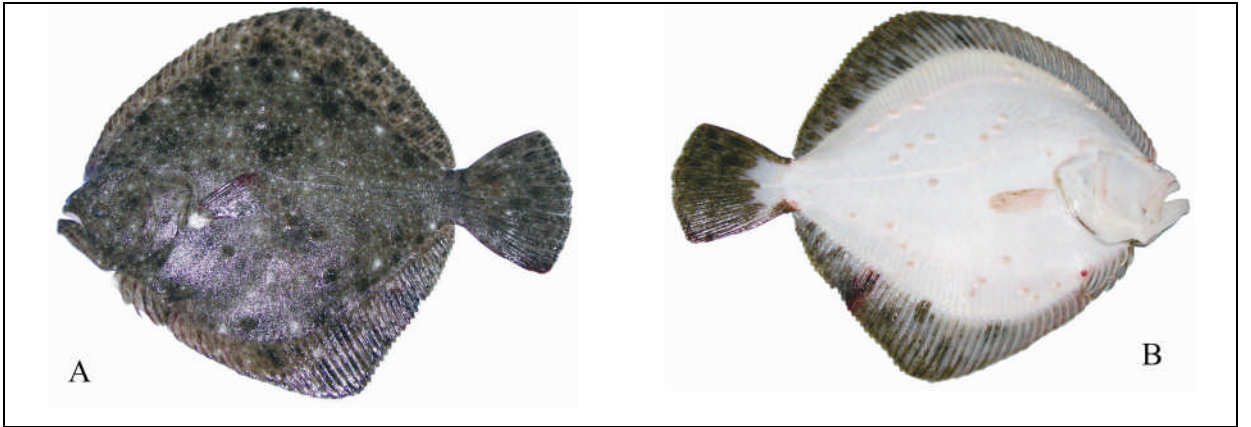
Karadeniz kalkan balığının 8'li hücre aşamasında blastomer morfolojisi incelenerek yumurta kalitesini değerlendirebilecek kriterlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Yumurta kalitesi ile yumurta ve larvaların yaşam oranları arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bunun yanında soğuk şok uygulaması neticesinde, yumurta kalitesinde ve yaşam oranlarında meydana gelen değişimlerin tespit amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Araştırmada kullanılan damızlık balıklar

Araştırmada, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SUMAE) deniz balıkları kuluçkahanesinde üretilmiş 4 yaşında, ortalama total boyu $47,4 \pm 1,69$ cm (min: 45,5, mak: 51,4) ve ortalama ağırlığı $2050,7 \pm 165,32$ g (min: 1816,3, mak: 2248,4) 10 adet erkek ve ortalama total boyu $54,8 \pm 8,55$ cm (min: 47,6, mak: 68,3) ve ortalama ağırlığı $3423,1 \pm 962,58$ g (min: 2589,0, mak: 4925,5) 5 adet dişi damızlık Karadeniz kalkan balığı, *Psetta maxima* (Sin. *Schoptalmus maximus*) (Şekil 4) kullanılmıştır.



Şekil 4. Karadeniz kalkan balığı A) göz tarafı, B) kör tarafı (Orijinal)

2.1.2. Araştırma ünitesi

Araştırma SUMEA deniz balıkları kuluçkahanesinde 30 Nisan – 03. Haziran 2007 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Kuluçkahanenin deniz suyu alım ünitesi her biri $60 \text{ m}^3/\text{saat}$ kapasiteli 3 farklı boru hattından oluşmakta olup, bunlar kıyıda sırasıyla 500, 650, 850 m açıktan ve 20, 40, 53 m derinlikten su sağlamaktadır. Su ön filtrasyondan geçtikten sonra dinlenme havuzlarına, oradan rezerv tanklarına daha sonra sırasıyla 0,8 mm çapında antrasit ve farklı büyüklüklerde kum içeren mekanik filtreden, 5μ 'luk kartuş filtreden ve mor ötesi ışınli (UV) cihazdan geçerek tanklara verilmektedir.

Kuluçkahanede canlı yem, larva büyütme ve anaç yönetimi ile ilgili çalışmaların yürütüldüğü temel büyütme laboratuvarı, canlı yem kültür laboratuvarı, soğuk muhafaza laboratuvarı bulunmaktadır. Ayrıca kapasiteleri 200×10^3 kcal/dak ve 400×10^3 kcal/dak olan iki set ısıtma kazan sistemi ve havalandırma amaçlı iki adet hava kompresörü bulunmaktadır.

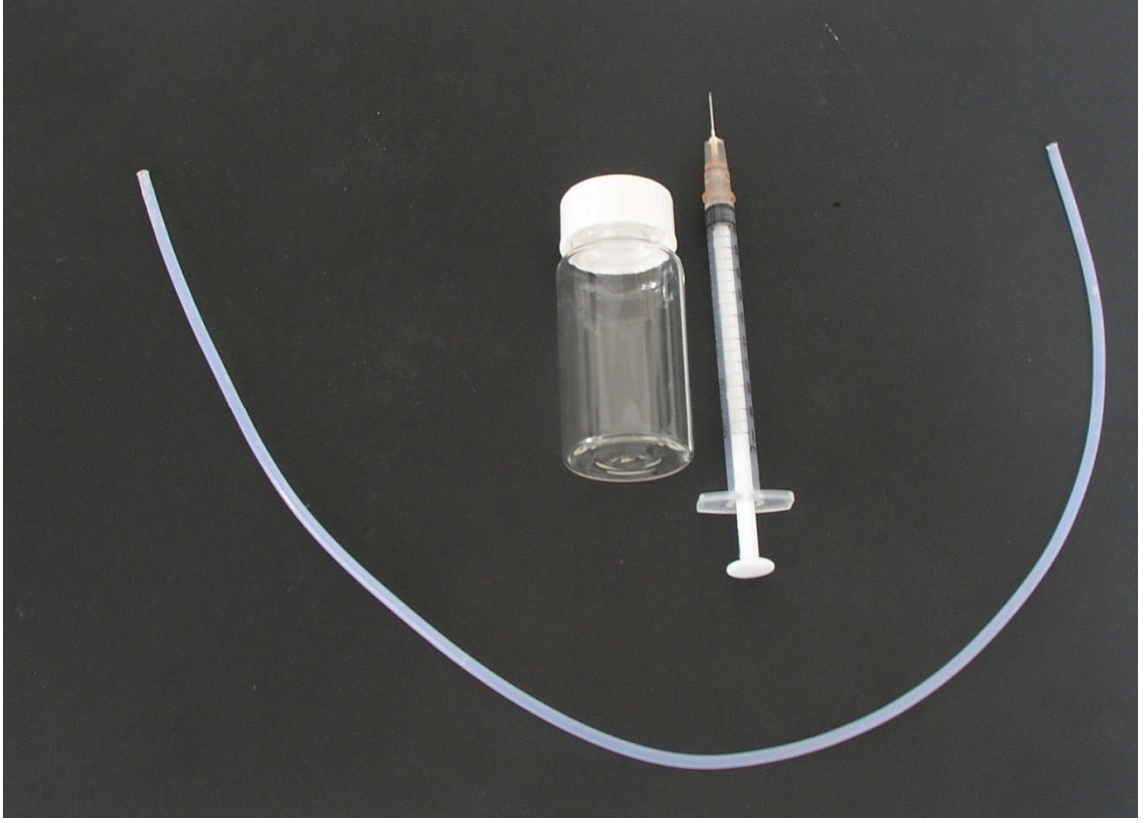
2.1.2.1 Sağım ünitesi ve kullanılan malzemeler

Damızlık balıkların adaptasyonu için $1 \times 2 \times 0,5$ m ebatlarında, ortasından bölme ile ayrılmış 3 adet FRP adaptasyon tankı, bu tanklardaki su sıcaklığını kontrol etmek için ise birer adet 1 KW titanyum elektrikli ısıtıcı kullanılmıştır. Damızlıkların kontrolü ve sağımı için sağım masası kullanılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Yassı balıklar için kullanılan sağım masası (Orijinal)

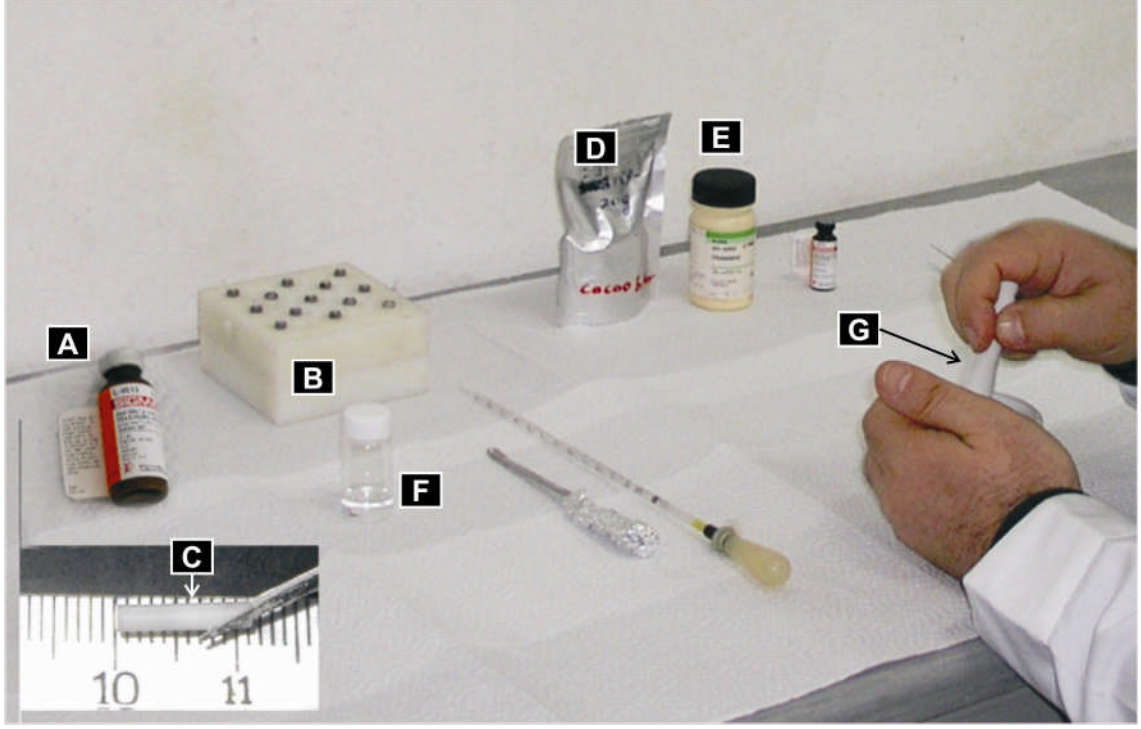
Sağım odasında spermelerin canlılığını ve yumurtaların genel durumunu değerlendirmek için Nikon E 400 mikroskop kullanılmıştır. Dişi balıkların gonadlarından oosit örneği almak için iç çapı 1,5 mm olan kanül, enjektör ve cam şişe kullanılmıştır (Şekil 6). Damızlıkların taşınmasında çeşitli ebatlarda ve farklı şekillerde tasarlanmış kepçeler kullanılmıştır.



Şekil 6. Kanülasyon seti (Orijinal)

2.1.2.2. Hormon hazırlama seti

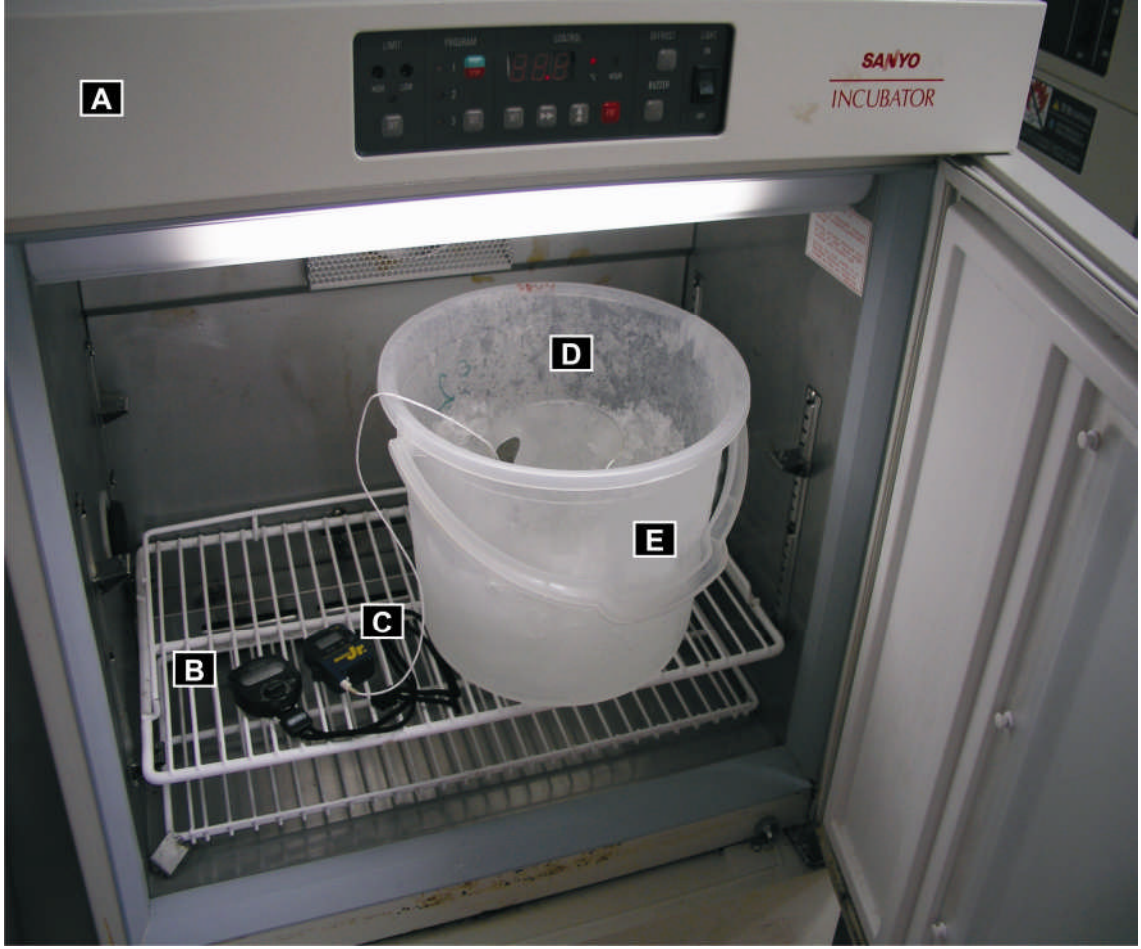
Anaç kalkan balıklarına uygulanacak pelet formunda hormon hazırlamak için toz halinde luteinizan hormonu salgılatma hormon türevi (LHRH-a Sigma L4513), kakao yağı, kolesterol, etanol, pipet 5 ml, porselen havan, havan eli, 3 mm çapında çelik çubuk, küçük el çekici, hassas terazi, deliklerinin iç çapı 3 mm olan hormon hazırlama pelet kalıbı kullanılmıştır. Hazırlanan pelet halindeki hormonun uygulanması için iç çapı yaklaşık 3 mm olan metal tüp kullanılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Hormon hazırlama seti. A) LHRH-a toz, B) Pelet hazırlama aparatı, C) LHRH-a pelet D) Kakao yağı, E) Kolesterol, F) Etanol, G) Havan ve havaneli (Orijinal)

2.1.2.3. Soğuk şok uygulama ekipmanı

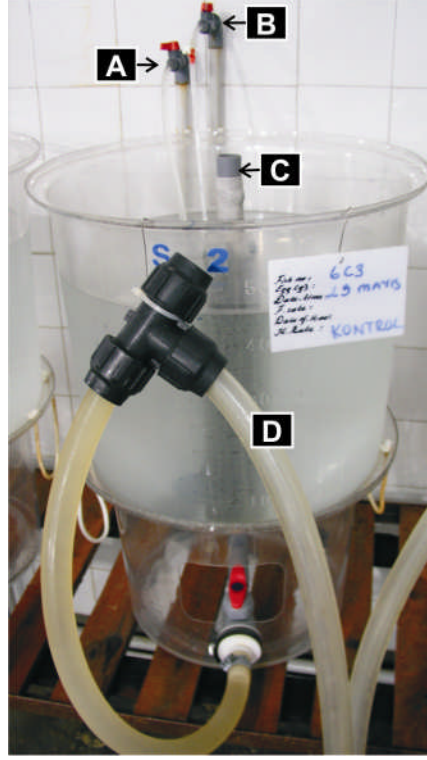
Dölllenmiş yumurtalara soğuk su şoku uygulanması için 10 l'lik, 20 cm yükseklikte %18 tuzlulukta deniz suyu ve buz karışımı ile doldurulmuş yuvarlak plastik kap, sterilize edilmiş deniz suyu ile doldurulmuş 1 l'lik cam beher, Sanyo MIR 153 model soğutmalı inkübatör (Sanyo, Japonya), dijital termometre (0,1°C hassasiyetli, TR-52 T&D Corporation, Japonya), dijital süre ölçer ve plankton kepçesi kullanılmıştır. Soğuk şok ortamı olarak %18 tuzlulukta deniz suyu ve buz karışımı kullanılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Soğuk şok uygulamasında kullanılan malzemeler. A) Soğutmalı inkübatör, B) Süre ölçer, C) Dijital termometre, D) Yumurtaların muhafaza edildiği beher, E) Soğuk şok ortamı (Orijinal)

2.1.2.4. Yumurta kuluçka ünitesi ve kullanılan malzemeler

Yumurtaların inkübasyonu 50 litrelik, şeffaf, polietilen, konik tabanlı silindirik tanklarda ve ayrıca 500 ml'lik hacimlerdeki beherlerde gerçekleştirilmiştir. Tankın içindeki suyun seviyesini kontrol etmek için drenaj borusu kullanılmıştır. Merkezi drenaj sistemindeki süzgeç 3 cm çapındaki delikli PVC borudan yapılmış, borunun etrafı göz açıklığı 8 mm olan polietilen ağ ile sarılmış ve üzeri yumurtaların geçişini engelleyen 520 µm göz açıklığındaki plankton ağı ile çevrilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. 50 litrelik şeffaf polietilen yumurta kuluçka tankı. A) Su girişi, B) Hava girişi, C) Drenaj borusu, D) Su çıkışı (Orijinal)

2.1.2.5. Araştırmada kullanılan diğer araç ve gereçler

Damızlıkların ve yumurtaların tartımında $6200 \pm 0,1$ g kapasiteli Pressica 6200D marka, hassas terazi kullanılmıştır. Damızlıkların boyunun ölçülmesinde ölçüm tahtası kullanılmıştır. Döllenen yumurtaların erken dönem resimleri Leica MZ8 stereo mikroskopta dijital fotoğraf makinesi (C5050Z Olympus optical co., ltd.) ile çekilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Hormon hazırlama ve uygulama

Seramik havan içine dökülen toz halindeki 5 mg LHRH-a üzerine 1 mg etanol ilave edilmiştir. Karışımın üzerine 625 mg kolesterol ilave edildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karışım 25°C 'de kıvamına gelinceye kadar (1–2 saat) bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 125 mg kakao yağı ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır (Şekil 7). Elde edilen karışım 20–35 mg ağırlıklarda tartıldıktan sonra pelet haline getirilmiştir. Her bir pelet münferit olarak tartılmıştır. Ağırlıkları hesaplanan peletlerin içerdikleri hormon miktarı hesaplanmıştır (30

mg ağırlığındaki bir pelet 200 µg LHRH-a içermektedir). Peletler kullanılmaya kadar -18°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Olgunlaşmakta olan dişi balıkların genital açıklığından gonadın içine yaklaşık 15 cm içeriye kadar kanül yerleştirilmiştir ve ağızla sifon yapılmıştır. Kanül yerleştirildiği yerden çıkarıldıktan sonra oosit örnekleri kanülden cam şişeye enjektör (Şekil 6) kullanılarak aktarılmıştır (Mc Evoy, 1984, Hara ve ark., 2002). Oositlerin çapları mikroskop altında 40x büyütme ile ölçülmüştür. Ortalama 400 µ'dan büyük çapta oosite sahip balıklara hormon uygulanmıştır.

Kullanılacak hormon miktarı balığın ağırlığına göre hesaplandıktan (1 kg dişi balık için 100 µg) sonra uygun pelet seçilerek balığın dorsal bölgesinin sağ kısmına kas içine yerleştirilmiştir.

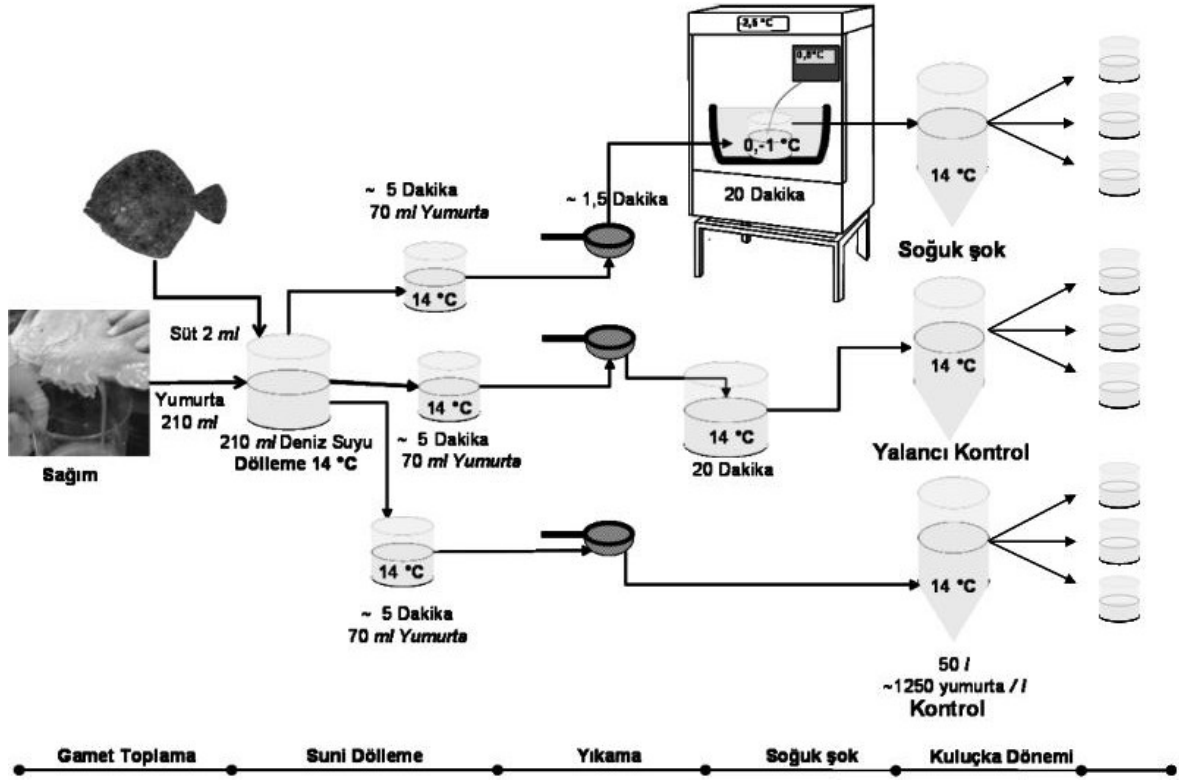
2.2.2. Yumurtaların sağımı ve dölleme

Kuluçkahanenin anaç ünitesinde muhafaza edilen anaç balıklar sağım öncesi adaptasyon için sağım odasındaki adaptasyon tanklarına nakledilmiştir. Buldukları 9,7°C lik su sıcaklığı günde 0,5°C artırılarak 14°C 'ye ayarlanmıştır. Anaç balıklara pelet formundaki LHRH-a uygulanmıştır. Kullanılacak balığın elektronik markası (PIT Tag TX1400L) okutulup kaydedildikten sonra kolay seçim yapabilmek için pektoral yüzgece plastik marka monte edilmiştir (Şekil 10).

