

Van Gölüne Endemik Olan İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi* PALLAS 1811) Kromozomlarının C, G ve Restriksiyon Endonükleazlar (*Alu I*, *Nhe I*, *Hae III*, *Mbo I*, *Hinf I*) ile Bantlanması*

Süleyman GÜL

Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas - TÜRKİYE

Ahmet ÇOLAK, İlhan SEZGİN

Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Sivas - TÜRKİYE

Bertal KALOĞLU

Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.04.2002

Özet: Sazangiller familyasına ait *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozomlarının sayısı ve yapıları incelenerek karyotipleri yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan balıklar Van Gölü'nden ağlarla yakalanarak laboratuvara getirilmiştir. Balıkların karın boşluğuna gramlarına 0,01 ml gelecek şekilde % 0,6'lık kolsişin enjekte edilmiştir. Metafaz incelemeleri sonucunda *C. tarichi*'nin $2n = 50$ kromozoma sahip olduğu belirlenmiştir. Karyotiplerinin ise 8 metasentrik, 5 submetasentrik ve 12 akrosentrik kromozom çiftlerinden oluştuğu saptanmıştır. Bu türde cinsiyetle bağlantılı herhangi bir kromozom tespit edilememiştir.

C. tarichi kromozomları beş restriksiyon endonükleazla muamele edilmiş, Giemsa ile boyanmış ve bant örnekleri incelenmiştir. *Alu I* enzimi baryum hidroksit etkileşimi ile ortaya çıkan C-banda benzer bant örnekleri üretmiştir. *Hae III*, *Hinf I*, *Nhe I* ve *Mbo I* enzimleri ise G-banda benzer bant örnekleri üretmiştir. Restriksiyon endonükleazlar Giemsa ile boyanma oranını belirgin bir şekilde düşürmüştür.

Anahtar Sözcükler: Sazangiller, inci kefali, karyotip, restriksiyon enzimleri.

C, G and Restriction Endonuclease (*Alu I*, *Nhe I*, *Hae III*, *Mbo I*, *Hinf I*) Banding of the Chromosomes in *Chalcalburnus tarichi* (PALLAS 1811) Endemic to Lake Van

Abstract: Karyotype analysis was performed in *Chalcalburnus tarichi* specimens by investigating the number and structures of their chromosomes. The fish used in this study were caught with fishing nets from Lake Van and taken to the laboratory. The fish were injected i.p. with 0.01 ml/g body weight doses of a 0.6% solution of a colchicine for 190 min. As a result of the metaphase investigation we determined that *C. tarichi* had $2n = 50$ chromosomes. Their karyotypes were determined to be composed of 8 metacentric, 5 submetacentric and 12 acrocentric chromosome pairs. We were unable to identify any sex-related chromosomes in this species.

C. tarichi chromosomes were treated with 5 restriction endonucleases stained with Giemsa and examined for banding patterns. The enzymes *Alu I* revealed banding patterns similar to the C-bands produced by treatment with barium hydroxide. The enzymes *Hae III*, *Hinf I*, *Nhe I* and *Mbo I* revealed banding patterns similar to those of G-bands. The restriction endonucleases markedly reduced the extent of Giemsa staining.

Key Words: Cyprinidae, *Chalcalburnus tarichi*, karyotype, restriction endonucleases

Giriş

Dünyada 20.000 civarında balık türü yaşamaktadır ve bunlardan yaklaşık 3000 tanesinin kromozom sayısı belirlenmiş ve karyotipleri yapılmıştır (1). Karyotip çalışmaları tür seçiminde, verimli tür üretiminin

yönlendirilmesinde ve sitotoksik kimyasalların izlenebilmesinde önemli katkılar sağlayacaktır (1).

Sazangiller (Cyprinidae) familyası türleri Asya, Avrupa ve Afrika'da geniş yayılış gösteren yaklaşık 1500 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye'de de tatlı su balıklarının

* Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından F-87 no'lu proje ile desteklenmiştir.

büyük bir kısmı bu familyaya dahil olup yaklaşık 30 cins ve 70 türü yaşamaktadır (2).

Balık kromozomlarının sayısı ve morfolojileri üzerine yapılan çalışmaların hibritleme (melez), sınıflandırma ve evrim araştırmalarına yararlı olduğu belirlenmiştir (3-8).

Kromozomların yapı ve tiplerinin belirlenmesinin yanı sıra restriksiyon enzimlerinin uygulanışı temel genetik bilgilere de katkıda bulunmaktadır (9). Hücre bölünmesinin detaylarının anlaşılmasında kromozomların heterokromatin ve ökromatin içeriğinin belirlenmesi önemli bir süreçtir. Hücre bölünmesinde herhangi bir bozukluk kansere giden bir oluşumu başlatabilmektedir (1). Restriksiyon enzimleri belirli DNA dizilerini keserek kromozomlarda bant oluşturabilmektedir. Örneğin *Alu I* enzimi *Anthrobacter luteus* adlı bakteriden elde edilmektedir ve bakteri bu enzimi virüslere özellikle bakteriofajlara karşı bir savunma mekanizması olarak kullanmaktadır. *Alu I* enzimi kromozomlarda satellit DNA bölgelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Satellit DNA sentromerlerde ve heterokromatinin yapısında bulunmaktadır (10-12).

Bu çalışma ile Van Gölü'ne endemik olan İnci kefalı *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozom sayısı ve tiplerinin belirlenmesi, bu kromozomların restriksiyon enzimleri ile verdikleri bant tiplerinin saptanması ve adı geçen türün diğer akraba türlerle kromozomal açıdan karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada kullanılan İnci Kefali *C. tarichi*, Bitlis ilinin Tatvan ilçesinde Van Gölü'nden tutulmuştur. Balıklar tutulurken zedelenmelerine izin vermemek için çevirme ağ kullanılmıştır. Deneyler için toplam beş kez Van Gölüne gidilmiştir. Her seferinde yaklaşık elli balık incelenmiştir. Cinsiyet ayırımı gonad analizi ile yapılmıştır. Balıklardan kromozom elde edilebilmesi için canlı olmaları gerektiğinden 70 lt'lik üç adet bidona alınmış, bidonlara göl suyu konulmuş ve oksijen bağlanmıştır. Balıkların boylarının 20 cm ile 10 cm arasında, ağırlıklarının ise 100 ile 200 g arasında değiştiği gözlenmiştir.

Kromozom preparasyonları için Al-Sabti (1)'nin yöntemi uygulanmıştır. Balıkların karın boşluklarına % 0,6'lık kolsişin solusyonu, 0,01 ml/1 g vücut ağırlığı dozunda enjekte edilmiştir. Metafaz incelemeleri için solungaç epitel hücreleri kullanılmıştır. Preparatlar daha

sonra pH'sı 6,8 olan Giemsa boyası ile boyanmış ve mikroskopta 100'lük objektifle incelenmiştir. Uygun metafazların resimleri çekilmiştir (1,13).

Daha önce tanımlanan yöntemle elde edilen kromozomları içeren preparatlardan boyanmamış olanlar alınmış % 95'lik etanolden geçirilmiştir (9,14-16). Yaklaşık 60 ünite enzim alınmış (*Alu I*, *Nhe I*, *Hae III*, *Mbo I*, *Hinf I*) 60 µl tamponla dikkatlice karıştırılmış ve preparatın üzerine konulmuştur. Tampon 10X konsantrasyonda olduğu için 6 mikrolitre tampon 54 µl distile su ile karıştırılmıştır. Bu işlemle enzim tampon karışımının 0,5 ünite/mikrolitre olması sağlanmıştır. Preparatın diğer bir kısmına ise kontrol amacı ile yalnız tampon konulmuştur. Bu enzim tampon karışımının ve kontrol bölümünün üzeri 22 x 22 mm lamellerle kapatılmıştır. Bir petri kutusuna kurutma kağıdı konulmuş ve bu kağıda su konularak nemli bir ortam oluşturulmuştur. Daha önce hazırlanmış olan preparat bu ortama konularak 37 °C'de 3-6 saat bekletilmiştir. Reaksiyonu sona erdirmek için preparat yıkanmış ve % 4'lük Giemsa ile boyanmıştır. Daha sonra 100'lük objektifle incelenip fotoğrafı çekilmiştir (9,17). Tüm bu işlemlerde Nikon Optiphot-2 mikroskobu kullanılmıştır.