Suni dölleme amacıyla önce erkek balıklar kontrol edilmiş ve olgunlaşmış erkekler seçilmiştir. Erkek balıkların karınlarına masaj yapılmış ve semen akışı görülenler olgun olarak değerlendirilmişlerdir. Kontrolde az miktarda semen bir damla deniz suyu ile sulandırılmış ve spermlerin hareketlilikleri x100 büyütme mikroskop altında (Nikon Eclipse 400) incelenmiştir. Spermleri hareketli olan erkek balıklar dölleme işleminde kullanılmak üzere ayrılmışlardır. Olgun balıklardan semen elde edilmeden önce karın bölgesine masaj uygulanarak mesanedeki üre ve boşaltım atıkları uzaklaştırılmıştır. Karın bölgesine, özellikle testislerin üst kısmına yapılan masajla elde edilen semen döllemede kullanılmıştır.

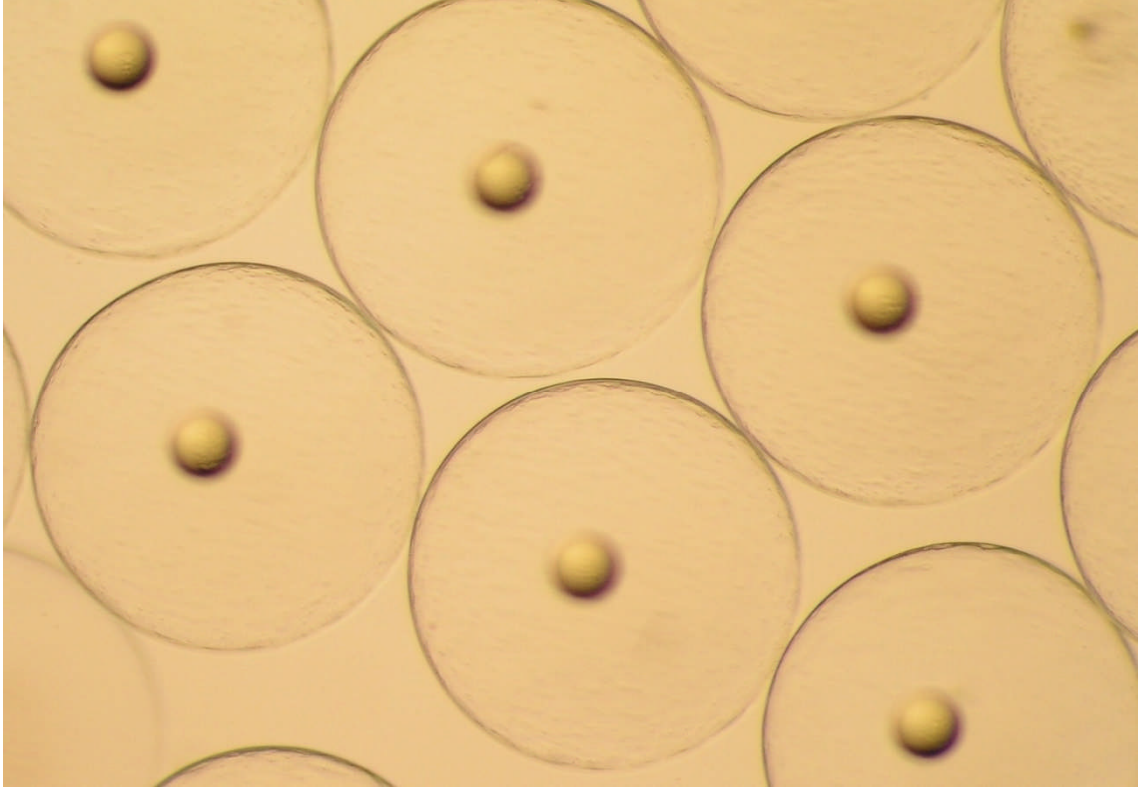


Şekil 10. Damızlık balıkların markaları. A) Plastik marka, B) Balığın dorsal kas içine yerleştirilen elektronik marka, C) Marka okuyucu (Orijinal)



Şekil 11. Soğuk su şoku uygulama düzeni (Orijinal)

Olgunlaşmış olan dişi balıklar günlük olarak kontrol edilmişlerdir. Günlük kontrollerde karınlarında şişlik görülen anaçlar dikkatle incelenmiş ve tartılmışlardır. Ağırlık artışı görülen anaçlar incelenmek için sağım masasına (Şekil 5) alınmış, gözleri temiz bir bez havlu ile kapatılmıştır. Gonad bölgesi hafifçe sıvazlanmış ve 210 g yumurta, darası alınmış temiz bir behere sağılmıştır (Şekil 11). Elde edilen yumurtaların kalitelerini tahmin etmek için 5 ml örnek alınmış ve morfolojik yönden stereo mikroskop altında incelenmiştir. Küresel, şeffaf, dar bir perivitellin boşluğuna sahip yumurtalar (Şekil 12) canlı yumurta olarak kabul edilmiş ve canlılık oranı (canlı yumurta sayısı/toplam yumurta sayısı) tahmin edilmiştir (Chereguini vd. 1999). Canlılık oranı > %70 olan gruplar döllemede kullanılmıştır.



Şekil 12. Yeni sağılmış kalkan balığı yumurtaları (Orijinal)

Damızlık balıkların günlük kontrollerinde ve sağımlarında anestezi uygulanmamıştır. Yumurtaların suni olarak döllenmesinde yaş döllenme metodu (Chereguini ve ark., 1999, Maslova, 2002, Kjørsvik ve ark., 2003) kullanılmıştır. Yumurtalar cam beherde bulunan kuluçka suyu sıcaklığındaki deniz suyuna sağılmıştır (100 ml deniz suyu: 100 ml yumurta, 900 yumurta/ml). Daha önceden semen kalitesi belirlenmiş ve hazırlanmış olan erkek balığın semeni yumurtaların üzerine (1 ml semen/100 ml yumurta) direkt olarak sağılmış ve steril cam şubukla hafifçe karıştırılmıştır. Dllenmede tek bir anaçtan sağılan yumurtalara en az iki farklı damızlık erkek balıktan elde edilen semen kullanılmıştır. Spermin yumurtalara beherine ilave edildiği an döllenme zamanı olarak kaydedilmiştir. Döllenmeden 5 dakika sonra yumurtalar göz açıklığı 520 μ olan plankton ağından yapılmış kepçe kullanılarak deniz suyu ile yıkanmıştır.

2.2.3. Triploidizasyon (Soğuk su şoku uygulaması)

Kalkan balığında triploid bireyler elde etmek için bu balığın döllenmiş yumurtalarına soğuk şok uygulaması Piferrer. vd (2000, 2003)'ne göre yapılmıştır. Dlendikten sonra 14°C'de bir litrelik cam beherde tutulan yaklaşık 210 g yumurta 

kısmı ayrılmıştır. Soğuk şok uygulamak için kullanılacak yaklaşık 70 g yumurta yıkanmış ve döllenenmeden 6,5 dakika sonra, içerisinde istenilen sıcaklıkta (-1°C) deniz suyu bulunan cam behere dökülmüştür. Bu beher, içerisinde buz ve deniz suyu karışımı bulunan plastik kaba, bu plastik kapta $-2,5^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Yumurtaların buldukları suyun sıcaklığı $0,1^{\circ}\text{C}$ hassas termometre ile izlenmiş olup $0, -1^{\circ}\text{C}$ arasında tutulmaya gayret gösterilmiştir. Beherdeki yumurtaların homojen bir şekilde istenilen sıcaklık ile muamele edilmesini sağlayabilmek için yumurtalar çok nazik bir şekilde karıştırılmıştır. Döllenen anından itibaren süre ölçer ile süre takibi yapılmış, şok başladıktan 20 dakika sonra soğuk su şokuna maruz kalan yumurtalar normal inkübasyon suyuna ($\sim 14^{\circ}\text{C}$) dökülmüşlerdir. Kontrol grubu yumurtaları iki kısma ayrılmış olup, birinci kısım (kontrol) hemen yumurta kuluçka tankına (Şekil 8) aktarılmış ve buldukları sıcaklıkta ($\sim 14^{\circ}\text{C}$) kuluçkalanmıştır. İkinci kısım yumurta (yalancı kontrol) ise soğuk şok uygulanan grupta olduğu gibi 20 dakika beherde bekletilmiş ancak tutuldukları sıcaklıklarda ($\sim 14^{\circ}\text{C}$) bir değişiklik yapılmamıştır (Şekil 11). Yalancı kontrol grubu ve kontrol grubunun karşılaştırılması yapılarak uygulamalar arasındaki fiziksel etki farkları değerlendirilmiştir. Soğuk şok, yalancı kontrol ve kontrol grupları 5 farklı anaçtan elde edilen yumurtalar kullanılarak tekrar edilmiştir.

2.2.4. Yumurtaların kuluçkalanması

Şok uygulanan, yalancı kontrol ve kontrol grubu yumurtalar her biri ayrı olmak üzere 50'şer litrelik kuluçka tankına yerleştirilmiştir (Şekil 11).

Kuluçka suyu önce $5\mu\text{m}$ 'lik ardından $1\mu\text{m}$ 'lik kartuş filtreden geçtikten sonra mor ötesi ışın (UV) ile sterilize edilmiştir. Kuluçka tankına $1,38 \text{ l /dak}$, $\% 18$ tuzlulukta deniz suyu sağlanmıştır. Yumurtalar inkübasyon tankına yaklaşık 1250 adet/l yoğunlukta stoklanmıştır. Yumurtaların su sütununda asılı kalmalarını sağlamak için $0,6 \text{ l/dak}$ hava sağlanmıştır. Deniz suyu sıcaklığı dijital sıcaklık kaydedici ($0,1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetli, TR-51A T&D Corporation) ile saatte bir ve cıvalı standart termometre ($0,1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetli) ile günde iki kez kaydedilmiştir.

Yumurtaların dezenfeksiyonu amacıyla döllenenmeden yarım saat sonra 100 ppm pvp iyot solüsyonu 10 dakika süre ile uygulanmıştır.

Döllenen oranı, 14°C 'de döllenen işleminden yaklaşık 2,5 saat sonra, yumurtalar 4 hücre safhasında iken tahmin edilmiştir. Soğuk su şoku uygulanan grup ile kontrol grubunun döllenen oranları karşılaştırılmıştır. Döllenen oranını ve dölleniş yumurta

miktarını tahmin etmek için hafifçe havalandırılan inkübasyon tankının farklı yerlerinden 50 ml'lik cam beherle 4 kez 20 ml'lik örnek alınmıştır. Yumurta örnekleri stereo mikroskop altında incelenerek dölllenmiş yumurta ve toplam yumurta sayılmıştır. Alınan örneklerden hesaplanan ortalama değer kullanılarak dölllenme oranı ve kuluçka tankındaki su hacmine (45 l) göre toplam yumurta miktarı hesaplanmıştır. Ölü yumurtalar inkübasyon tankındaki su kalitesini bozdukları için, havalandırma ve su girişi birkaç dakika kapatılmış, dibe çöken yumurtalar toplanmıştır. Behere toplanan yumurtalar dinlendirildikten sonra beherin üst kısmındaki canlı yumurtalar tekrar kuluçka tankına yerleştirilmiştir.

Çıkış oranını hesaplamak için yavaşça havalandırılan kuluçka tankının farklı yerlerinden 50 ml'lik cam beherle 4 kez 20 ml'lik örnek alınmıştır. Leica MZ8 marka stereo mikroskop kullanılarak örnekteki larvalar sayılmıştır. Kuluçka tankındaki toplam larva sayısı, örneklerden elde edilen ortalama larva sayısı ve kuluçka tankındaki su hacmi (45 l) kullanılarak hesaplanmıştır. Dölllenmiş yumurtadan çıkış oranı (%), kuluçka tankına yerleştirilmiş toplam dölllenmiş yumurta sayısı ile kuluçka tankında hesaplanan prelarva miktarı oranlanarak bulunmuştur.

2.2.5. Embriyonik gelişimin incelenmesi.

Yumurta blastomer morfolojisinin incelenmesi, erken hücre bölünmeleri (2–16 hücreli) aşamasında yapılmaktadır (Shields, 1997; Valin ve Nissling, 1998; Rani, 2005). Hücre bölünmesinin devam ediyor olmasından ötürü değerlendirme yapmak için yumurtaların fotoğrafları çekilmiştir (Kjørsvik ve ark., 2003). Çekilen resimler üzerinden yumurta morfolojileri incelenmiştir. Böylece değerlendirmeler daha güvenilir hale getirilmeye çalışılmıştır. Yumurtalar düşük ışık yoğunluğunda, yüksek çözünürlükte mikroskop altında incelenmiş ve dijital fotoğraf makinesi kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Döllenmeden 3 saat sonra kuluçka tankından alınan yumurta örnekleri pipetle metal çerçeve monte edilmiş lam üzerine aktarılmıştır. Yumurta bölünmesi 8'li hücre aşamasında iken yaklaşık her grup için 100–150 yumurtanın fotoğrafları çekilmiştir.

Yumurta blastomer morfolojisi açısından soğuk şok ve kontrol gruplarında görülen anormallik tipleri ve oranları resimlerin değerlendirilmesi ile belirlenmiştir. Bu sayede normal olarak nitelenen yumurtaların gruplar içindeki oranları tahmin edilmiştir. Yumurtalar 8'li hücre bölünmesi aşamasında iken, anormallik tipleriyle yaşam oranları arasındaki ilişki incelenmiştir.

Yumurtaların blastomer morfolojileri normal ve anormal olarak tasnif edilmiştir. Anormal hücre morfolojileri Tablo 1’deki gibi sınıflandırılmıştır.

Tablo 1. Deniz balıklarında görülen blastomer morfolojisi anormallikleri (Rideout ve ark., 2004)

Anormallik Çeşidi	Açıklaması
Asimetrik hücre	Hücrelerin karşılıklı olmaması
Farklı büyüklükte hücreler	Hücre büyüklüklerinin eşit olmaması
Birbirinden ayrık hücreler	Hücrelerin birbirine bitişik olmaması
Kenarı çizgisi belirgin olmayan hücreler	Hücreleri ayıran çizginin belirgin olmaması

Deneylede elde edilen anormal blastomer tiplerine ait oranlar ile dölleme oranları arasında ve normal blastomer oranları ile dölleme oranları arasında korelasyon olup olmadığı incelendi.

2.2.6. Erken dönem yaşam oranlarının karşılaştırılması

Soğuk şok uygulama şartlarının erken dönem yaşam oranına etkisini araştırmak için soğuk şok, kontrol ve yalancı kontrol gruplarından alınan yumurtalar 500 ml’lik beherlere yerleştirilmiştir. Her bir gruptan seçilen yumurtalardan üç paralel oluşturulmuştur (Şekil 11). Her bir behere yaklaşık 100 adet yumurta stoklanmış ve beherler 14°C’ye ayarlanmış inkübatöre yerleştirilmiştir (Şekil 13). Bakteri kontaminasyonunun engellenmesi amacıyla beherlere 0,5 mg/l dozunda penisilin ilave edilmiştir. Bütün deney gruplarındaki yumurtalara ‰ 18 tuzlukta deniz suyu sağlanmışır. Ölü yumurtalar günlük olarak kayıt edilerek uzaklaştırılmışır. Larva çıkışının tamamlandığı günden bir gün sonra ölü yumurtalar, çıkmamış yumurtalar, canlı ve ölü larvalar sayılmışır. Böylece behere yerleştirilen ilk yumurta sayısı teyit edilmiştir.



Şekil 13. Sıcaklık kontrollü inkübatör (Orijinal)

2.2.7. Erken dönem blastomer morfolojisi ve yaşam oranı arasındaki ilişki

Soğuk şok uygulanan grupta ve kontrol grubunda döllenme anından başlayarak yumurta çıkışından 1 gün sonrasına kadar geçen süre boyunca yumurta ve prelarvaların günlük yaşam oranları ile yumurta blastomer morfolojisinin gözlenmesi sonucu elde edilen kriterler arasındaki ilişki karşılaştırılmıştır.

2.2.8. Verilerin istatistiksel analizleri

Soğuk su şoku uygulamasının erken dönem yaşam oranına etkisinin araştırıldığı çalışmada kontrol, yalancı kontrol ve soğuk şok grupları üçlü paralel halinde 5 ayrı anaç kullanılarak 5 farklı grup olarak çalışılmıştır. Kontrol grubunda döllenmeden 1 gün sonraki yaşam oranı % 50'nin altındaki gruplar değerlendirmeye alınmamıştır. Döllenme oranlarının ve blastomer morfolojilerinin karşılaştırılması χ^2 testi kullanılarak yapılmıştır. Yaşam oranları yüzde olarak değerlendirilmiş olup, yüzde verileri Kruskal-Wallis testi ile istatistikî olarak test edilmiştir. Fark tespit edildiği durumlarda hangi gruplar arasında fark

olduğunu ortaya çıkarmak “oklu karşılaştırmalı test” uygulanmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde Statistica 7,0 ve Excel 2003 bilgisayar programları kullanılmıştır. Yaşam oranları ile blastomer morfolojisi kriterleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile test edilmiştir. İstatistik hesaplamalarında Zar (1999)’ın Biostatistical Analysis kitabından yararlanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Döllenme ve Çıkış Oranları

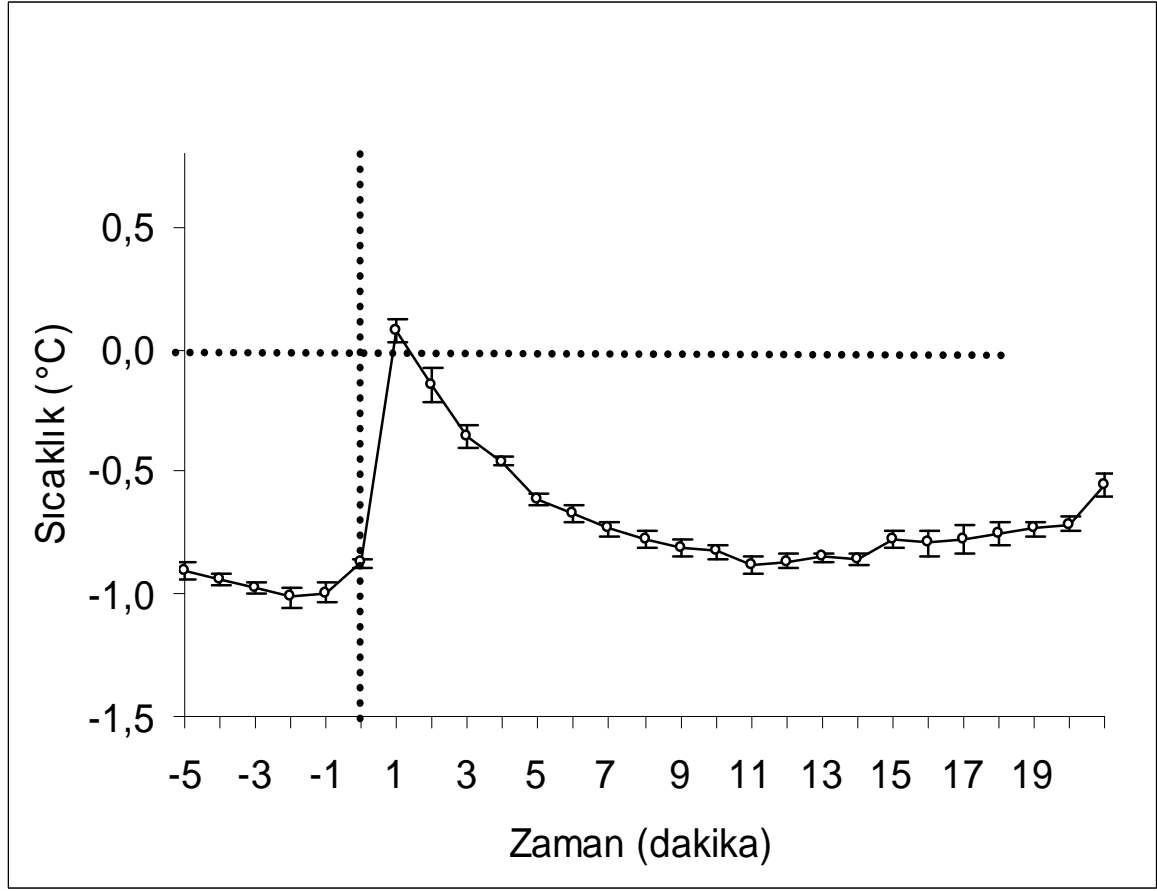
Her gruptan alınan en az 100 yumurtanın incelenmesi sonucu döllenme oranlarına ait değerler; kontrol grubu için birinci anaçta %87, ikinci anaçta %85, üçüncü anaçta %76, dördüncü anaçta % 79 ve beşinci anaçta % 92'dir. Bununla birlikte, soğuk şok grubu için döllenme oranları, birinci anaçta %86, ikinci anaçta e %77, üçüncü anaçta %75, dördüncü anaçta % 75 ve beşinci anaçta % 90'dır. Kontrol grubu ile şok grubu arasında döllenmiş yumurta oranı açısından önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Tablo 2 de çıkış oranlarına ait değerler verilmiştir. Döllenme oranları ile çıkış oranları arasında önemli bir doğrusal ilişki görülmemiştir ($r = 0,580$, $n=10$, $\alpha=0,05$).