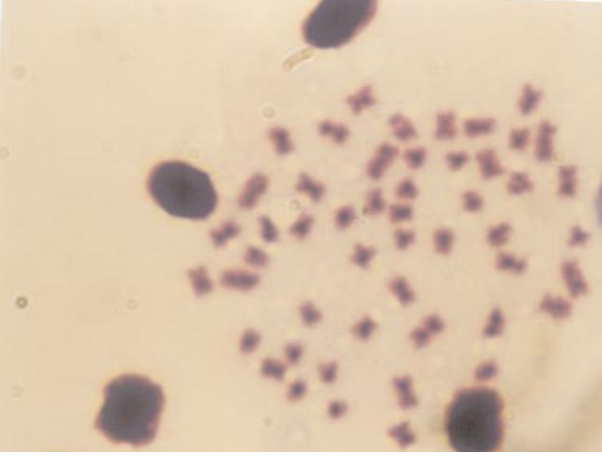
Bulgular

Balıkların solungaç epitel hücrelerinden toplam 53 adet metafaz elde edilmiştir. Bu metafazlardan 42 adedinin $2n = 50$ (Şekil 1-8), 6 adedinin $2n = 52$ ve 5 adedinin $2n = 48$ kromozoma sahip olduğu belirlenmiştir.

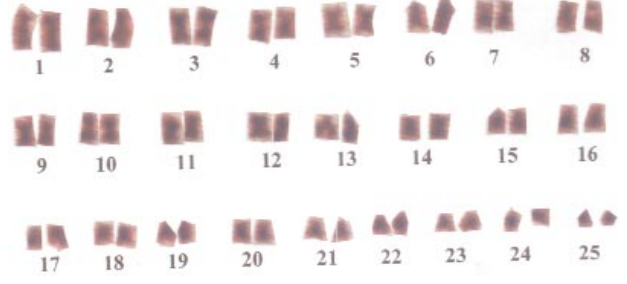
Metafaz örneklerinin ve karyotipin incelenmesi sonucu diğer Cyprinidae türlerine benzer şekilde cinsiyet kromozomlarının diğer kromozomlardan belirgin farklar taşımadığı görülmektedir. Sentromerlerin kromozomlardaki lokalizasyonları göz önüne alınarak yapılan inceleme sonucu, kromozomların 8'inin metasentrik, 5'inin submetasentrik, 12'sinin ise akrosentrik olduğu belirlenmiştir (Şekil 1,2).

C bant (Şekil 3) ve G bant (Şekil 4) incelemeleri sonucunda da cinsiyet kromozomları ayırt edilememiştir. C bant incelemeleri sonucu sentromerin belirgin bir şekilde boya aldığı belirlenmiştir (Şekil 3).

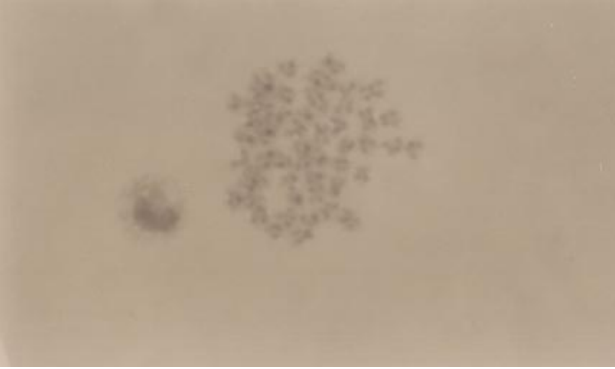
Yapılan incelemelerde *Hae III* (Şekil 5) enziminin belirgin G bant örnekleri verdiği saptanmıştır. *Alu I* enziminin C bant verdiği belirlenmiştir (Şekil 6). Burada en önemli bulgulardan birisi de C bant benzeri yapıların



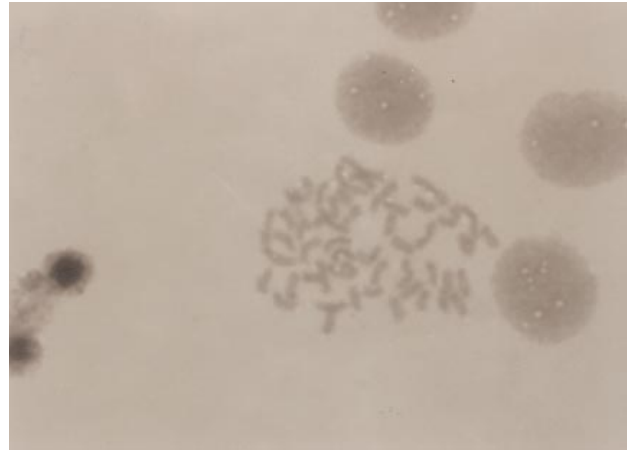
Şekil 1. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin, $2n = 50$ olarak saptanan metafaz evresindeki kromozomları görülmektedir (1000x).