Tablo 2. 45 litrelik kuluçka tanklarındaki döllenmiş yumurtalara ait çıkış oranları.

Çıkış Oranları (%)	1. Anaç	2. Anaç	3. Anaç	4. Anaç	5. Anaç
Şok	58,2	33,7	38,7	11,0	48,0
Yalancı Kontrol	84,8	79,0	70,5	29,8	92,2
Kontrol	85,2	100,0	80,5	45,4	93,3

3.2. Soğuk Şok Uygulaması ve Yumurtaların Kuluçkalanması

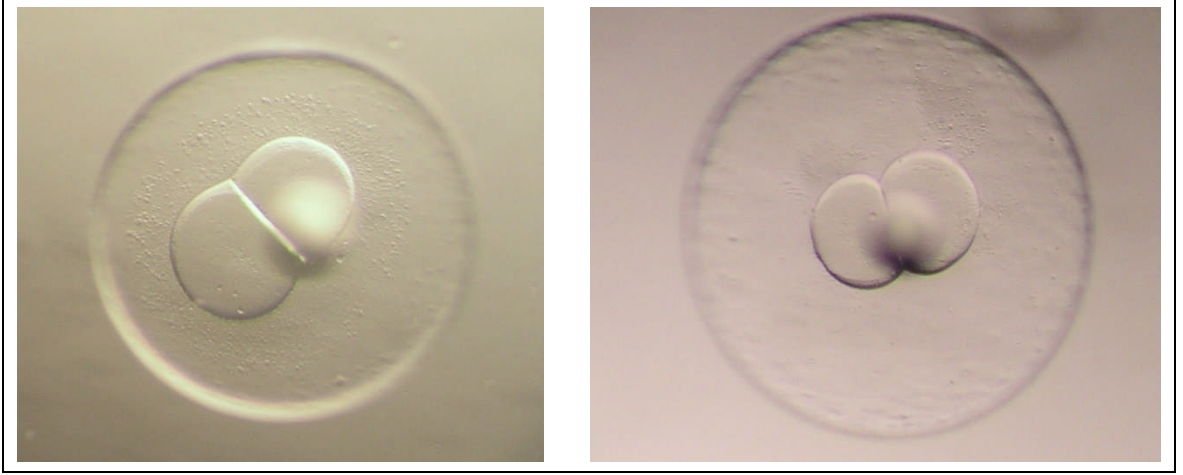
Triploid bireyler elde etmek için 14°C'de dölenen ve soğuk şok uygulaması için bir litrelik cam beherde tutulan yaklaşık 70 g yumurtanın döküleceği cam beherdeki önceden soğutulmuş deniz suyunun tuzluluğu ‰18 ve sıcaklığı -1°C olarak kaydedilmiştir. Cam behere dökülen yumurtanın sıcaklığı 14°C'den hızla 0°C'ye düşürülmüştür. Beherdeki önceden soğutulmuş deniz suyunun sıcaklığı yumurtaların ilave edilmesi ile -1°C'den 0 °C 'ye kısa sürede yükselmiş ancak birkaç saniye içinde tekrar 0°C'nin altına inmiştir. 20 dakika boyunca yumurta ve deniz suyu karışımının sıcaklığı 0, -1°C arasında kaydedilmiştir. Gerçekleştirilen beş tekrarın her birinde gözlenen sıcaklık değerleri çok küçük değişimlerle birlikte birbirine oldukça yakın seyretmiştir (Şekil 14). Yumurta kuluçka tanklarındaki su sıcaklığı $14,4^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ olarak kaydedilmiştir.



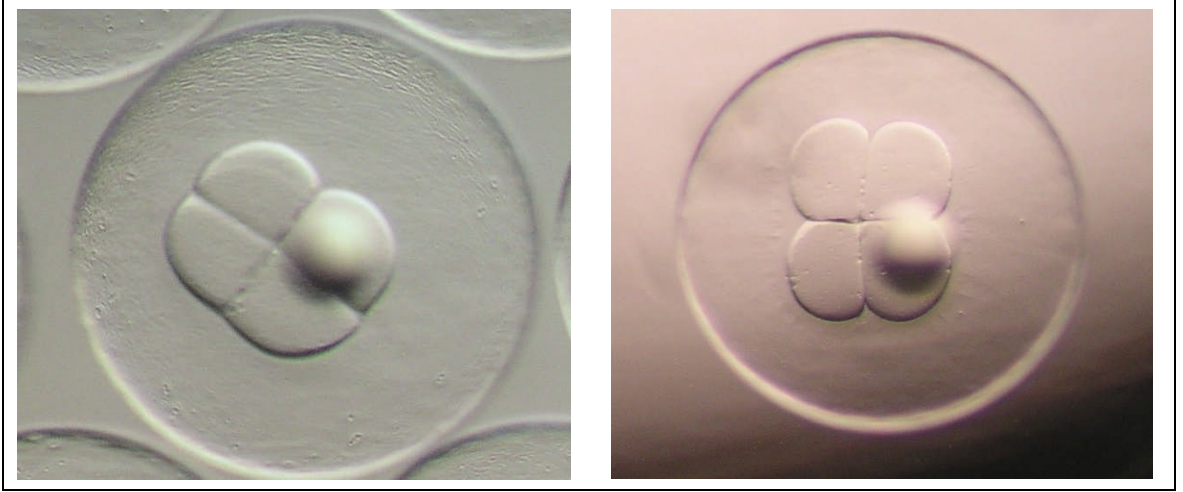
Şekil 14. Soğuk şok uygulamasının yapıldığı beherlerdeki deniz suyu sıcaklık değişimi. Ortalama değerler \pm standart hata. Noktalı dikey çizgi soğuk şokun başlama zamanını gösterir.

3.3 Embriyonik Gelişim

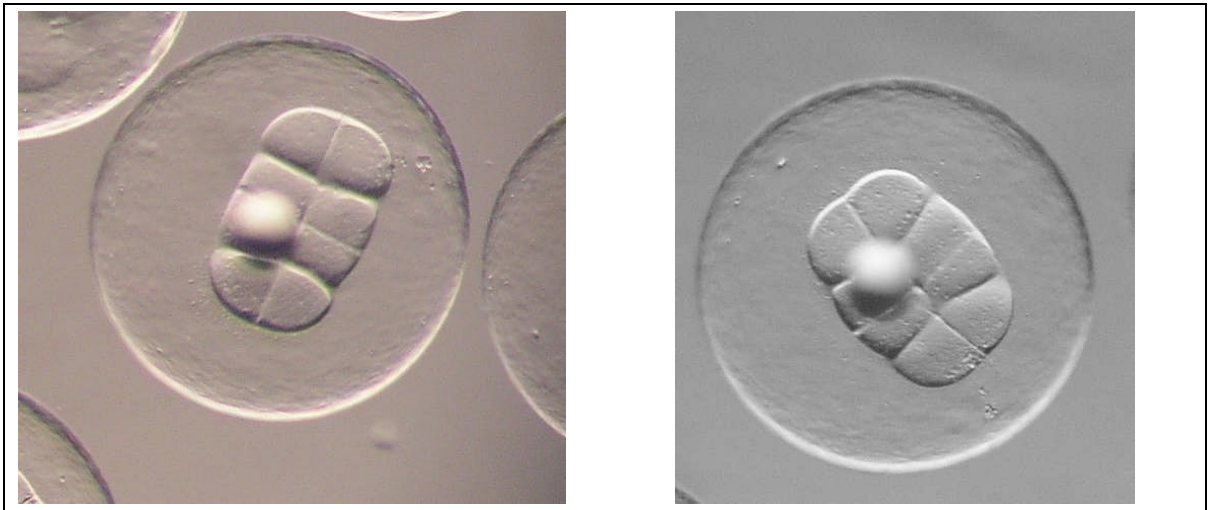
Kalkan balığı yumurtalarında normal görünümlü blastomer şekli, döllenme işleminden itibaren 2,5 ile 4 saat arasında süre geçtikten sonra 2–8 hücre aşamasında eşit büyüklükte ve düzgün biçimde ortaya çıkar (Şekil 15–17). Normal görünümlü yumurtalardan bazılarında hücrelerin birbirine temas eden alanı fazla olurken bazılarında ise daha az olup yonca görünümündedirler (Kjørsvik ve ark.,2003).



Şekil 15. İkili hücre aşamasında normal görünümlü yumurtalar.



Şekil 16. Dörtlü hücre aşamasında normal görünümlü yumurtalar.



Şekil 17. Sekizli hücre aşamasında normal görünümlü yumurtalar.

Her bir anaçtan elde edilen yumurtalara ait kontrol ve şok gruplarındaki anormal blastomer çeşitleri (Şekil 19–22) ile oranları ve normal blastomerlerin oranları ayrı ayrı verilmiştir. Normal hücre oranı %57,6 ile en yüksek 1. anaçta, %7,5 ile en düşük 4. anaçta görülmüştür. Asimetrik hücre anormalliği en yüksek oranda 5. anaçın kontrol ve şok grubunda sırasıyla %33,9 ve %25,9 olarak belirlenirken en düşük oranda % 7,6 ile 1. anaçın kontrol grubunda tespit edilmiştir (Tablo 3). Hücrelerin farklı büyüklükte olma anormalliği %27,8 ile en yüksek 5. anaçta, %6,0 ile en düşük 1. anaçta gözlenmiştir. Birbirinden ayrık hücreler anormalliği %14 ile en yüksek 4. anaçta, %5,7 ile en düşük 1. anaçta gözlenmiştir. Kenar çizgisi belirgin olmayan hücre anormalliği %46,9 ile en yüksek 4. anaçta, % 5,3 ile en düşük 3. anaçta ortaya çıkmıştır.

Normal blastomer ve anormal blastomer oranları ile dölleme oranları arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır ($\alpha=0,05$, $n=10$).

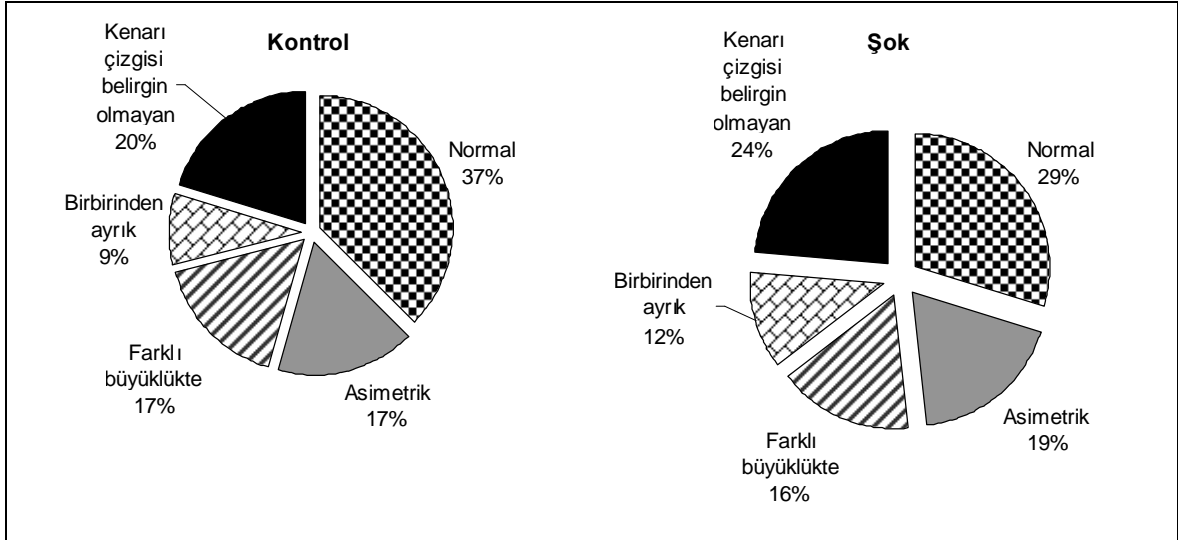
Şok ve kontrol gruplarında gözlenen bu anormallik çeşitlerinin oranları ve normal blastomer oranları analiz edilmiştir. Bulunan ki kare değerleri sırasıyla 1. anaç için $x^2=17,9$, 2. anaç için $x^2=5,7$, 3. anaç için $x^2=27,9$, 4. anaç için $x^2=3,2$ ve 5. anaç için $x^2=16,8$ olmuştur. Bu sonuçlara göre 1, 3. ve 5. anaçların kontrol ve şok grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur ($p<0,01$, $SD=4$, $x^2=7,78$).

Tablo 3. Normal ve anormal blastomer tiplerinin kontrol ve şok grubundaki oranları (%).

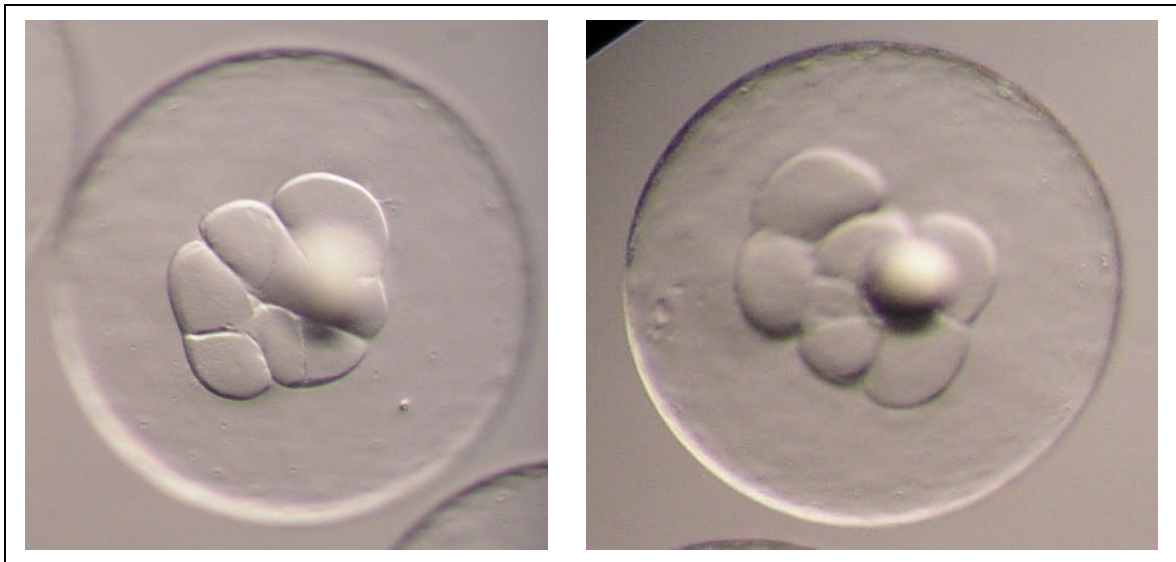
Ş=Şok, K=Kontrol	1. Anaç		2. Anaç		3. Anaç		4. Anaç		5. Anaç	
	K	Ş	K	Ş	K	Ş	K	Ş	K	Ş
Normal hücre (%)	57,6	50,0	50,4	42,3	51,6	38,7	13,2	7,5	14,4	10,1
Asimetrik hücre (%)	7,6	15,0	12,2	11,3	18,2	25,3	13,2	15,0	33,9	25,9
Farklı büyüklükte hücreler (%)	10,1	6,0	13,9	16,7	15,1	17,3	15,8	17,7	27,8	23,7
Birbirinden ayrık hücreler (%)	5,7	12,3	11,3	10,7	4,3	13,3	14,0	12,9	7,8	10,1
Kenarı çizgisi belirgin olmayan hücreler (%)	19,0	16,2	12,2	19,0	10,8	5,3	43,9	46,9	16,1	30,2

Anaçların genelinde tespit edilen normal hücre oranının anormal hücre tiplerinin her birinin oranından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kontrol gruplarında gözlenen normal hücre oranı soğuk şok grubunda gözlenenlere nazaran daha yüksek bulunmuştur (Şekil 18). Tüm deneyler göz önüne alındığında kontrol grubunda ve soğuk

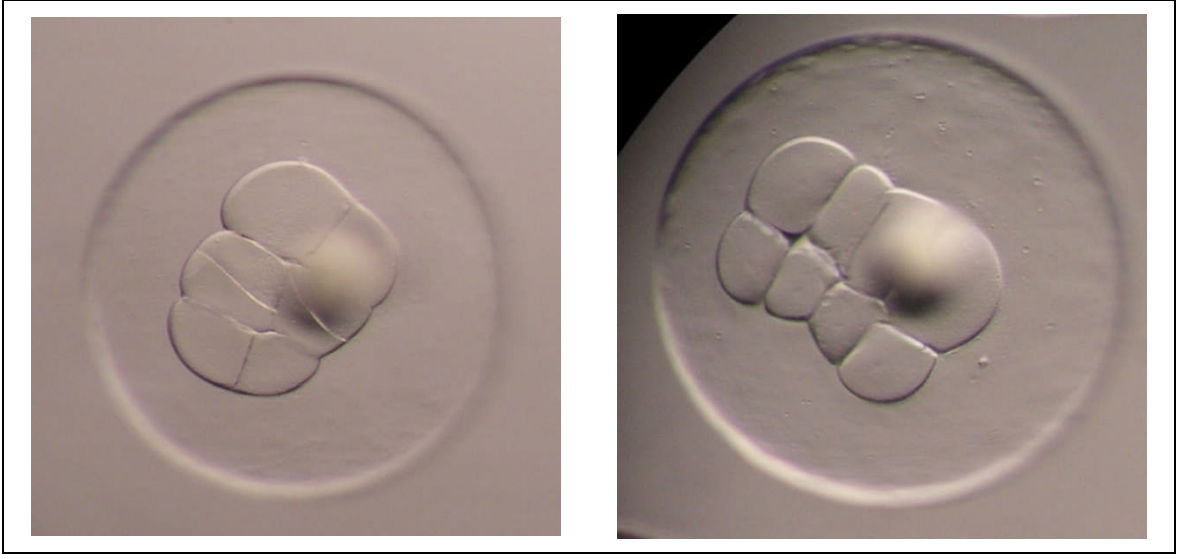
şok grubunda gözlenen anormalliklerde en yüksek payı hücrelerin kenar çizgileri belirgin olmayan anormallik tipi alırken, en düşük payı ise birbirinden ayırık olan hücreler anormallik tipi almaktadır.



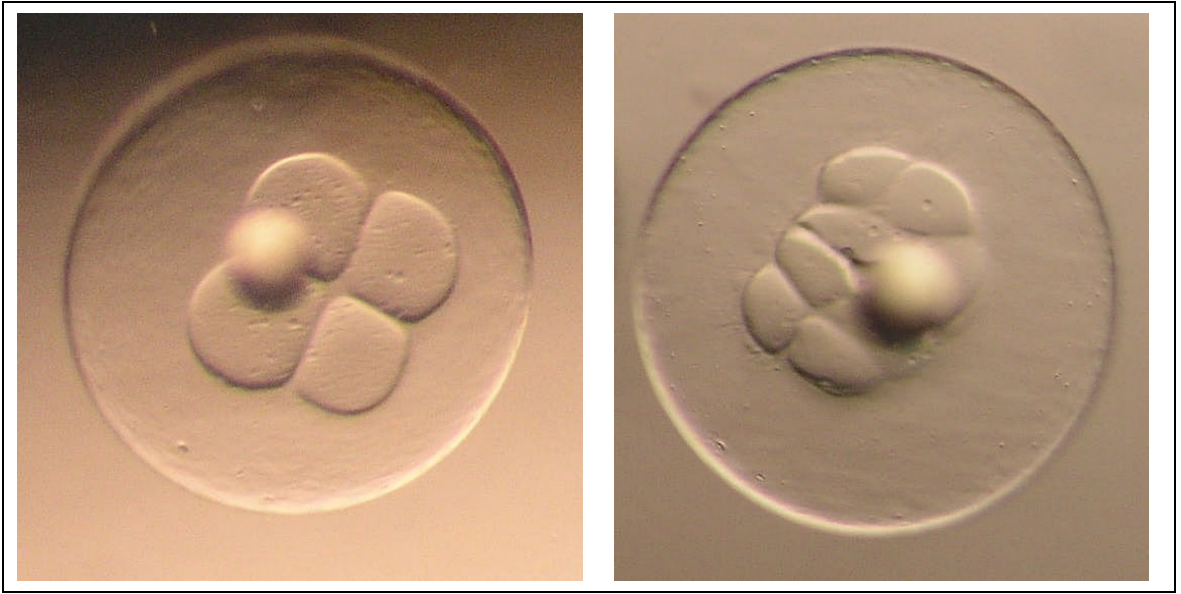
Şekil 18. Beş farklı anacın kontrol ve şok gruplarında gözlenen toplam normal ve anormal hücrelere sahip yumurtaların oranları.



Şekil 19. Sekizli hücre aşamasında asimetrik hücre görünümlü yumurtalar.



Şekil 20. Sekizli hücre aşamasında farklı büyüklükte hücelere sahip yumurtalar.



Şekil 21. Birbirinden ayırık görünümde hücelere sahip yumurtalar.



Şekil 22. Sekizli hücre aşamasında kenarları belirgin olmayan görünümde hücelere sahip yumurtalar.

Karadeniz'in tuzluluğunun ‰ 18–19 olmasında dolayı -1°C 'den daha düşük sıcaklıklarda deniz suyu kristalize olmaya ve donmaya başlamaktadır. Yumurtalar içinde buz kristalleri olan suya döküldüğünde dış kısmında çatlaklar görülmüştür (Şekil 23).



Şekil 23. Soğuk şok uygulaması sırasında yumurtada görülen çatlamlar.

3.4. Erken Dönem Yaşam Oranlarının Karşılaştırılması

Beş farklı anaçtan elde edilen yumurtaların yaşam oranları incelenmiştir (Tablo 4). Her bir anaç için günlük olarak elde edilen yaşam oranlarına ait veriler test edilip şok uygulanan, yalancı kontrol ve kontrol grupları arasında fark olup olmadığı kontrol

edilmiştir. Buna göre; yumurtaların döllenenmesinden 1 gün sonra (Şekil 24) yalancı kontrol, kontrol ve soğuk su şoku uygulanan gruplarının yaşam oranları arasında bir fark bulunmamıştır (Şekil 25). Döllenenmeden 2 gün sonra (Şekil 26) 1., 2. ve 3. anaçlarda bir fark görülmezken, 4. ve 5. anaçlar için önemli fark tespit edilmiştir (Şekil 27). 3. günde (Şekil 28) 1., 3. ve 4. anaçlar arasında ki fark önemsiz olurken, 2. ve 5. anaçlardaki fark önemli bulunmuştur (Şekil 29). Yaşam oranları açısından 4. günde (Şekil 30) durum 3. gün ile aynıdır (Şekil 31). Larva çıkışının görüldüğü döllenenmeden 5 gün sonrasında (Şekil 32) 5. anaç için önemli bir fark tespit edilmişken aynı günün diğer anaçlarına ait gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Şekil 33). Prelarvaların çıkışından bir gün sonraki (döllenenmeden 6 gün sonrası) (Şekil 34) yaşam oranlarında (Şekil 35) 1. ve 5. anaç için önemli bir fark belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 4. Soğuk şok, yalancı kontrol ve kontrol grubu yumurtalarının döllenenmesinden 1, 2, 3 ve 4 gün sonra, larvaların çıkışı ve çıkıştan bir gün sonraki canlılık oranlarının ortalaması.

Yaşam Oranları (%)		1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün
1. Anaç	Şok	98	88	85	85	79	72
	Yalancı Kontrol	99	85	82	81	81	78
	Kontrol	98	87	87	87	86	82
2. Anaç	Şok	81	72	71	71	71	65
	Yalancı Kontrol	79	71	69	69	69	67
	Kontrol	82	76	74	74	72	68
3. Anaç	Şok	77	59	58	58	58	55
	Yalancı Kontrol	93	65	59	58	58	58
	Kontrol	90	74	73	72	71	64
4. Anaç	Şok	84	40	31	21	12	7
	Yalancı Kontrol	91	53	48	42	42	17
	Kontrol	86	61	50	39	26	10
5. Anaç	Şok	95	59	58	58	55	31
	Yalancı Kontrol	96	77	76	76	75	75
	Kontrol	97	82	80	80	80	78

Gruplar arasında farkın tespit edildiği durumlarda bu farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. 2. günün 4. ve 5. anaçlarında kontrol ile şok arasında önemli fark gözlenirken, kontrol ile yalancı kontrol veya yalancı kontrol ile şok arasında önemli bir fark yoktur (Şekil 27). 3. ve 4. günlerde durum birbirinin aynıdır. Şöyle ki; 2. anacın kontrol ile yalancı kontrol arasında fark önemli olurken, kontrol ile şok veya yalancı kontrol ile şok arasında önemli bir fark yoktur (Şekil

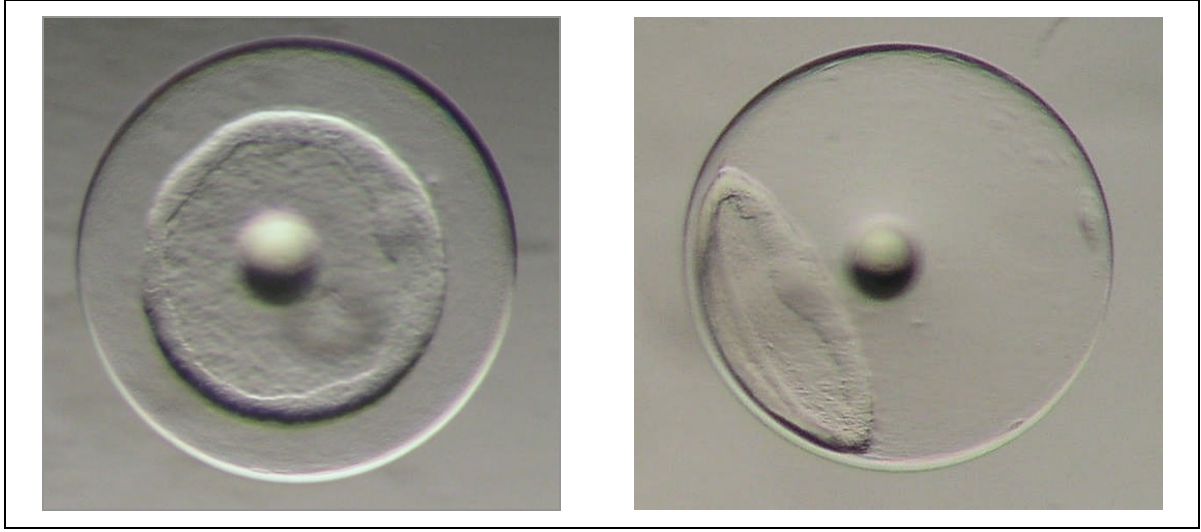
29). 5. anaç için ise kontrol ile şok arasında önemli fark olurken, kontrol ile yalancı kontrol veya yalancı kontrol ile şok arasında önemli bir fark yoktur (Şekil 31). 5. günde 5. anaç için (Şekil 33) ve 6.günde 1. ve 5 anaçlar için (Şekil 35) kontrol ile şok arasında fark önemli varken, kontrol ile yalancı kontrol veya yalancı kontrol ile şok arasında önemli bir fark yoktur (Tablo 6).

Tablo 5. Yaşama oranının incelendiği deneylerde elde edilen verilere Kruskal – Wallis testi uygulanarak elde edilen p değerleri. * $p < 0,05$ göre gruplar arasındaki fark önemlidir.

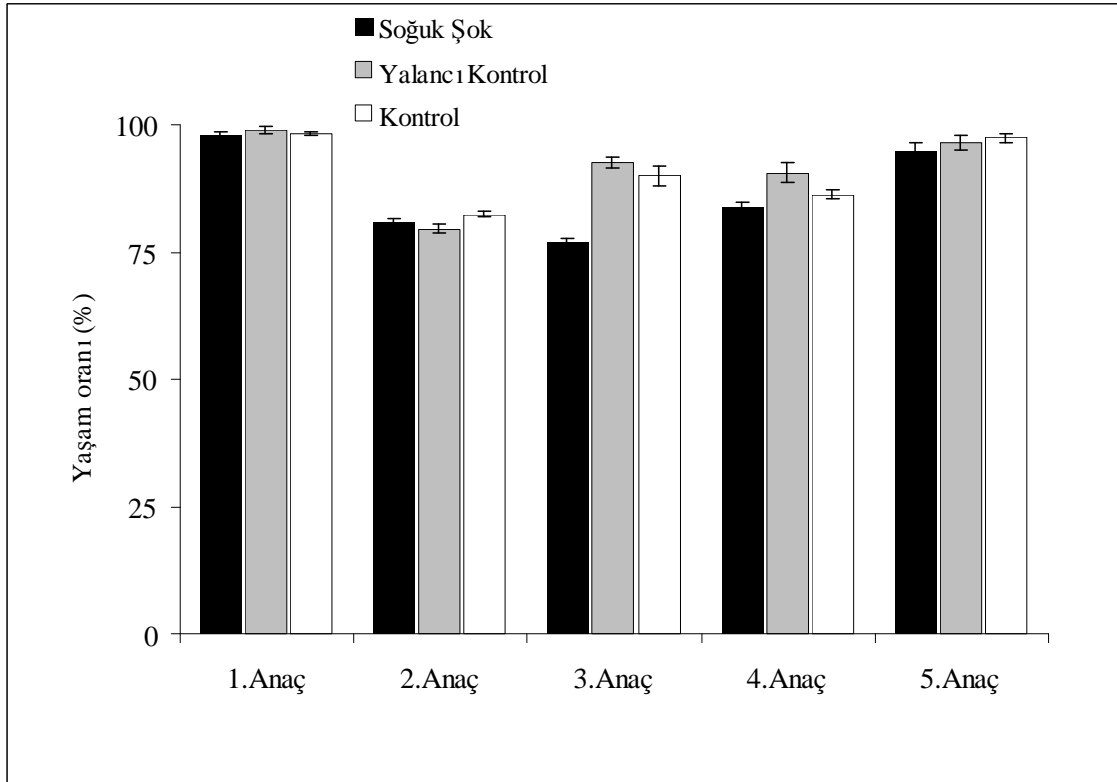
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4.Gün	5. Gün	6. Gün
1. Anaç	0,491	0,670	0,288	0,288	0,147	0,039*
2. Anaç	0,079	0,060	0,039*	0,039*	0,201	0,329
3. Anaç	0,051	0,079	0,066	0,066	0,066	0,079
4. Anaç	0,067	0,039*	0,066	0,066	0,059	0,050
5. Anaç	0,429	0,039*	0,027*	0,027*	0,039*	0,027*

Tablo 6. Yaşam oranına ait verilere çoklu karşılaştırmalı test uygulanarak bulunan p değerleri. * $P < 0,05$ göre gruplar arasındaki fark önemlidir.

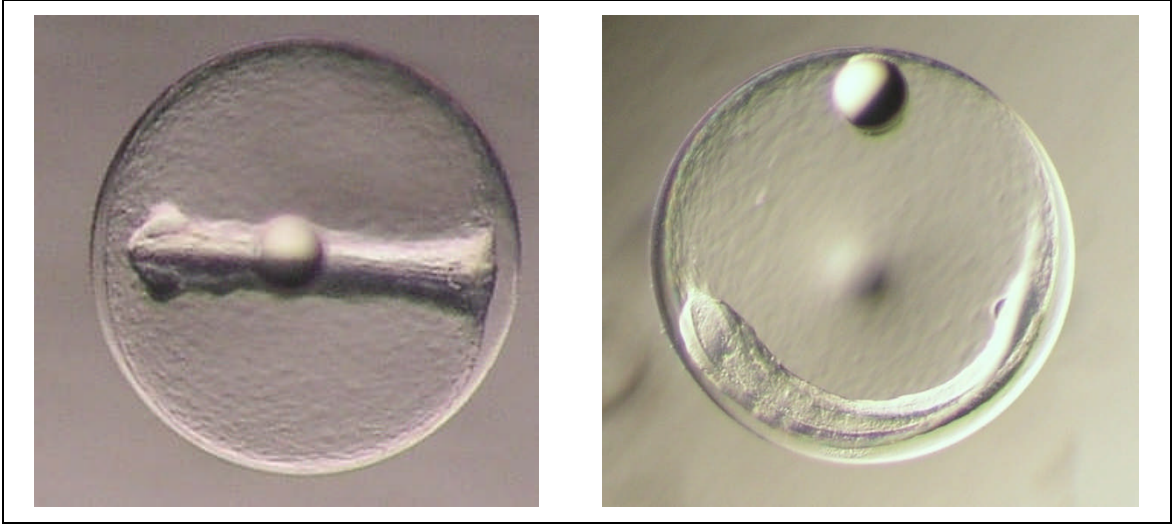
		Şok	Yalancı Kontrol	Kontrol
2. Gün 4. Anaç	Şok		0,408	0,034*
	Yalancı Kontrol	0,408		0,890
	Kontrol	0,034*	0,890	
2. Gün 5. Anaç	Şok		0,408	0,034*
	Yalancı Kontrol	0,408		0,890
	Kontrol	0,034*	0,890	
3. Gün 2. Anaç	Şok		0,890	0,408
	Yalancı Kontrol	0,890		0,034*
	Kontrol	0,408	0,034*	
3. Gün 5. Anaç	Şok		0,539	0,022*
	Yalancı Kontrol	0,539		0,539
	Kontrol	0,022*	0,539	
4. Gün 2. Anaç	Şok		0,890	0,408
	Yalancı Kontrol	0,890		0,034*
	Kontrol	0,408	0,034*	
4. Gün 5. Anaç	Şok		0,539	0,022*
	Yalancı Kontrol	0,539		0,539
	Kontrol	0,022*	0,539	
5. Gün 5. Anaç	Şok		0,408	0,034*
	Yalancı Kontrol	0,408		0,890
	Kontrol	0,034*	0,890	
6. Gün 1. Anaç	Şok		0,408	0,034*
	Yalancı Kontrol	0,408		0,890
	Kontrol	0,034*	0,890	
6. Gün 5. Anaç	Şok		0,539	0,022*
	Yalancı Kontrol	0,539		0,539
	Kontrol	0,022*	0,539	



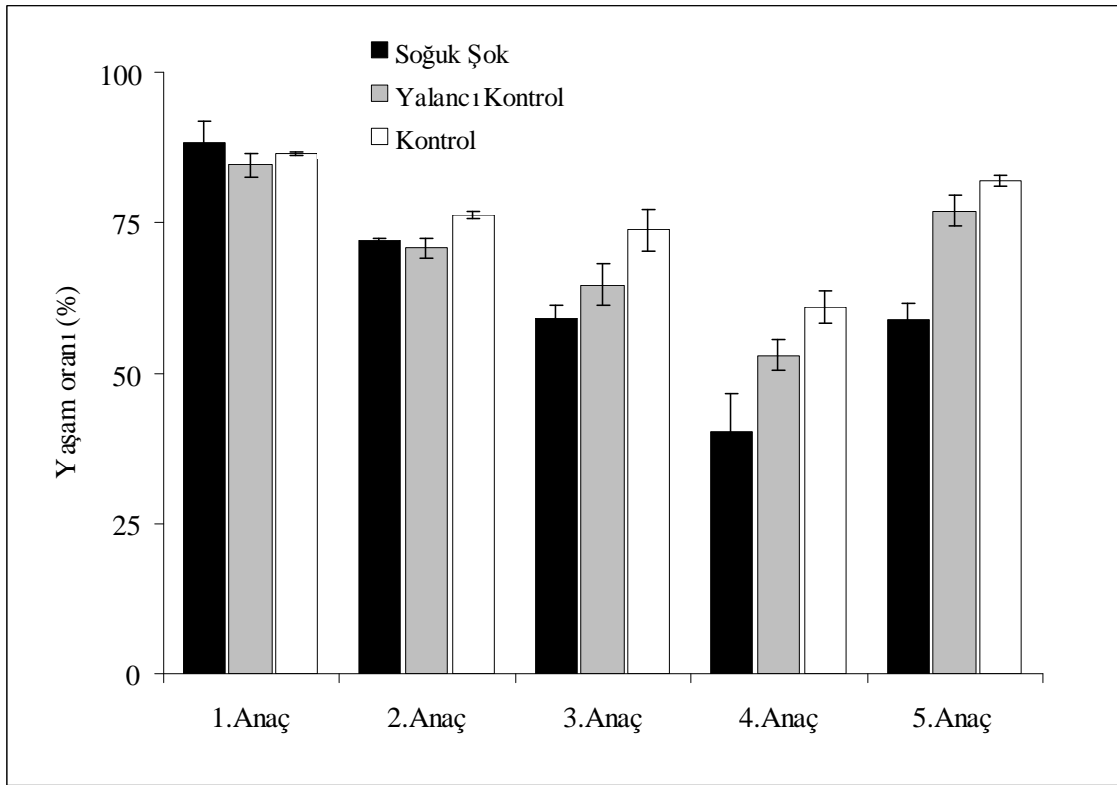
Şekil 24. Döllenmeden 1 gün sonra gastrula safhasında yumurta.



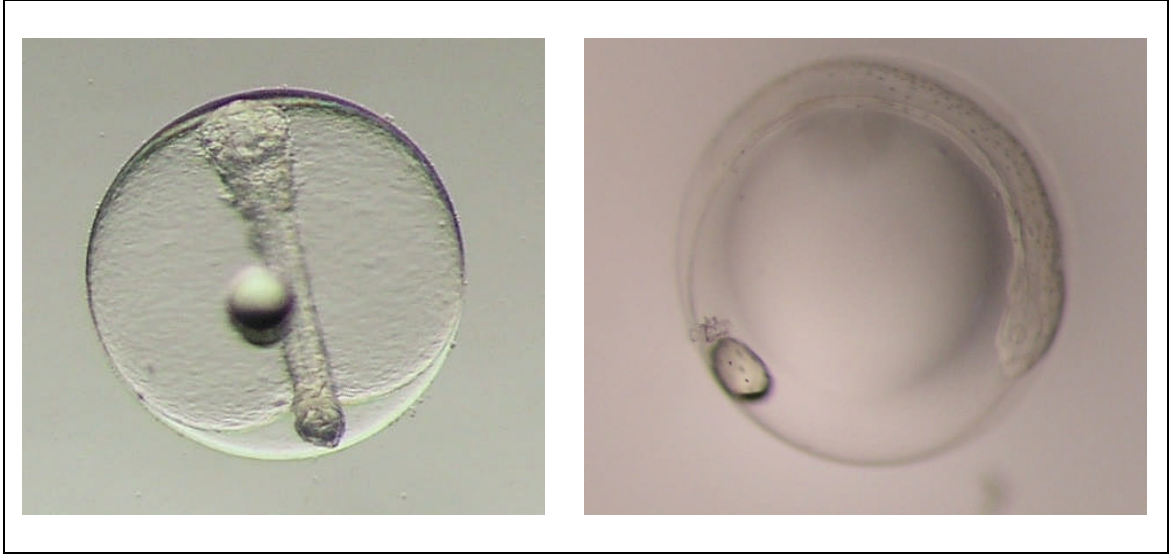
Şekil 25. Döllenmeden 1 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata



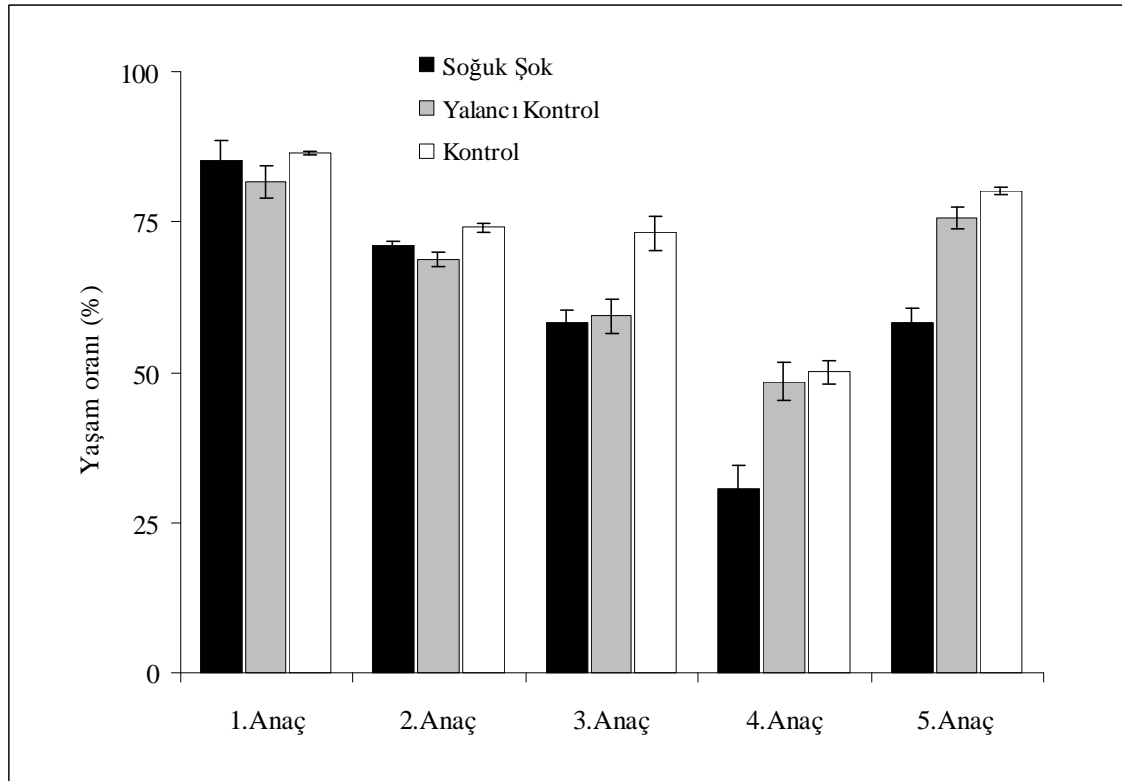
Şekil 26. Döllenmeden 2 gün sonra embriyo oluşum safhası.



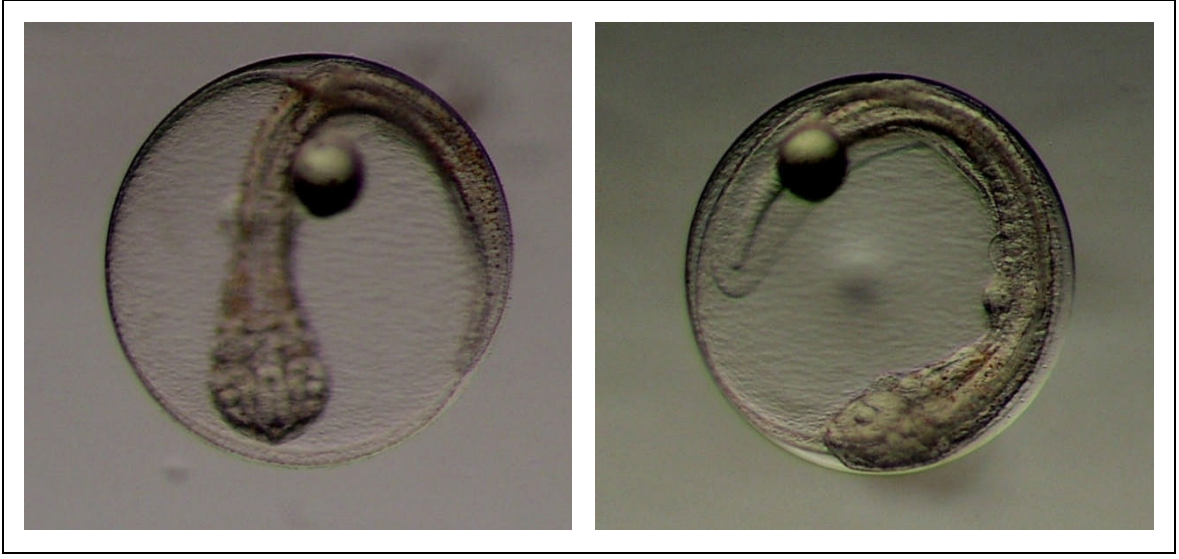
Şekil 27. Döllenmeden 2 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata



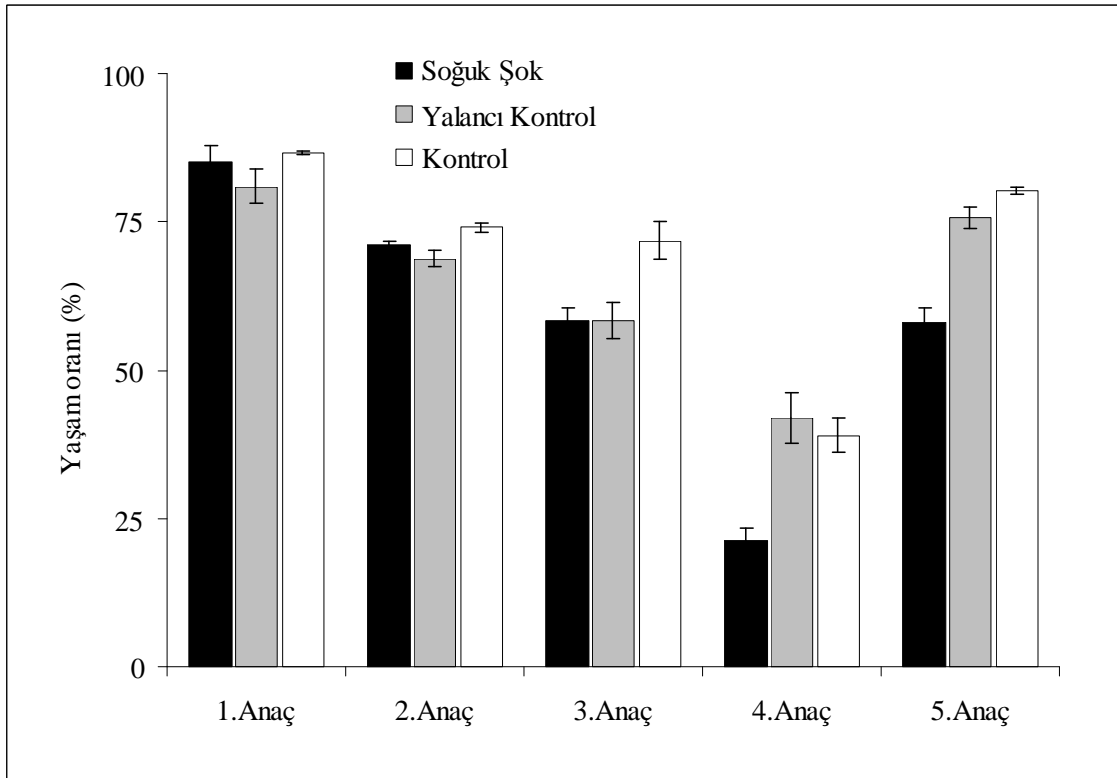
Şekil 28. Döllenmeden 3 gün sonra embriyo safhası.