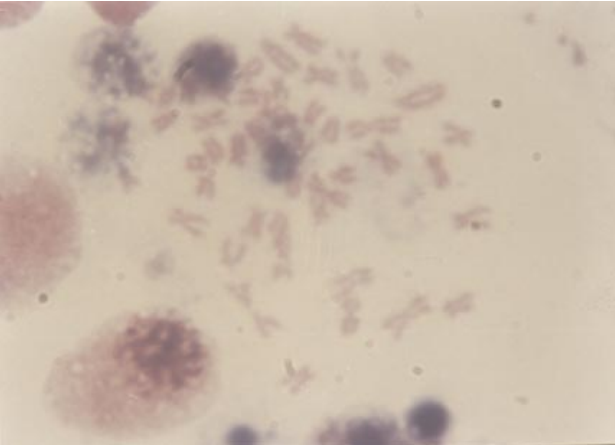
Şekil 2. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin karyotipi (1000x).



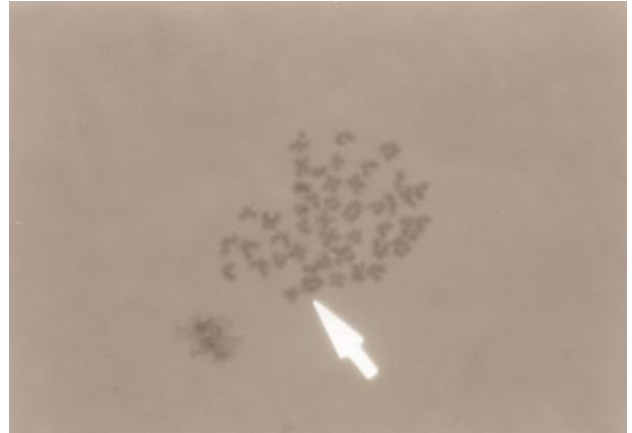
Şekil 3. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi* kromozomlarında C bant örnekleri (1000x).



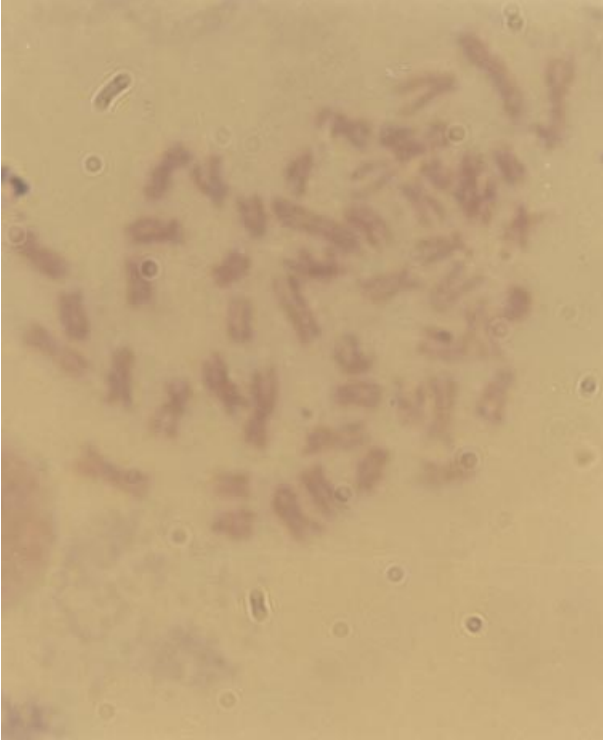
Şekil 4. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi* kromozomlarında G bant örnekleri (1000x).