Şekil 29. Döllenmeden 3 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata



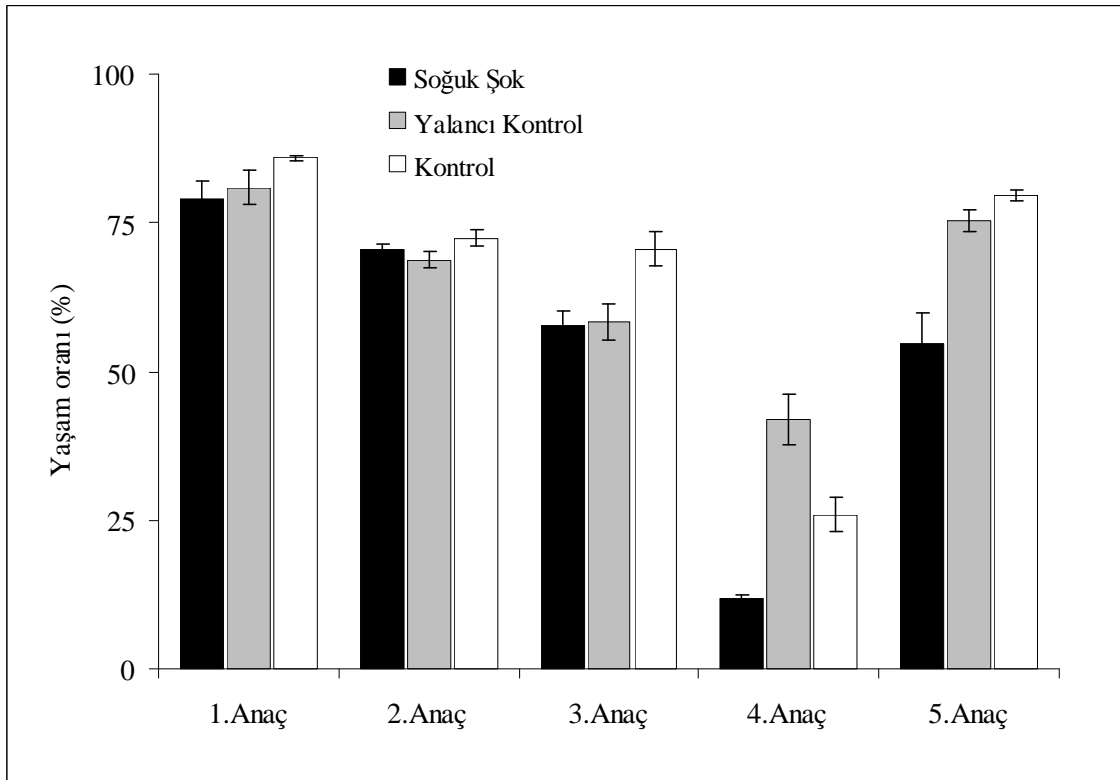
Şekil 30. Döllenmeden 4 gün sonra embriyo safhası.



Şekil 31. Döllenmeden 4 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata



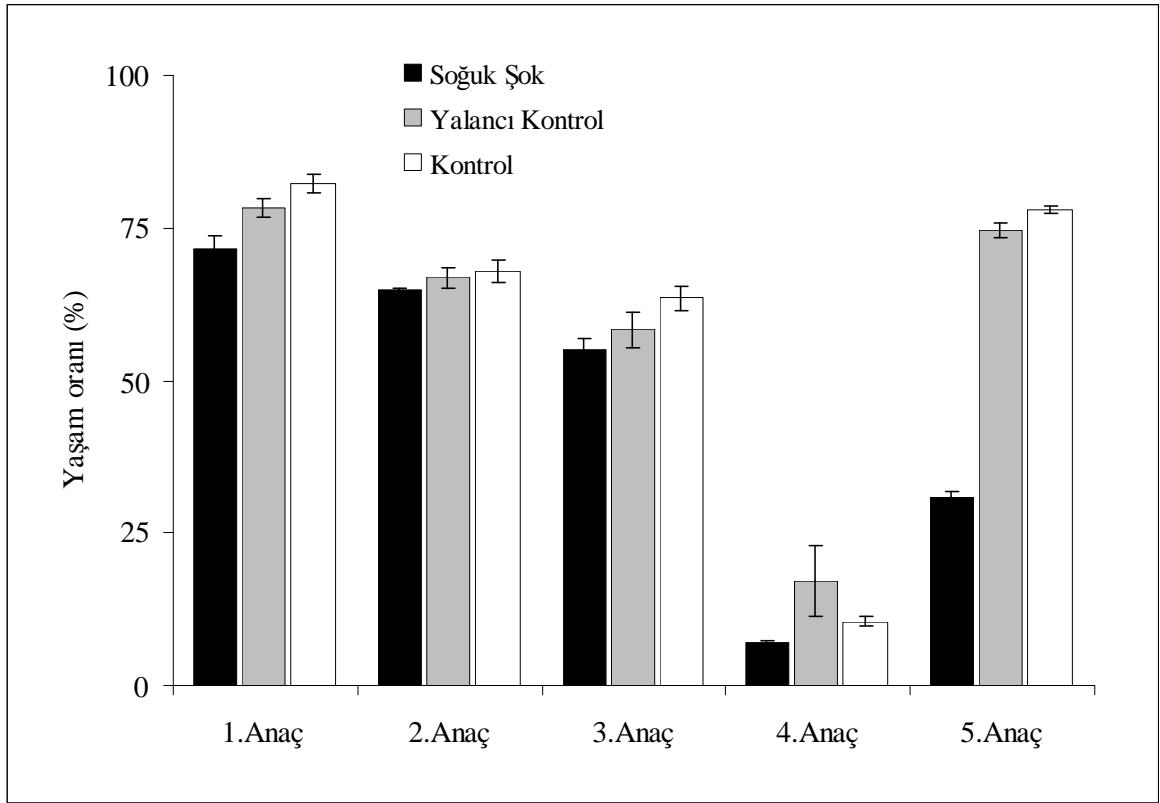
Şekil 32. Döllenmeden 5 gün sonra yeni çıkmış prelarva.



Şekil 33. Döllenmeden 5 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtalardan çıkan prelarvaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata

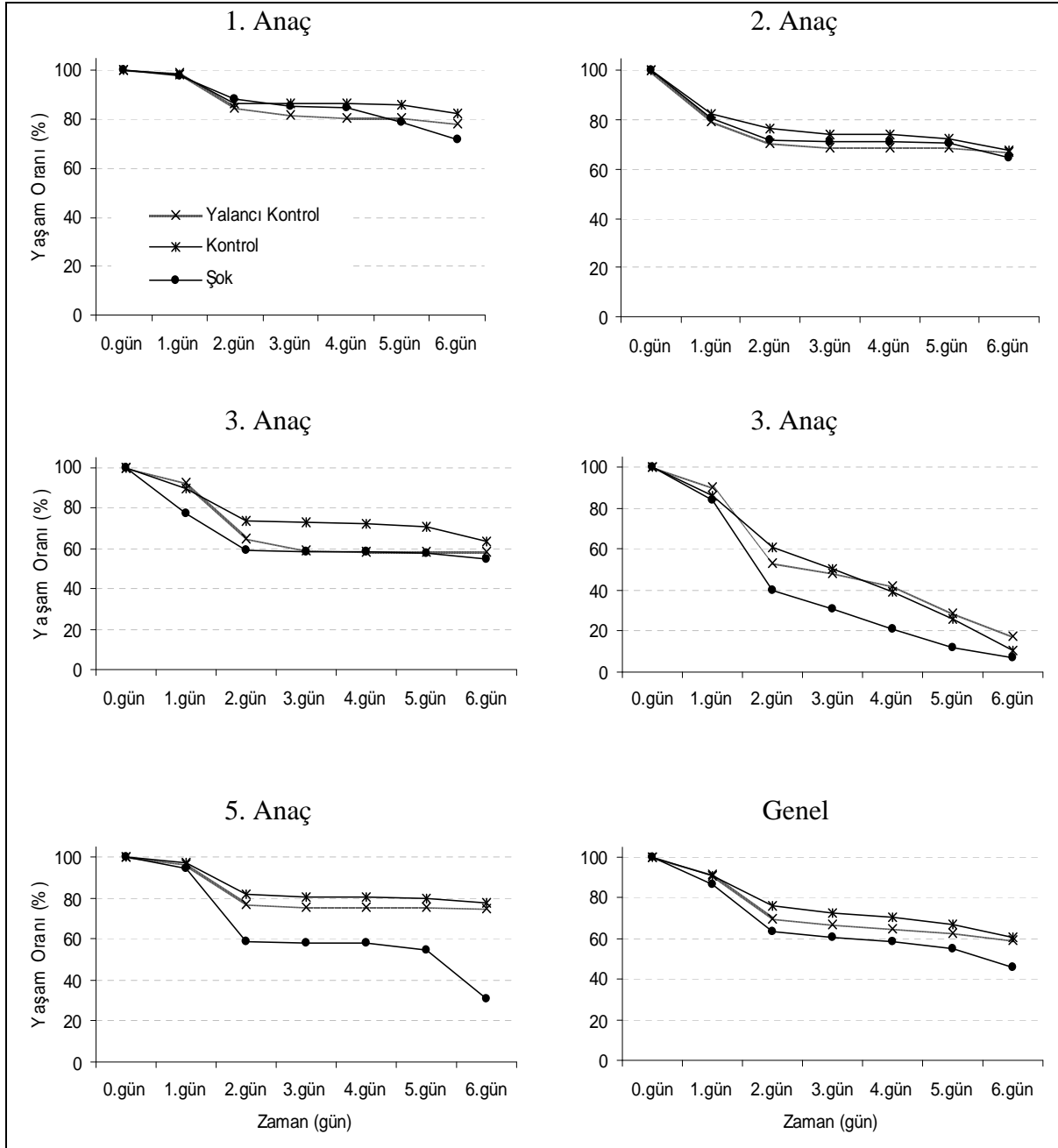


Şekil 34. Döllenmeden 6 gün sonra prelarva.



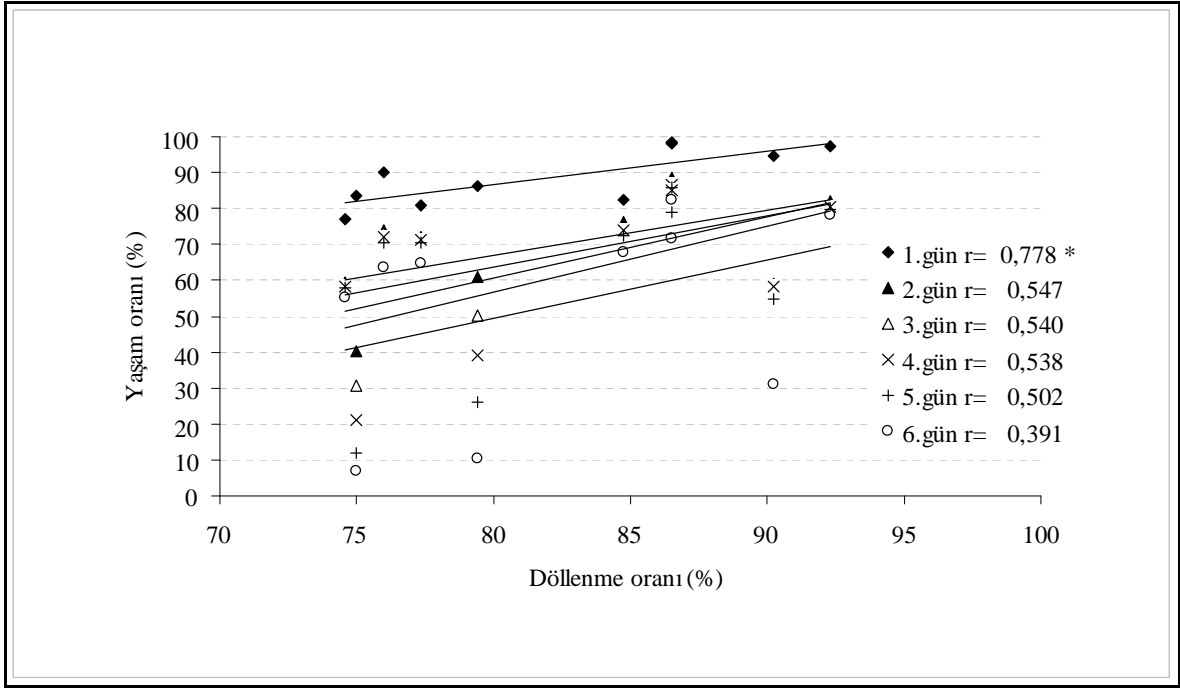
Şekil 35. Döllenmeden 6 gün sonra kontrol yalancı kontrol ve soğuk şok uygulanan yumurtalardan çıkan prelarvaların hayatta kalma oranları. Ortalama değerler \pm standart hata,

Yoğun yumurta ölümleri ilk olarak döllenmeden 2 gün sonra görülmüştür. 2. ölüm dalgası ise 1. günlük prelarvalarda görülmüştür. Tüm anaçlar için son gündeki yaşam oranları soğuk şok gruplarında en düşük çıkmıştır. 5. anaçta şok grubunun yaşama oranı kontrol ve yalancı kontrol gruplarından farklı seyir izlemiştir. 4. anaçın tüm gruplarında yaşam oranı en düşük çıkmıştır (Şekil 36).



Şekil 36. Soğuk şok uygulanan, yalancı kontrol ve kontrol grubu yumurtaların 1., 2., 3., 4., 5. anaçların ayrı ayrı ve genel olarak yaşam oranları

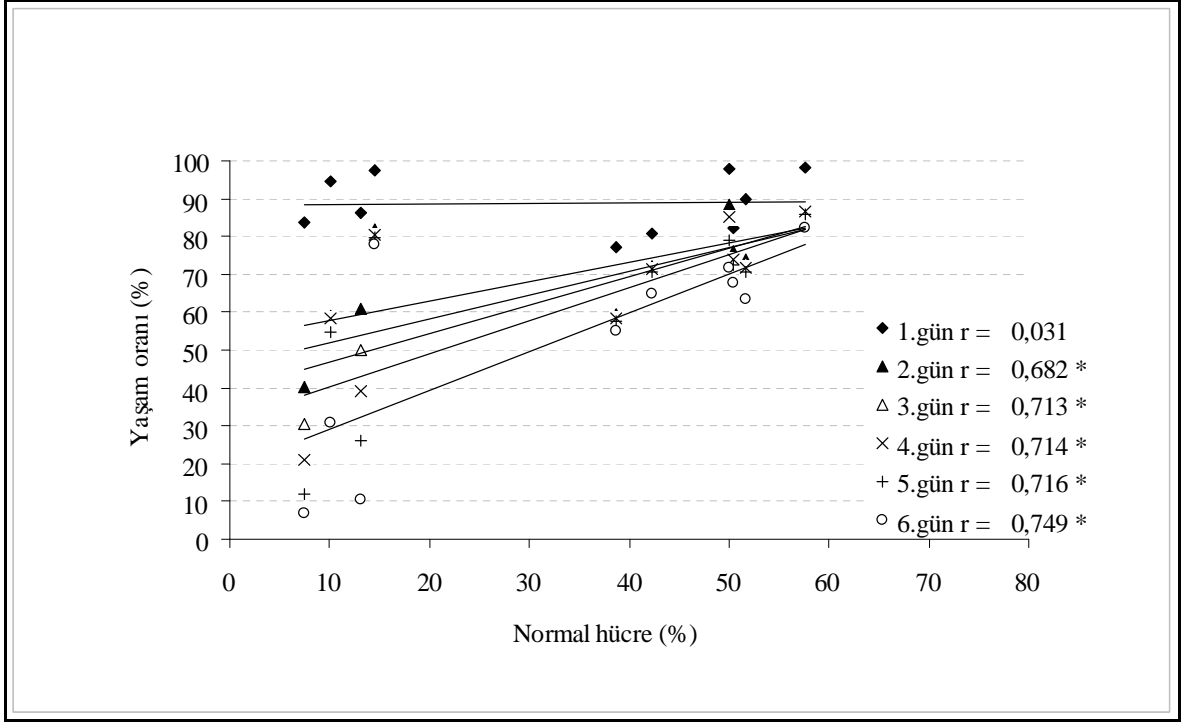
Döllenme oranı ile döllenmeden 1 gün sonraki yumurta yaşam oranları arasında önemli doğrusal pozitif ilişki olduğu tespit edilmiştir ($\alpha=0,05$, $n=10$). Döllenme oranı ile yaşam oranları (yumurtaların döllenmesinde sonraki ilk dört günde yumurtaların, yumurtadan çıkıştaki ve 1 günlük prelarvaların) arasındaki doğrusal pozitif ilişki gün geçtikçe zayıflamaktadır (Şekil 37).



Şekil 37. Döllenme oranları ile yaşam oranları arasındaki doğrusal pozitif ilişki* $\alpha=0,05$

3.5. Erken Dönem Blastomer Morfolojisi ve Yaşam Oranı Arasındaki İlişkisi

Yumurta blastomer morfolojilerinin değerlendirilmesi ile elde edilen anormal ve normal hücre oranları ile yaşam oranları (yumurtaların döllenmesinde sonraki ilk dört günde yumurtaların, yumurtadan çıkıştaki ve 1 günlük prelarvaların) karşılaştırıldığında farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Gruplarda normal hücre görünümüne sahip yumurtaların oranı ile döllenmeden 1 gün sonraki yaşam oranı arasında lineer ilişki yoktur. Bununla birlikte normal görünüme sahip hücrelerin oranları ile yaşam oranları arasında önemli doğrusal pozitif ilişki ($\alpha=0,05$, $n=10$) döllenmeden 2 gün sonra ortaya çıkmış ve larva çıkışından bir gün sonrasına kadar artarak devam etmiştir (Şekil 38).



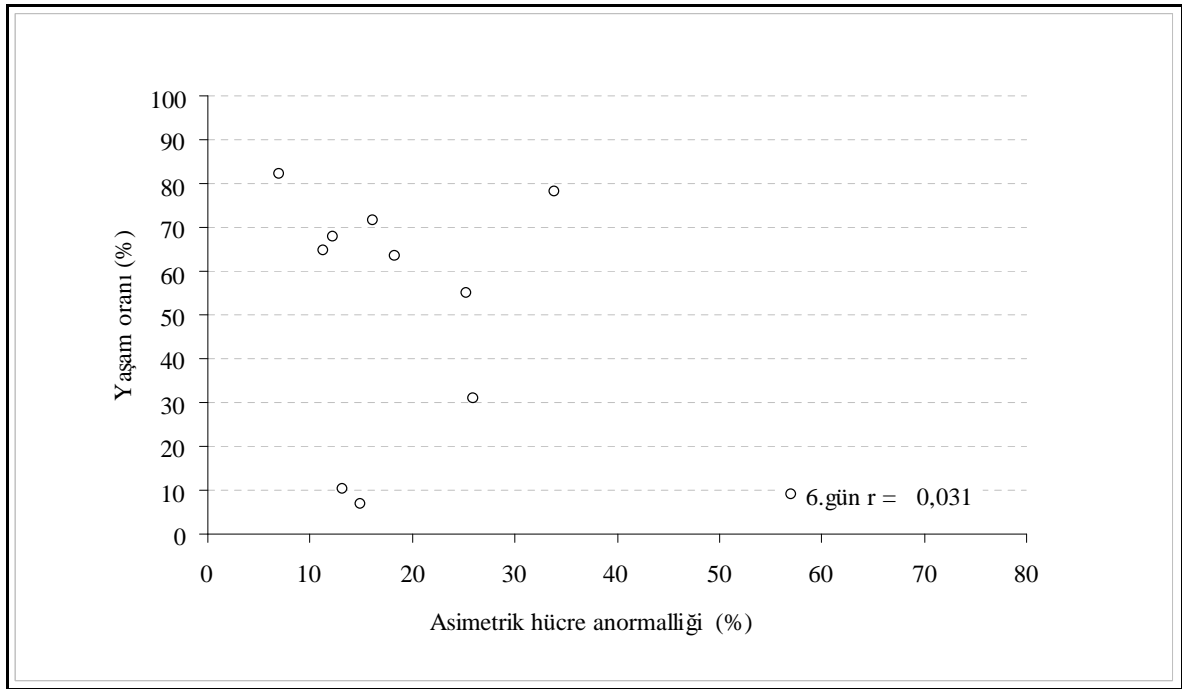
Şekil 38. Normal blastomer görünümünde hücre oranları (%) ile 1., 2., 3., 4. gündeki yumurtaların, 5. günde yeni çıkmış ve 6. günde 1 günlük prelarvaların yaşam oranları arasındaki doğrusal pozitif ilişki. * $\alpha=0,05$

Asimetrik hücre görünümüne sahip yumurta grupları ile yaşam oranları arasındaki ilişki incelendiğinde, döllenmeden sonraki gelişme dönemlerinin hiçbirinde önemli bir korelasyon ($\alpha=0,05$, $n=10$) görülmemiştir (Şekil 39, Tablo 7). Bunun tersine kontrol grubu yumurtalarda görülen asimetrik hücre oranı ile şok grubu yumurtaların yaşama oranları karşılaştırıldığında zayıf doğrusal negatif ilişkinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 40). 4. anaça ait veriler çıkarıldıktan sonra yapılan değerlendirmede doğrusal negatif ilişkinin gücünün arttığı ve 6. günde önemli hale geldiği tespit edilmiştir ($\alpha=0,05$, $n=4$) (Şekil 41).

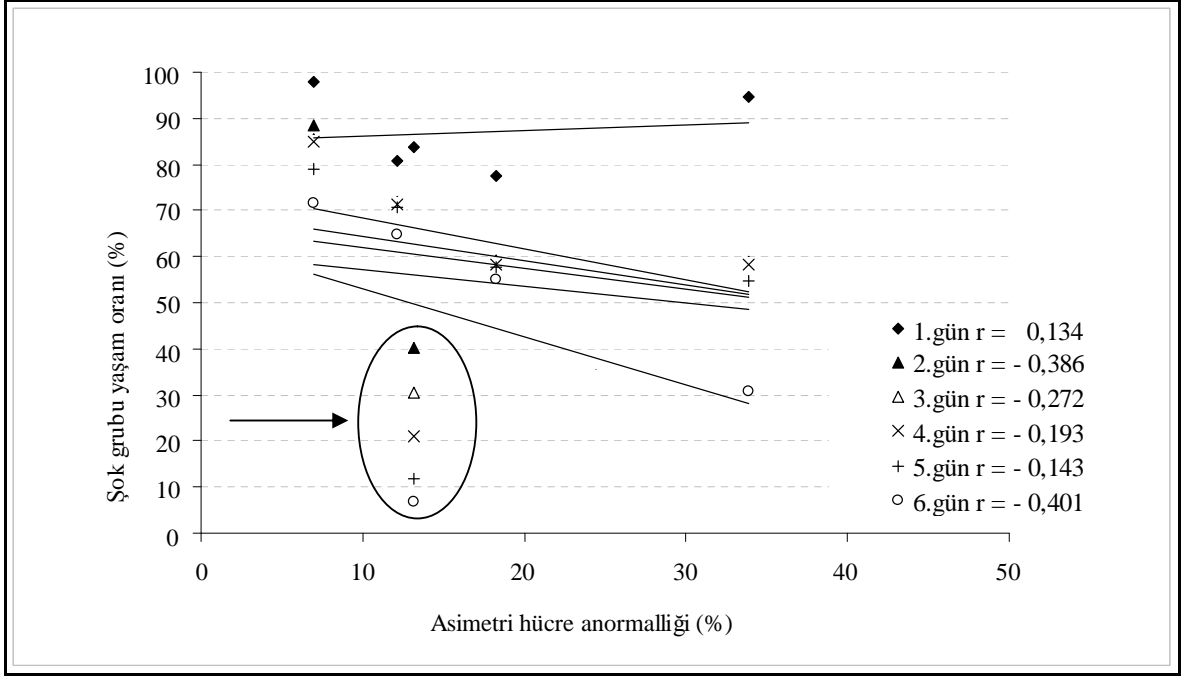
Hücre büyüklüğü farklı olan yumurta grupları ile yaşam oranları arasında da gelişme dönemlerinin hiçbirinde önemli bir ilişki ($\alpha=0,05$, $n=10$) yoktur (Şekil 42, Tablo 7). Kontrol grubundaki farklı büyüklükte hücre oranları ile şok grubunun yaşam oranları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde zayıf doğrusal negatif ilişki görülmüştür (Şekil 43). 4 deneye ait veriler uzaklaştırıldığında 6. günde ilişki önemli hale gelmiştir ($\alpha=0,05$, $n=4$) (Şekil 44).

Tablo 7. Yumurtalarda gözlenen anormallik tiplerinin değerleri (%) ile yaşam oranları (%) arasındaki ilişkiler. n=10 * $\alpha=0,05$, ** 5. gün yumurta çıkışı

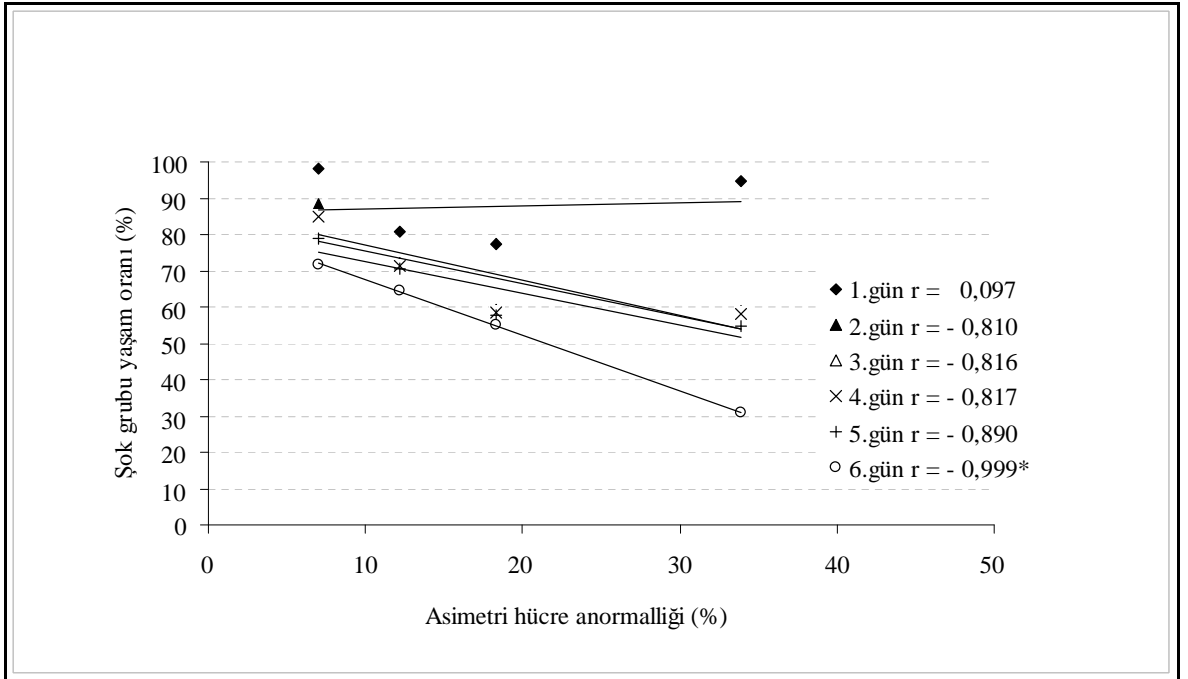
Anormallik tipleri	Döllenmeden sonra geçen süre (Gün) **					
	1	2	3	4	5	6
Normal	0,031	0,682*	0,713*	0,714*	0,716*	0,749*
Asimetri	0,151	- 0,058	- 0,058	0,001	0,033	0,031
Farklı büyüklükte hücreler	0,041	- 0,366	- 0,303	- 0,254	- 0,192	- 0,214
Birbirinden ayrık hücreler	- 0,524	- 0,509	- 0,569	- 0,572	- 0,602	- 0,579
Kenarı çizgisi belirgin olmayan hücreler	0,002	- 0,634*	- 0,727*	- 0,783*	- 0,829*	- 0,855*



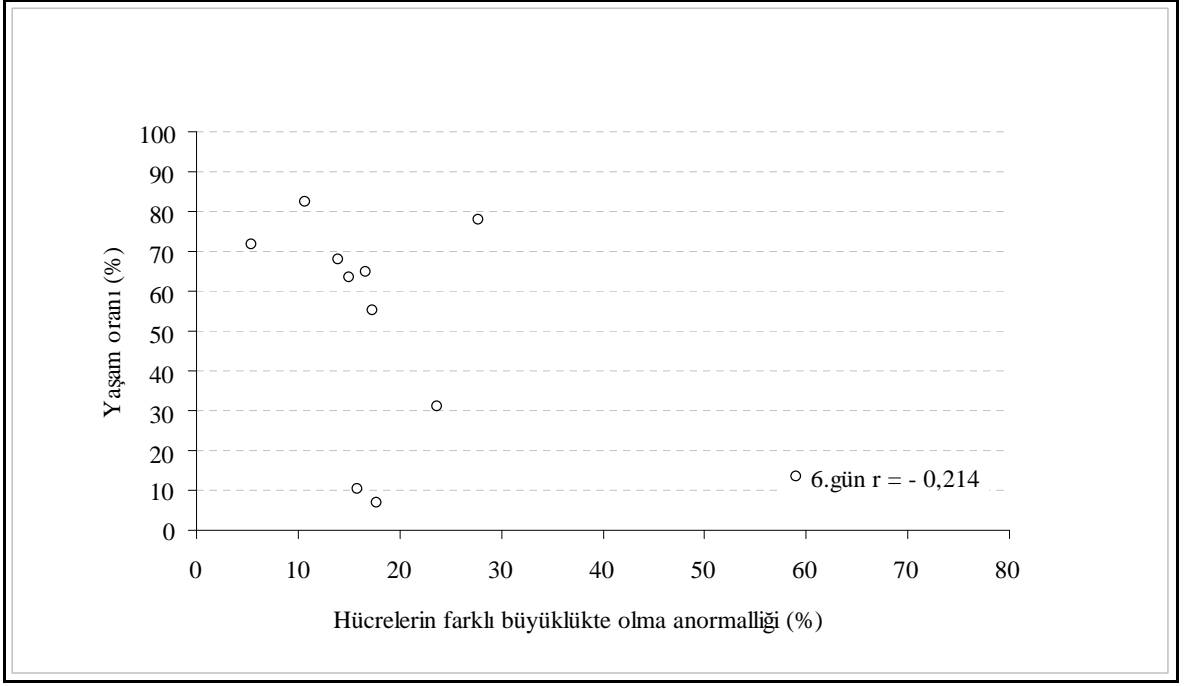
Şekil 39. Hücrelerin asimetrik olma anormallığı (%) ile döllenmeden sonraki 6. günde 1 günlük prelarvaların yaşam oranları arasındaki ilişki.



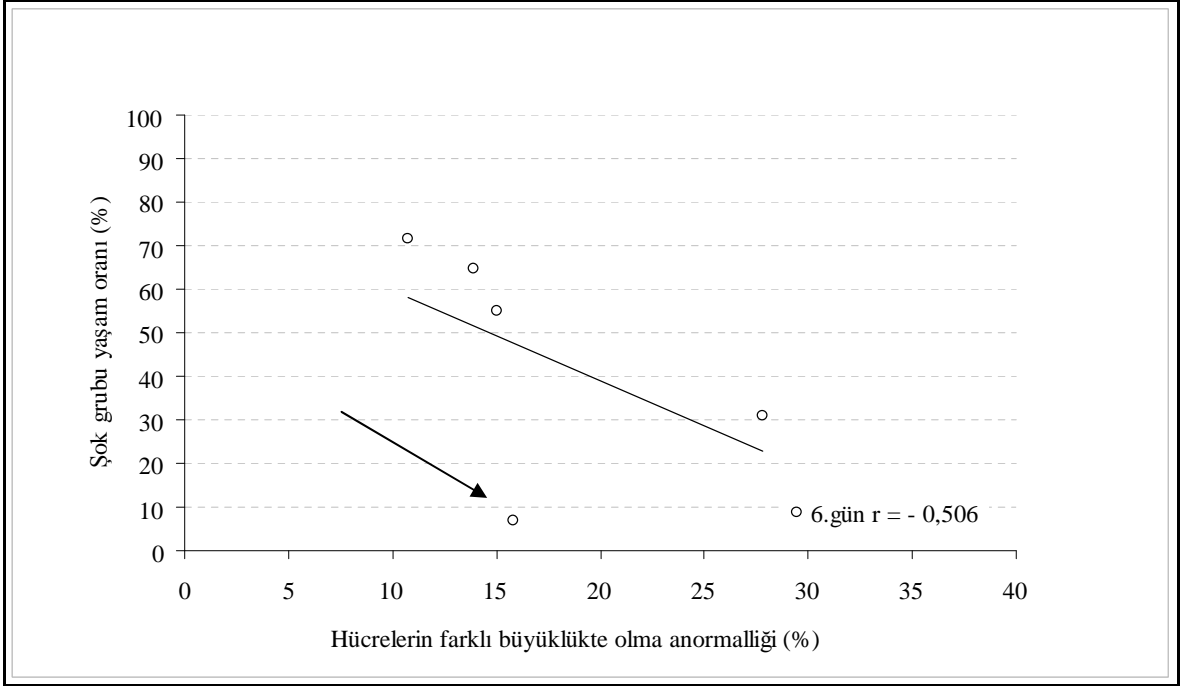
Şekil 40. Asimetrik blastomer görünümüne sahip hücre oranları (%) ile şok grubu yaşam oranları arasındaki ilişkiler



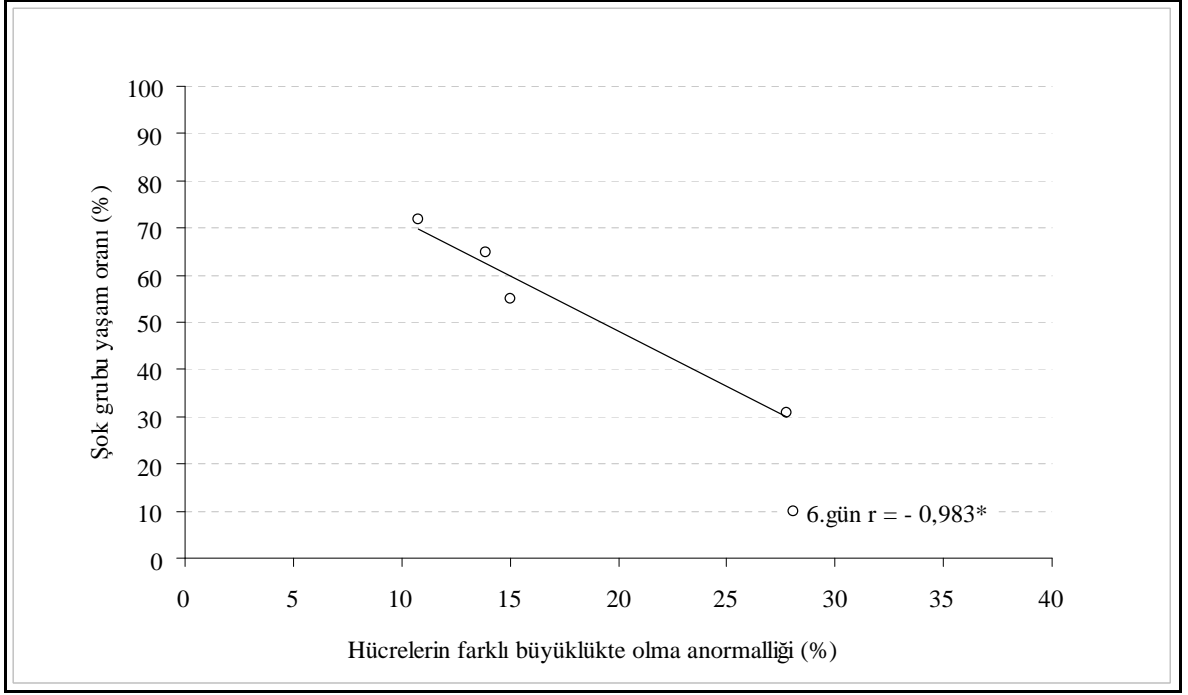
Şekil 41. Asimetrik hücrelerin oranları (%) ile şok grubu yaşam oranları arasındaki doğrusal negatif ilişkiler. * $\alpha=0,05$



Şekil 42. Hücre büyüklüğü anormalliği (%) ile yaşama oranları arasındaki ilişki



Şekil 43. Hücre büyüklüğü anormalliği (%) ile 1 günlük şok grubu prelarvaların yaşama oranları arasındaki ilişki.



Şekil 44. Hücre büyüklüğü anormalliği (%) ile 1 günlük şok grubu prelarvaların yaşama oranları arasındaki önemli doğrusal negatif ilişki. * $\alpha=0,05$

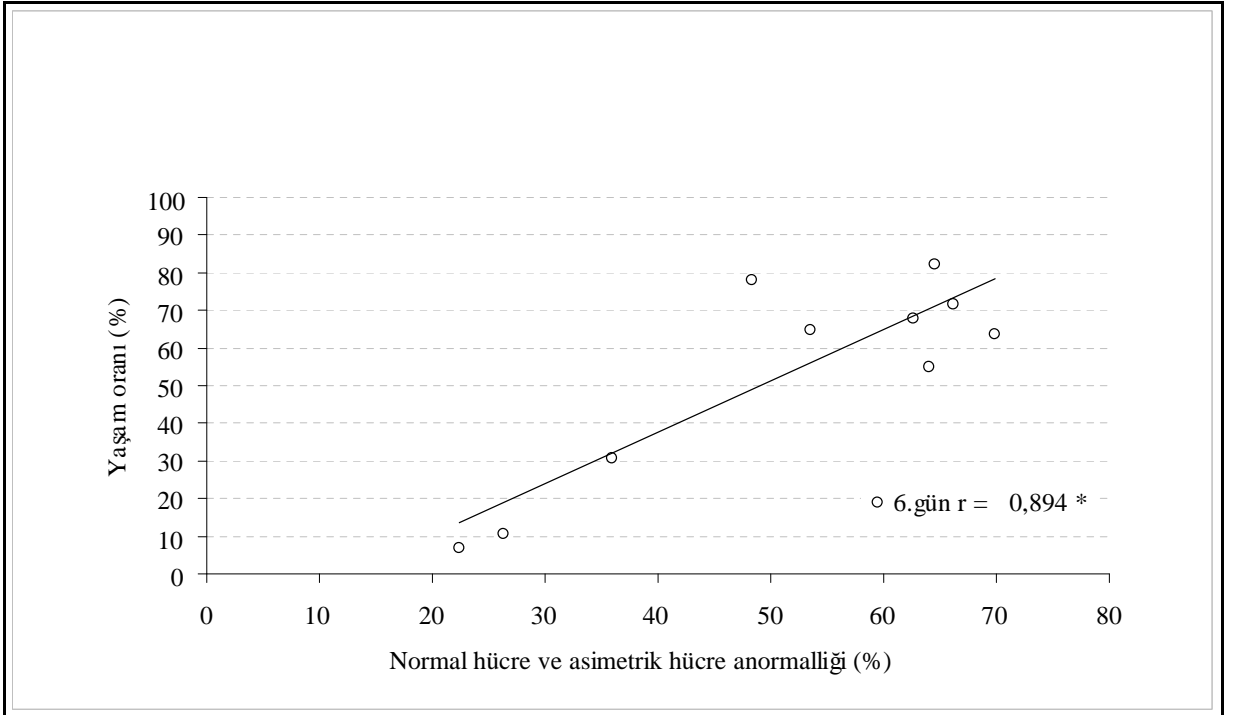
Normal görünüme sahip hücrelerle 6. gündeki yaşam oranı arasındaki ilişki incelendiğinde Şekil 45’de ok ile gösterilen nokta dikkat çekici bir biçimde ilişkinin genel seyirinden farklı bir durum sergilemektedir.

Normal hücre oranları ile asimetric hücre oranları birleştirilerek yaşam oranları arasındaki ilişki incelendiğinde korelasyon katsayısı değerinin artmış olduğu, 6. günde en yüksek değerine ulaştığı görülmüştür (Şekil 46).

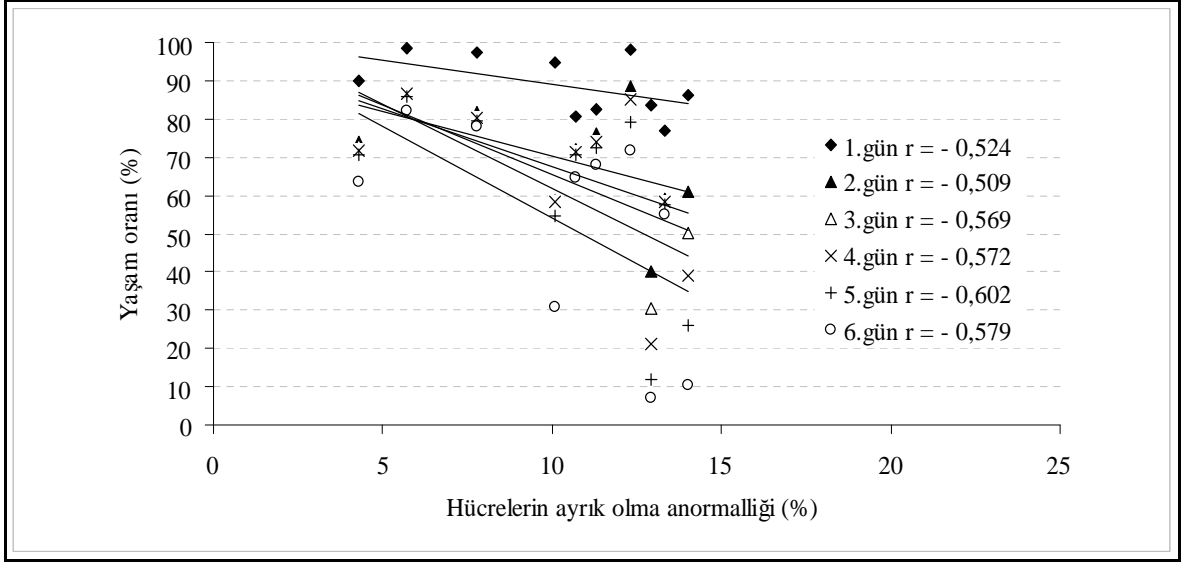
Birbirinden ayrı hücrelerin oranları ile yaşam oranları arasında normal görünüme sahip hücreler ve diğer tüm anormalliklerden farklı olarak 1. günde negatif doğrusal bir ilişki ortaya çıkmış ve 6. güne kadar devam etmiştir (Şekil 47).



Şekil 45. Normal blastomerli yumurta oranları (%) ile yaşama oranları arasındaki önemli doğrusal pozitif ilişki. * $\alpha=0,05$

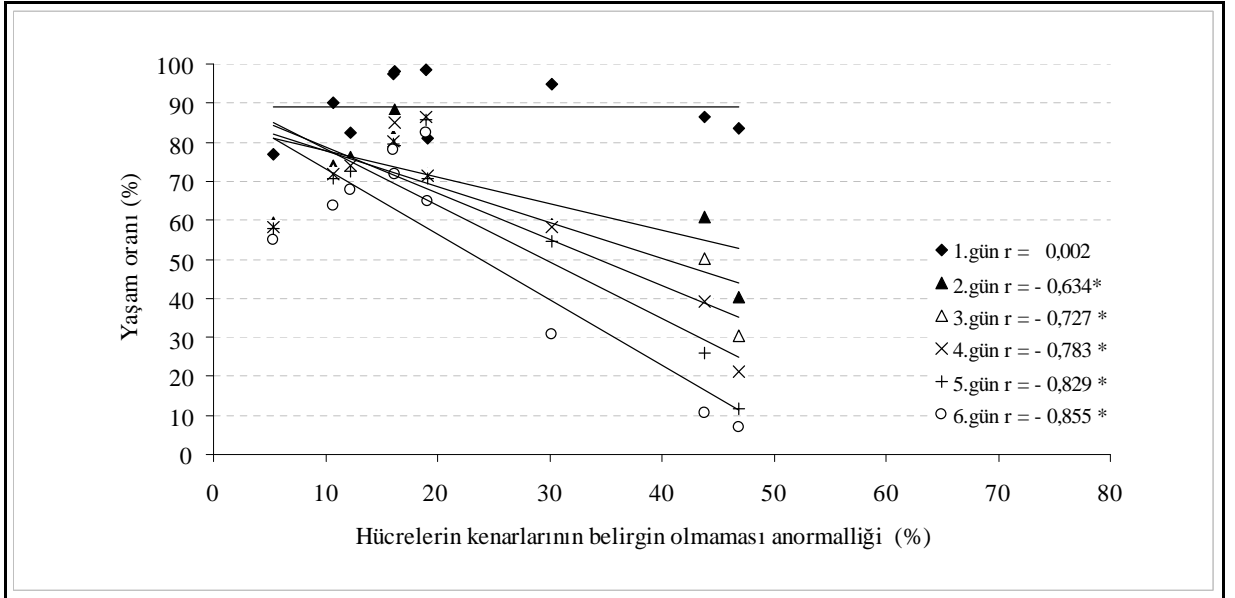


Şekil 46. Normal blastomerli yumurta oranları ve asimetrik hücre anormalliği oranları (%) ile yaşama oranları arasındaki önemli doğrusal pozitif ilişki. * $\alpha=0,05$



Şekil 47. Birbirinden ayırık hücre anormalliği oranları (%) ile yaşam oranları arasındaki doğrusal negatif ilişkiler.

Hücre kenarlarının belirgin olmaması yaşam oranıyla ilişkili bir diğer anormallik çeşididir. Döllenmeden 1 gün sonra kenarları belirgin olmayan hücre oranı ile yaşam oranı arasında bir ilişki görülmemiştir. Bunun aksine diğer günlerde negatif doğrusal önemli ilişki bulunmuştur (Şekil 48).



Şekil 48. Kenarları belirgin olmayan hücrelerin oranları (%) ile yaşam oranları arasındaki ilişki. * $\alpha=0,05$

4. TARTIŞMA

Bu çalışma, son on yıldır SUMAE'de yavru üretimi yapılan Karadeniz kalkanın, yumurta blastomer morfolojisini incelenmek ve triploid uygulamasının etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Atlantik kalkanında blastomer morfolojisi normal ve anormal gibi genel bir değerlendirme ile ele alınmış (Kjørsvik ve ark., 2003) iken Karadeniz kalkanında blastomer morfolojisinde görülen anormallik çeşitleri bu çalışma ile ayrı ayrı ele alınmıştır.

Bu çalışmanın ana hedefleri, Karadeniz kalkan balıklarında larva üretiminin erken aşamasında yumurta kalitesini belirleyecek uygulaması kolay ve pratik kriterler bulmak ve soğuk şok uygulamasının bu kriterlere etkisini ortaya koymak olmuştur. Beş ayrı anaç kalkandan elde edilen döllenmiş yumurtalara döllenmeden 6,5 dakika sonra 20 dakika süre ile soğuk şok uygulanmış ve 5 şok, 5 kontrol grubu oluşturulmuştur. Her bir gruptan 100–150 yumurtanın resmi 4–8'li hücre bölünmesi aşamasında resimlenerek blastomer morfolojisi değerlendirilmiştir. Ayrıca blastomer morfolojisi ile yaşam oranlarının ilişkileri her iki grup için incelenmiştir. Normal hücre oranları %57,6 ile %7,5 arasında değişmiştir. Asimetrik hücre anormalliği %33,9 ile %7,6 arasında, hücrelerin farklı büyüklükte olma anormalliği %27,8 ile %6,0 arasında, birbirinden ayrık hücreler anormalliği %14 ile %5,7 arasında, kenar çizgisi belirgin olmayan hücre anormalliği %46,9 ile %5,3 arasında değiştiği görülmüştür. Kontrol gruplarında gözlenen normal hücre oranı soğuk şok grubunda gözlenenden daha yüksek bulunmuştur. Anormalliklerde en yüksek payı kenar çizgileri belirgin olmayan anormallik tipinin aldığı belirlenmiştir. Normal hücre oranı ile yaşam oranı arasında doğrusal önemli ilişki olduğu bulunmuştur. Birbirinden ayrık hücreler anormalliği ve kenar çizgisi belirgin olmayan hücre anormalliğinin kötü kalite göstergesi olabileceği tespit edilmiştir. Asimetrik hücre anormalliği ve hücre büyüklüklerinin farklı olması anormalliği soğuk şok gibi etkenlerin yumurtayı etkilemesi durumunda kötü kalite göstergesi olabileceği gözlenmiştir.

Dünyanın çeşitli ülkelerinde, Shield vd. (1997) Atlantik halibutu (*Hippoglossus hippoglossus*), Rideout vd. (2004) morina (*Melanogrammus aeglefinus*), Valin ve Nissling, (1998) ve Rani (2005) Atlantik morinası (*Gadus morhua*), Kjørsvik vd. (2003) Atlantik kalkanı gibi türlerde blastomer morfolojisini inceleyerek yumurta kalitesi hakkında fikir

sahibi olmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışma ülkemizde yapılan ilk blastomer morfolojisi değerlendirme çalışmasıdır. Karadeniz kalkanında blastomer morfolojisinde görülen anormallik çeşitleri ayrı ayrı ele alınarak yaşam oranları ile ilişkileri ortaya koyulmuştur. Ayrıca, Atlantik morinasında (Rani, 2005) yapılan çalışmaya benzer şekilde triploid birey oluşturmak maksatlı uygulanan soğuk şokun blastomer morfolojisine etkisi incelenmiştir. Ünlü (2004) ve Öztürk (1998)'ün çalışmaları gibi ülkemizde gökkuşağı alabalıklarında yapılan çalışmalar olmasına karşın, bu çalışma ülkemizde deniz balıklarında triploid uygulaması ile ilgili yapılan ilk çalışmadır.

4.1. Döllenme ve Çıkış oranları

Deniz balıklarında döllenme oranının yumurta kalite kriteri olarak kullanılması konusunda yeteri kadar kanıt yoktur (McEvoy, 1984; Rideout ve ark., 2004; Aydın ve Polat, 2007). Her ne kadar Kjörsvik vd. (2003) Atlantik kalkan balığında döllenme oranı ile çıkış oranı arasında ilişki olduğunu ifade etseler de Karadeniz kalkan balığında böyle bir ilişki yoktur (Aydın ve Polat, 2007). Bu çalışmada da döllenme oranı ile çıkış oranı arasında önemli doğrusal ilişki görülmemiştir ($r=0,502$, $n=10$, $\alpha=0,05$). Bu çalışma anormal blastomerin çıkış üzerine olumsuz etkisi olduğu konusunda diğer çalışmalar (McEvoy, 1984; Devauchelle ve ark., 1988; Pickova, 1997) ile paralellik göstermektedir.

4.2. Soğuk Şok Uygulaması

Yumurtanın soğuk şok ile muamele edilmesi triploid balık elde edilmesinde veya ginogenezin uygulanmasında kullanılır. Triploid uygulamanın amacı steril balık üretmektir. Bu nedenle canlının üremesi için kullanacağı enerjiyi büyümesi için harcaması beklenir. Atlantik kalkanında triploid bireyler diploidlerden daha hızlı büyürler ve yaşam oranları da daha yüksektir (Cal ve ark., 2006).

Atlantik kalkanında yoğun miktarda yumurtaya (150 -300 ml) 0°C'nin altında soğuk şok uygulanabilmesi için önceden hazırlanan soğutulmuş deniz suyunun sıcaklığı -2°C olmalıdır (Piferrer ve ark., 2003). Buna karşın soğuk şok ortamı olarak kullanılan Karadeniz'in ‰ 18 tuzluluktaki suyunda -1°C'den daha düşük sıcaklıklarda buz kristalleri oluşmaya başladığı gözlenmiştir. Bu durumda yumurtanın dış kısmında çatlaklar oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 22). Yumurtaların dış kısmında çatlaklar oluşması her ne kadar direkt olarak yumurta ölümlerine neden olmadığı gözlenmiş olsa da yaşam oranları üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Karadeniz kalkanında 70 ml yumurtaya yapılacak uygulama için

önceden soğutulmuş deniz suyunun sıcaklığı -1°C olarak sağlanmıştır. Atlantik kalkanında soğuk şok uygulaması esnasında yumurtaların sıcaklığı $13-14^{\circ}\text{C}$ 'den 0°C 'nin altına hızla inerken içinde yumurta bulunan soğuk şok ortamının sıcaklığı da hızla -2°C 'den 0°C 'ye yükselir (Piferrer ve ark., 2003). Bu çalışmada, Karadeniz kalkan balığı yumurtalarının bulunduğu sıcaklık 14°C 'dir. Yumurtaların soğuk şok ortamına aktarılması ile yumurta sıcaklığının hızla düştüğü ve içinde yumurta bulunan soğuk şok ortamının sıcaklığının da hızla -1°C 'den 0°C 'ye yükseldiği gözlenmiştir. Takiben yumurtaların ve ortamın sıcaklığı eşitlenmiş ve 20 dakika süre ile -1°C ile 0°C arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 13).

4.3. Embriyonik Gelişime Ait Sonuçlar

Kjørsvik vd. (2003) *Psetta maxima*'da anormallikeri sınıflandırmamış ve asimetri olarak isimlendirmiştir. Yaptığı çalışmada anormallik oranlarının %5-95 arasında değiştiğini belirtmiştir. Rideout vd. (2004) *Melanogrammus aeglefinus* blastomerlerinde görülen asimetri, hücre büyüklüğü, hücrelerin kenar çizgilerinin belirgin olmayışı ve hücrelerin birbirinde ayrık olması anormalliklerinin %10-90 arasında değiştiğini beyan etmiştir. Rani (2005) *Gadus morhua*'da asimetri, hücre büyüklüklerinin farklı olması, blastomer grubundan ayrı çıkıntı oluşturan hücreler (outcrop) ve birbirinden ayrı blastomerler gibi anormalliklerin %1-7 gibi çok düşük oranlarda ortaya çıktığını rapor etmiştir. Bu çalışmada asimetric hücre, hücre büyüklüğü, hücrelerin kenar çizgilerinin belirgin olmayışı ve hücrelerin birbirinden ayrık olması anormalliklerinin % 5,3-46,9 arasında değiştiği görülmüştür.

Atlantik morinası (Kjørsvik ve Lønning, 1983; Kjørsvik ve ark., 1984), halibut (Shields ve ark., 1997) ve Atlantik kalkanı (Kjørsvik ve ark., 2003) gibi deniz balıklarında normal blastomer oranı ile prelarva oluşum oranı arasındaki korelasyon döllenme oranı ile prelarva oluşumu oranı arasındaki ilişkiden daha kuvvetlidir. Valin ve Nissling (1998)'in sonuçlarına benzer şekilde döllenme oranı ile anormal hücre morfolojisi arasında önemli korelasyon görülmemiştir. Karadeniz kalkan balığında döllenme oranı yumurtanın 1. gündeki yaşama oranı ile pozitif doğrusal önemli bir ilişki sergilerken, daha sonraki günlerdeki yaşama oranı ile döllenme oranı arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı görülmüştür (Şekil. 36). Öte yandan normal blastomer oranı ile 1. gündeki yaşam oranı arasında döllenme oranı ile 1. gündeki yaşam oranı arasındaki ilişkiye ters olarak herhangi bir korelasyon tespit edilmemiştir. Bununla birlikte 2. günden 6. güne kadar olan normal

blastomer oranı ile yaşam oranı arasında her geçen gün artan doğrusal pozitif önemli bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Şekil 37).

4.4. Erken Dönem Yaşam Oranlarının Karşılaştırılması

Kontrol, yalancı kontrol ve soğuk şok grupları arasında 1. günde önemli bir farklılık görülmemiştir. Fakat 3. anacın dışındaki tüm anaçların bazı günlerinde önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Buna göre 2. anacın 3., ve 4., günlerinde yalancı kontrol ve kontrol grupları arasında önemli fark olmasına rağmen diğer günlerde ne şok ne de kontrol grupları arasında önemli fark görülmemiştir. Yalancı kontrol ile kontrol arasındaki farka bakıldığında, yalancı kontrol şartlarının yaşam oranlarını etkilemediği düşünülebilir. Fakat yalancı kontrol ile şok arasındaki farkın önemli olmaması nedeniyle yalancı kontrol şartlarının yaşam oranlarını düşürdüğü sonucuna varılabilir.

Tüm anaçlarda, 1. ve 5. anaçlarda önemli düzeyde olmak üzere şok gruplarının 6. gününde görülen yaşam oranı düşük bulunmuştur. Bu durumun yumurtadan çıkma başarısı gösteren kötü kaliteli prelarvaların ölmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Tüm anaçların bütün gruplarında 2. günde diğer günlerden farklı olarak yoğun ölümlerin olduğu görülmüştür. Valin ve Nissling (1998) de yoğun ölümlerin gastrula safhası ile embriyo oluşumu öncesinde görüldüğünü belirtmiştir. 4. anacın 2. gününde şok grubunun yaşam oranının kontrol grubundan önemli derecede farklı olduğu görülmüştür. Bu duruma yumurta kalitesinin kötü olmasının neden olabileceği tahmin edilmektedir. 5. anaçta gözlenen asimetric hücre anormalliğinin ve hücre büyüklüğü farklı olma anormalliğinin toplamı % 62 olurken diğer anaçlarda % 18–33 arasında değişmektedir. Bu durum, 5. anacın şok grubunda elde edilen yaşam oranlarının diğer gruplardan düşük olmasının nedeni olabilir.

4. anacın tüm gruplarında yaşam oranı en düşük çıkmıştır. Yumurta kalitesini anacın genetik potansiyeli, sağım zamanı, anacın yaşı, yumurtaya ait özellikler, yumurtanın olgunlaşma durumu, gibi özellikler etkileyebilir (Kjørsvik, vd. 1990; Brooks ve ark., 1997). Bu deneyde kullanılan anacın yaşı, beslenmesi, sağım zamanı diğerler anaçlar ile aynıdır. Yumurtanın kötü kaliteli olmasının nedeni anacın genetik yapısı veya ovulasyon zamanının farklı olması olabilir.

4.5. Erken Dönem Blastomer Morfolojisi ve Yaşam Oranı Arasındaki İlişki

Valin ve Nissling (1998) yumurtalarda varolan erken dönemdeki anormalliklerin ortadan kaybolup normal olarak gelişebildiğini ve anormal olmayan larvaların oluşabileceğini ifade etmiştir. Ayrıca, yumurtanın ileri safhalarında görülen özel fonksiyona sahip farklılaşmış hücrelerin meydana gelebilecek anormallikler konusunda erken dönemde görülen farklılaşmamış hücrelerden daha hassas olduklarını belirtmiştir. Öte yandan, gastrula safhasında yoğun ölümlerin görülmesinin hücre farklılaşmasından kaynaklanmış olabileceğini beyan etmiştir. Dolayısıyla, hücre anormalliklerinin ortaya çıkış zamanının önemli olduğunu, ve erken dönem anormalliklerinin her zaman kötü yumurta göstergesi olarak ele alınmaması gerektiğini vurgulamıştır.

Kjørsvik vd. (1990) erken dönem blastomer morfolojisinin yumurta değerlendirilmesinde kullanılabilirliğini ifade etmiştir. Kjørsvik vd. (1994) ise erken dönemdeki farklılaşmamış bir hücrede var olan anormalliğin, gelişmenin ileriki dönemlerinde olan farklılaşmış bir hücrede bulunan anormallikten daha çok etkili olduğunu belirtmiştir. Erken dönemde görülen anormallik oranlarının gelişmenin ileriki dönemlerinde görülen ölümlerden dolayı azaldığını ifade etmiştir. Benzer şekilde, Rideout vd. (2004) erken dönemde görülen anormalliklerin ileri dönemde görülen anormalliklerden daha önemli olabileceğini çünkü her bir anormal hücre kendisinden birçok kopya oluşturarak gelişeceğini düşünmektedir.

Rani (2005) blastomerlerde görülen anormallik oranlarında soğuk şok uygulanması ile yükselme olduğunu bildirmektedir. Ancak yumurta yaşam oranları açısından soğuk şok grubu ile kontrol grubu arasında önemli fark görülmediğini beyan etmiştir. Bununla birlikte anormallik oranı ile çıkış arasında bir korelasyon oluşmadığını ifade etmiştir. Dolayısıyla bu çalışma sonuçlarına göre blastomer morfolojisinin yumurtaların değerlendirmesinde iyi bir gösterge olarak kullanılmasının düşünülemeyeceğini belirtmiştir.

Blastomer değerlendirmelerinin simetrik ve simetrik olmayan şekilde tasnif edilmeleri (Valin ve Nissling, 1998; Kjørsvik ve ark., 2003; Avery ve ark., 2005) yumurta yaşam başarısını açıklamada yeterli olmayabilir. Buna karşın, blastomerlerin gösterdikleri anormallik tiplerinin ayrı ayrı incelenmesi (Shield ve ark., 1997; Rideout ve ark., 2004; Rani, 2005) daha faydalı olabilir. Nitekim, Valin ve Nissling, (1998) anormallikleri tasnif etmedikleri bir çalışmada Baltık morinasında gelişmenin erken döneminde birçok blastomer anormalliği görülen yumurtaların normal olarak gelişebildiğini ve larva

üretebildiğini rapor ettiler. Bu durum, Rideout vd. (2004)'un *Melanogrammus aeglefinus* blastomerlerinde görülen asimetri ve hücre büyüklük farkının larva çıkış oranını azaltmadığını göstermesiyle desteklenmektedir. Blastomer anormalliklerinin tasnif edildiği bu çalışmada asimetric blastomer anormalliği gösteren yumurta grupları, uygun şartlarda tutulduklarında yaşam oranları ile bu anormallik tipi arasında doğrusal negatif bir ilişki olmadığı görülmüştür (Tablo 7, Şekil 38). Bilakis normal hücre oranları ile asimetric hücre oranları birleştirilerek 6. gündeki yaşam oranları ile doğrusal önemli pozitif bir korelasyon ($r=0,894$, $n=10$, $\alpha=0,05$) olduğu belirlenmiştir (Şekil 44, 45). Ancak, soğuk şok gibi bir etkenin devreye girmesi ile doğrusal önemli negatif bir ilişkinin olduğu bulunmuştur (Şekil 39,40). Hücrelerin farklı büyüklükte olması anormalliğinde de benzer durumun ortaya çıktığı görülmüştür (Tablo 7, Şekil 41-43). Shield vd. (1997) blastomerlerde görülen anormallik tiplerinin birkaçının aynı yumurtada birlikte ortaya çıkabileceğini ifade etmiştir. Sonuç olarak, hücrelerin farklı büyüklükte olma anormalliği veya asimetric blastomer anormalliğinin tek başına görülmesi direk olarak kötü kalite kriteri olarak değerlendirilmemelidir. Bilakis, bu kriterlerin hassaslığın bir göstergesi olarak ele alınması daha uygun olabilir.

Hücrelerin ayırık olma anormalliği ile yaşam oranı arasında doğrusal negatif ilişki görülmüştür (Şekil 46). Benzer şekilde hücre kenarlarının belirgin olmaması anormalliği ile yaşam oranı arasında doğrusal önemli negatif ilişki görülmüştür (Şekil 47). Bu sonuçlara göre hücrelerin ayırık olma anormalliği ve hücre kenarlarının belirgin olmaması anormalliklerinin görülme sıklığı yumurtanın kalitesinin değerlendirilmesinde gösterge olarak kullanılabilir.

Valin ve Nissling (1998)'e göre blastomer anormalliğinin yumurta yaşamını etkilemesi yumurta grubunun yanında anacın genetik potansiyeline bağlı olabilir. Bu sonuçların pekiştirilmesi için aynı anacın farklı yumurta grupları ve farklı anaçlardan elde edilecek yumurtalar üzerinde çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca her bir yumurtanın ayrı ayrı değerlendirilebileceği şekilde muamele edilmesi yararlı olabilir.

Bu çalışmada anormallikler asimetric hücre anormalliği, hücrelerin farklı büyüklükte olma anormalliği, hücrelerin ayırık olma anormalliği ve hücrelerin kenarlarının belli olmama anormalliği olarak sınıflandırılmıştır. Valin ve Nissling (1998) tarafından ifade edilen görüş, asimetric hücre anormalliği veya hücrelerin farklı büyüklükte olma anormalliğinin yoğun şekilde görülmesi ile desteklenebilir. Kaldı ki bu çalışmada hücrelerin ayırık olma anormalliği ile yaşama oranı arasında negatif doğrusal bir ilişki

döllenmeden bir gün sonra görülmüştür. Kjørsvik vd. (1994) tarafından ifade edilen görüş ise hücrelerin ayırık olma anormalliği veya hücrelerin kenarlarının belli olmama anormalliğinin yoğun şekilde görülmesi ile desteklenebilir. Rani (2005)'in sonuçları, değerlendirdiği yumurta grubundaki anormallik oranlarının %3-7 gibi çok düşük seviyelerde olmasından kaynaklanabilir. Bu çalışma sonuçlarına göre, blastomerlerde gözlenen asimetrik hücre anormalliği veya hücrelerin farklı büyüklükte olma anormallikleri yumurtaların hassasiyetinin göstergesi olarak kullanılabilir. Ancak, blastomerlerde gözlenen hücrelerin ayırık olma anormalliği veya hücrelerin kenarlarının belli olmama anormallikleri yumurtaların kalitesinin göstergesi olarak değerlendirilebilir. Bu anormalliklerin görülme sıklığının artması yumurtaların kalitesinin kötü olduğu, azalması veya hiç olmaması ise yumurtaların kalitesinin iyi olduğu şeklinde yorumlanabilir..

5. SONUÇLAR

Bu araştırmada, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Deniz Balıkları Kuluçkahanesi orijinli Karadeniz kalkanı damızlıklarından elle sağım ile elde edilen yumurtalarda kaliteyi etkileyen unsurlar belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen yumurtaların blastomer morfolojileri ve yaşam oranları incelenmiştir. Ayrıca, triploid oluşturmak için uygulanan soğuk su şokunun etkileri de değerlendirilmiştir. Yumurtalarda erken dönemde görülen anormallikler ve oranları, dölllenme ve çıkış oranları, yumurtaların yaşam oranları, anormalliklerin yaşam oranları ile ilişkileri, soğuk şok uygulanması esnasındaki diğer etkenler, soğuk şokun yumurta morfolojisine ve yaşam oranına etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Kontrol ve şok grubunda dölllenme oranları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Dölllenme oranları ile çıkış oranları arasında önemli bir ilişki görülmemiştir ($r=0,502$, $n=10$, $\alpha=0,05$). Normal veya anormal blastomer oranları ile dölllenme oranları arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır ($\alpha=0,05$, $n=10$). Öte yandan, anormal blastomerin çıkış üzerine olumsuz etkisi olduğu görülmüştür.

2. Soğuk şok gruplarında gözlenen anormal hücre oranları kontrol gruplarında gözlenenlerden daha yüksek bulunmuştur. Anormalliklerde en yüksek payı hücre kenar çizgileri belirgin olmayan anormallik tipinin, en düşük payı ise birbirinden ayrıık hücreler anormallik tipinin aldığı gözlenmiştir.

4. Kontrol ve şok grupları arasında 1, 3. ve 5. anaçlarda anormallik oranları ve normal blastomer oranları açısından önemli farklılıklar bulunmuştur ($p<0,01$, $SD=4$, $\chi^2=7,78$).

5. Yumurtalar içinde buz kristalleri olan suya döküldüğünde dış kısmında çatlaklar oluşmuştur.

6. Bazı anaçlarda yaşam oranları açısından kontrol ve şok arasında fark önemli bulunmuştur. Yalancı kontrol ile kontrol arasındaki farka bakıldığında, yalancı kontrol şartlarının yaşam oranlarını etkilemediği düşünülebilir. Fakat yalancı kontrol ile şok arasındaki farkın önemli olmaması nedeniyle yalancı kontrol şartlarının yaşam oranlarını düşürdüğu sonucuna varılmıştır.

7. Tüm anaçlar için son günde soğuk şok gruplarının yaşam oranları en düşük çıkmıştır. 5. anaçta şok grubunun yaşam oranının kontrol ve yalancı kontrol gruplarından düşük olması diğer deneylerde gözleendiğinden farklı şekilde olmuştur. Bu anaçta asimetrik hücre ve farklı hücre büyüklüğü anormalliklerinin yüksek oranda görülmesi düşük yaşam oranının nedeni olabilir.

8. Normal hücre görünümüne sahip hücrelerin oranları ile yaşam oranları arasında önemli doğrusal pozitif ilişki ($\alpha=0,05$, $n=10$) döllenen 2 gün sonra ortaya çıkmış ve larva çıkışından bir gün sonrasına kadar artarak devam etmiştir.

9. Döllenen sonraki gelişme dönemlerinin hiçbirinde asimetrik hücre anormalliği ile yaşam oranları arasında önemli bir korelasyon ($\alpha=0,05$, $n=10$) görülmemiştir. Bunun tersi olarak, kontrol grubu yumurtalarda görülen asimetrik hücre oranı ile şok grubu yumurtaları yaşam oranları karşılaştırıldığında zayıf doğrusal negatif ilişkinin varlığı belirlenmiştir.

10. Hücre büyüklüğü farklı olan yumurta grupları ile yaşam oranları arasında da gelişme dönemlerinin hiçbirinde önemli bir ilişki bulunmamıştır ($\alpha=0,05$, $n=10$). Kontrol grubunda ki farklı büyüklükte hücre oranları ile şok grubunun yaşam oranları arasında negatif ilişki görülmüştür.

11. Birbirinden ayrı hücreler ile yaşam oranları arasında normal görünümüne sahip hücreler ve diğer tüm anormalliklerden farklı olarak 1. günde negatif doğrusal bir ilişkinin ortaya çıktığı ve 6. güne kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Kenarları belirgin olmayan hücre oranı ile yaşam oranı arasında 1. günde bir ilişki gözlenmemiştir. Ancak diğer günlerde negatif doğrusal önemli ilişki vardır.

12. Blastomerlerde gözlenen asimetrik hücre anormalliği veya hücrelerin farklı büyüklükte olma anormalliklerinin tek başına görülmeleri direk olarak kötü kalite kriteri olarak değerlendirilmemelidir. Bu göstergeler yumurtanın hassas bir durumda olduğunun belirteci olarak ele alınmalıdır. Ancak, blastomerlerde gözlenen hücrelerin ayrı olma anormalliği veya hücrelerin kenarlarının belli olmama anormallikleri yumurtaların kalitesinin göstergesi olarak kullanılabilir. Bu anormalliklerin görülme sıklığının artması yumurtaların kalitesinin kötü olduğu, azalması veya hiç olmaması ise yumurtaların kalitesinin iyi olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Sonuç olarak, Karadeniz kalkan balığında erken dönem blastomer morfolojisi yumurta kalitesinin tahmininde kullanılabilir.

6. ÖNERİLER

Yavru üretiminde yaşam oranlarını kısıtlayan faktörlerden birisinin de yumurta kalitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca triploid, ginogenez gibi bazı biyoteknolojik uygulamalar da yumurtaya yapılan bir seri işlem sonucu gerçekleştirilmektedir. Yumurta kalitesini etkileyen birçok etken olmasına rağmen yumurtanın kalitesini belirleyecek göstergeler net olarak ortaya koyulmamıştır. Deniz balıkları yumurtalarının şeffaf olması blastomer morfolojilerini mikroskop altında kolayca inceleme imkânı sunmuştur. Bu sayede hücrelerin erken dönemde bölünme şekilleri ile yaşam başarılarının kıyaslanması konusunda çalışmalar yapılmış ve bazı araştırmacılar blastomer görünümünün yumurtaların yaşam kalitesi ile ilgili kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Son yıllarda ülkemizde yetiştiriciliğe kazandırılmaya çalışılan Karadeniz kalkan balığı yumurta kalitesi ile ilgili gösterge olabilecek kriterler ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bunun yanında triploid uygulaması için soğuk şok yapılarak yumurtaya olan etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında 4 tip anormallik incelenmiştir. Asimetrik hücre ve hücre büyüklüğünün farklı olması anormalliklerinin yumurtalarda görülmesi o yumurtaların hassas olduğunun bir göstergesi olarak düşünülmelidir.

Hücrelerin ayırık olma anormalliği veya hücrelerin kenarlarının belli olmama anormalliklerinin blastomerlerde gözlenmesi yumurtaların kalitesinin göstergesi olarak kullanılabilir. Bu anormalliklerin görülme sıklığının artması yumurtaların kalitesinin kötü olduğu, azalması veya hiç olmaması ise yumurtaların kalitesinin iyi olduğu şeklinde değerlendirilebilir.

Blastomer morfolojilerinde elde edilen bu sonuçların larva ve yavruların yaşam oranları, pigmentasyon başarısı ve metamorfoz başarısına etkilerinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

Karadeniz şartlarında soğuk şok kullanılarak triploid uygulamak için deniz suyu sıcaklığının -1°C 'den daha düşük değerlerde donmaya başladığı göz önüne alınmalıdır. Ayrıca Blastomer morfolojisi incelenmeli, asimetrik veya büyüklüğü farklı olan hücreler yüksek oranda görüldüğü yumurtaların kullanılmasından kaçınmak faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aksungur, N., Akbulut, B., Şahin, T., Üstündağ, C., Çiftçi, Y. ve Kutlu İ., 2003, Karadeniz’de kalkan balığı (*Psetta maxima*) yetiştiriciliğinin araştırılması (Tagem/Haysüd/2000/ 12/01/ 011) Proje sonuç raporu Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon, 65 s.
- Akşiray, F., 1954. Türkiye deniz balıkları tayin anahtarı. İstanbul. Üniversitesi. Fen Fak. Hidrobiyoloji Arş. Enst, Pulhan Matbaası, İstanbul, 283 s.
- Amaoka, K., Yoseda, K., Şahin, T., Üstündağ, C. ve Çiftçi, Y., 2001. Flatfishes (Order Pleuronectiformes) Found in Black Sea and Its Adjacent Waters. Special publication No.1, Central Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Trabzon, Turkey, 27 s.
- Aydın, İ., Kolotoğlu, L. ve Iwamoto, H., 2003. Spontaneous spawning of turbot (*Psetta maxima*), Central Fisheries Research Institute Research Bulletin, 3, 4.
- Aydın, İ. ve Polat, H., 2007. Karadeniz kalkan balığında yumurta inkübasyonu, Türkiye’de kalkan balığı yetiştiriciliği çalışmayı, 15-16 Kasım, Trabzon.
- Avery, T.S. ve Brown, A.,2005. Investigating the relationship among abnormal patterns of cell cleavage, egg mortality and early larval condition in *Limanda ferruginea*, Journal of Fish Biology, 67, 890-896
- Beaumont, A.R. ve Hoare K., 2003, Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture, Blackwell Science, UK, 158 s.
- Bromage, N. R., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J., ve Barker, G.,1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 100, 141–166.
- Bromage, R. N. ve Roberts, R. J. 1995. Broodstock management and egg and larval quality, Blackwell Science, London, 424 s.
- Brooks, S., Tyler, C.R., ve Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7, 387- 416.

- Cal, R.M., Vidal, S., Martinez, P., Álvarez-Blázquez, B., Gómez, C. ve Piferrer, F., 2006 Growth and gonadal development of gynogenetic diploid *Scophthalmus maximus* Journal of Fish Biology 68, 401–413.
- Cal, R.M., Vidal, S., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Martinez, P. ve Piferrer, F., 2006 Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot , (*Scophthalmus maximus*), Aquaculture, 256, 99-108.
- Chanet, B., 2003, Interrelationships of Scopthamid fishes (Pleuronectiformes: Scopthalmidae) Cybium, 27, 275-286.
- Chereguini, O., Garcia de la Banda, I., Rasines, I. ve Fernandez, A., 1999. Artificial fertilization in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): different methods and determination of the optimal sperm-egg ratio, Aquaculture Research, 30, 319-324
- Çiftçi, Y., Üstündağ, C., Erteken, A., Özongun, M., Ceylan, B., Haşimoğlu, A., Güneş, E., Yoseda, K., Sakamoto, F., Nezaki, G. ve Hara, S., 2002. Karadeniz’de kalkan balığı (*Psetta maxima*) yavru üretim tekniği. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enst. ve JICA. Trabzon. 82 s.
- Devauchelle, N., Alexandre, J.C., Le Corre, N., ve Letty, Y., 1988. Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*), in captivity, Aquaculture, 69, 159-184.
- Dillon, J.C., 1988. Production of Triploid Rainbow Trout For Evaluation in South Dakota Waters, Doktora Tezi, South Dakota State University, South Dakota
- F.A.O., 2007. The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, 162 s.
- Froese, R., ve Pauly, D. 2007. Fish base. www.fishbase.org
- Hara, S., Güneş, E. ve Özongun, M., 1998. Spawning of the Black Sea turbot *Psetta maenotica* (Pallas), with special reference to egg development, Oral presentation with English abstract. The First International Symposium on Fisheries and Ecology, Karadeniz Tech. Univ. Trabzon.
- Hara, S., 2002 . Present status of fish culture development project in the Black Sea under JICA program, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2, 1-3.
- Hara, S., Özongun, M., Güneş, E., Ceylan, B., 2002. Broodstock rearing and spawning of Black Sea Turbot, *Psetta maxima*, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2, 9-12.

- Genç, Y., Zengin, M., Bahar, S., Tabak, İ., Ceylan, B., Çiftçi, Y., Üstündağ, C., Akbulut, B. ve Şahin, T., 1998, Ekonomik deniz ürünleri araştırma projesi, Sonuç raporu, No: TAGEM/ IY/96/17/3/001, 007 Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü.
- Gisbert, E., Williot, P., ve Castello-Orvay, F., 2000. Influence of egg size on growth and survival of early stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under small scale hatchery conditions. Aquaculture, 183, 83-94.
- Gjedrem, T., 1985. Improvement of productivity through breeding schemes. Geo Journal 10: 233–241.
- Gjedrem, T., 2005, Selection and breeding programs in aquaculture, Springer, Hollanda, 364 s.
- Imslund, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M., FitzGerald, R., Bonga, S.W., van Ham, E., Nævdal, G., ve Stefansson, S.O., 2001. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 198, 353– 367.
- Ivanov, L., Beverton, R.J.H., 1985. The fisheries resources of the Mediterranean , Part 2, Black Sea Etud. Rev., CGPM, 135 s.
- Jónsson, B. ve Svavarsson, E., 2000. Connection between egg size and early mortality in arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Aquaculture, 187, 315–317.
- Kjørsvik, E.A., Mangorjensen, A., ve Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. Advances in Marine Biology, 26, 71-113.
- Kjørsvik, E., Hoehne-Reitan, K. ve Reitan, K.I., 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measure for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.), Aquaculture, 227 9-20.
- Knutsen, G.M., Tilseth, S., 1985. Growth, development, and feeding success of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* related to egg size. Transactions of the American Fisheries Society 114, 507– 511.
- Lahnsteiner, F., ve Patarnello, P., 2004. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters, Aquaculture, 237 443-459.
- Liewes, E.W., 1984. Culture, Feeding and Diseases of Commercial Flatfish Species, A. A. Balkema, Rotterdam, Nederlands, 104 s.

- Linhart, O., Flajšhans, M. ve Kvasnica, P., 1991. Induced triploidy in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): a Comparison of two methods, Aquatic Living Resources, 4, 139-145.
- Liu, W., Heasman, M. ve Simpson, R., 2004. Optimization of triploidy induction in the blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach, 1814), using 6-dimethylaminopurine Aquaculture Research, 35, 1076-1085.
- Loopstra, D.P. ve Hansen, P.A., 2006. Triploidy induction in arctic char *Salvelinus alpinus* using heat shocking and pressure shocking techniques, Fisheries data report No.06-19, Alaska Department of Fish, Research and Technical Services, Alaska
- Ma, A. J., Chen, S. Q. ve Lei, J. L., 2006. Turbot *Scophthalmus maximus*: stocking density on growth, pigmentation and feed conversion, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 24, 307-312.
- Mallia, J.V., Muthiah, P., ve Thomas, P. C., 2006. Growth of triploid oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston), Aquaculture Research, 37, 718-724.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F. ve Patzner, R.A., 2007. Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*, Aquaculture, Article in press.
- Maslova, O.N., 2002. Problems and achievements in seed production of the Black Sea turbot in Russia, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2, 23-27.
- McEvoy, L.A., 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. Journal of Fish Biology, 24, 437-448.
- Moteki, M., Yoseda, K., Şahin, T., Üstündağ, C. ve Kohno, H. 2001. Transition from endogenous to exogenous nutritional sources in larval Black Sea turbot *Psetta maxima*. Fisheries Sciencs, 67, 571-578.
- Mori, T., Saito, S., Kishioka, C. ve Arai, K., 2004. Introduction of triploids and gynogenetic diploids in barfin flounder *Verasper moseri*, Nippon Suisan Gakkaishi, 70, 145-151.
- Mori, T., Saito, S., Kishioka, C. ve Arai, K., 2006. Aquaculture performance of triploid barfin flounder *Verasper moseri*, Fisheries Sciencs, 72, 270-277.
- Mugnier, C., 2001. Induction and synchronization of spawning in cultivated turbot *Scophthalmus maximus* L. broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pelet, Aquaculture, 181, 241-255.
- Munroe, T.A., 2005. Systematic diversity of the pleuronectiformes in: Flatfishes biology and exploitation, Gibson, R.N., Blackwell Science, UK, 391 s.

- Nasır, N.A. ve Poxton, M.G., 2001, Substratum preferences of juvenile flat fish, Cybiun, 25, 2, 109-117.
- Nielsen, J.G., 1986. Scophthalmidae. In: Whitehead PJP, Bauchot M-L, Hureau J-C, Nielsen J, Tortonese E (eds). Fishes of the North-Eastern Atlantic and Mediterranean, Vol. III. UNESCO, Paris, 1287–1293.
- Okumuş, İ., 2003. Damızlık stok yönetimi-III: Döl alımı, SÜMAE Yunus Araştırma Bülteni, 3, 5-7.
- Özden, O., Güner, Y. ve Kızak, V., 2003. Tatlı su balık kültüründe uygulanan bazı biyoteknolojik yöntemler, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 20, 563-574.
- Öztürk, Ş., 1998. Diploid ve triploid gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* (W.,1792)'in erken hayat evresinin karşılaştırılması, Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 36 s.
- Person-Le Ruyet, J., 2002 Turbot (*Scophthalmus maximus*) grow-out in Europe: Practices, results and prospects. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2, 29-39.
- Peruzzi, S. ve 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 (1-2), 23-37.
- Pickova, J., Dutta, P.C., Larsson, P.O. ve Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 54, 2410–2416.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Álvarez-Blázquez, B., Sánchez, L. ve Martínez, P., 2000. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Ploidy determination and the effects of cold shocks. Aquaculture 188, 79–90.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gómez, C., Bouza, B. ve Martínez, P., 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*): II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. Aquaculture 220, 821– 831.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C. ve Colombo, L., 2006. I. Performance improvements by polyploidization in aquaculture. In: “Performance improvements by polyploidisation, gene transfer and DNA vaccination in aquaculture”. Colombo, L., Crosetti, D. and Svaasand T. (eds). GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network. WP1 workshop “Genetics of domestication, breeding and enhancement of performance of fish and shellfish”, Viterbo, Italy, 12-17th June.

- Pillay, T.V.R., 1995. Aquaculture principles and practices, Fishing new books, London, 575 s.
- Rani, M.S., 2005. Prediction of larval viability based on egg quality parameters and early cleavage patterns in the experiments of triploidy induction in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., Master thesis, Department of Aquatic Biosciences Norwegian College of Fishery Science University of Tromsø Norway, Karvik, 52 s.
- Rasmussen, R. S. ve Morrissey, M. T., 2007. Biotechnology in aquaculture, Transgenics and polyploidy comprehensive food science and food safety, 6, 1-15.
- Reddy, P.V.G.K., Kowtal, G.V., ve Tantia, M.S., 1990. Preliminary observations on induced polyploidy in Indian major carps, *Labeo rohita* H. and *Catla catla* H. Aquaculture, 87, 215-228.
- Rideout, R.M., Trippel, E.A. ve Litvak, M.K., 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage pattern. Aquaculture, 230, 215-228.
- Sellars, M.J., Degnan, B.M. ve Preston, N.P., 2006. Production of triploid Kuruma shrimp, *Marsupenaeus (Penaeus) japonicus* (Bate) nauplii through inhibition of polar body I, or polar body I and II extrusion using 6-dimethylaminopurine, Aquaculture 256, 337-345.
- Shepherd, J. ve Bromage, N., 1988. Intensive fish farming, IN: C. Jonathan, BSP Professional Boks, London, 404 s.
- Shields, R. S., Brown, N.P. ve Bromage, N.R., 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability, Aquaculture, 155, 1-12.
- Slastenenko, E., 1956. Karadeniz havzası balıkları, Rusça'dan çeviren; Altan, H.E., E.B.K. Umum Müdürlüğü, İstanbul, 711 s.
- Şahin, T., 2001. Larval Rearing of the Black Sea Turbot, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), under Laboratory Conditions, Turkish Journal of Zooloji, 25, 447 - 452
- URL-1, www.feap.info/production/species/flatfish/flatfishprod_en.asp, Flat fish production in europa, Aquamedia, 11 Aralık 2007
- URL2, www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?ds=Aquaculture&k1=SPECIES&k1v=1&k1s=2563&outtype=html, Cultured Aquatic Species Information Programme, *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758), 10 Aralık 2007
- URL-3, www.globefish.org/index.php?id=281, Globefish european price report, 02.Şubat 2007

- Ünlü, A., 2004, Sıcak ve soğuk şok yöntemiyle elde edilen triploid gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum,1792) bazı anatomik ve histolojik gelişim bozukluklarının tespiti üzerine bir çalışma, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 59 s.
- Trippel, E.A., Castell, J.D., Neil, S.R.E., Blair, T.J., 2000. Assessment of egg quality of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in paired matings. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Institute of Marine Research and University of Bergen, Norway, 405–407.
- Troup, A.J., Cairns, S.C. ve Simpson R.D., 2005. Growth and mortality of sibling triploid and diploid Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould), in the Camden Haven River Aquaculture Research, 36, 1093-1103.
- T.Ü.İ.K., 2007. Su ürünleri istatistikleri, Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara, 67 s.
- Vallin, L., ve Nissling, A., 1998. Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs- result from an experimental study, Fisheries Research, 38, 247-255.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis fourth eds., a viacom company, New Jersey, Prentice-Hall Inc. 0-13-082390-2, 870 s.
- Zhao, Y., Chen, Y., ve Brown, J.A., 2001. Impacts of egg and larval size on survival and growth of Atlantic cod under different feeding conditions, Journal of Fish Biology, 59, 569-581

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1993 yılında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesinden mezun oldu. 1994–1995 yıllarında kısa dönem askerlik hizmetini yerine getirdi. 1997–1998 yıllarında Konya'da öğretmenlik yaptı. 1998–1999 yıllarında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğünde mühendis olarak çalıştı. Ekim 1999'da Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünde mühendis olarak göreve başladı. Haziran 2004 – Kasım 2004 arasında Japonya'da "Marine Farming for Stock Enhancement" isimli kursa katıldı. Eylül 2005'te Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans" eğitimine başladı.

Halen Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünde, çeşitli projelerde araştırmacı olarak görev yapmaktadır. İngilizce bilmektedir.