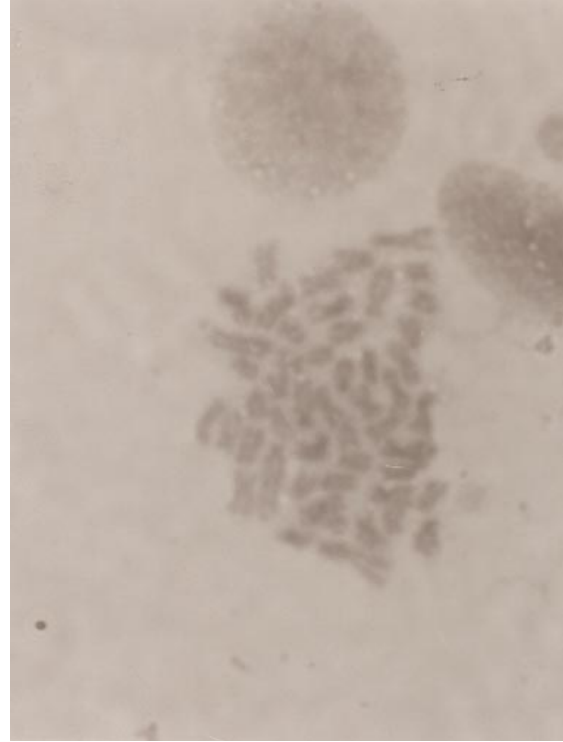
Şekil 5. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozomlarına RE *Hae III*'ün etkisi (1000x).



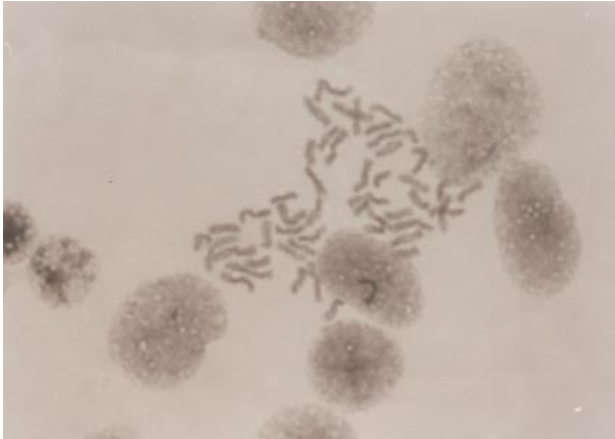
Şekil 6. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozomlarına RE *Alu I*'in etkisi. Okla gösterilen bölge sentromer dışında satelit DNA bölgesidir. (1000x).



Şekil 7a. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozomlarına RE *Hinf I*'in etkisi (1000x).



Şekil 7b. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozomlarına RE *Mbo I*'in etkisi (1000x).



Şekil 8. İnci Kefali, *Chalcalburnus tarichi*'nin kromozomlarına RE *Nhe I*'in etkisi (1000x).

büyük kromozomların kollarında da görülmesidir (Fotoğrafta okla gösterilmiştir). *Hinf I* (Şekil 7 a), *Mbo I* (Şekil 7 b) ve *Nhe I* (Şekil 8) enzimlerinin ise G bant ürettikleri görülmüştür. Tüm RE enzimlerinin ortak etkisi ise Giemsa boyası ile kromozomların boyanma oranlarını düşürmeleridir. RE enzimlerinin tamponlarının kontrol olarak kullanılmasında ise böyle bir sonuca erişilmemiştir.

Tartışma

İncelenen kaynaklara göre İnci Kefali balığının kromozom sayısı ve yapılarının halen belirlenmediği saptanmıştır (1). Cyprinidae familyası Asya, Avrupa ve Afrika'da geniş yayılış gösteren bir familyadır. Yaklaşık 1500 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye'de de tatlı su balıklarının büyük bir kısmı bu familyaya dahil olup, yaklaşık 30 cins ve 70 türü yaşamaktadır (2). Yapılan çalışmalar Cyprinidae familyasının yaklaşık $2n = 50$ kromozoma sahip olduklarını göstermiştir (1,18-20).

Balıkların solungaç epitel hücrelerinden toplam 53 adet metafaz elde edilmiştir. Bu metafazlardan 42 adedinin $2n = 50$ adet (Şekil 1-8), 6 adedinin $2n = 52$ ve 5 adedinin $2n = 48$ kromozoma sahip olduğu belirlenmiştir. Hücrelerden $2n = 50$ kromozom sayısı normal değerdir. Bu sayı dışında elde edilen (48-52) kromozom sayısı büyük olasılıkla preparasyon sırasında komşu hücrelerden katılım ya da eksilme sonucu olabilir.

Bu çalışmada kullanılan kolsişin dozu, diğer canlılarda kullanılan dozlarla (1,12,21-26) ve lenfosit kültürü yöntemi (21) ile karşılaştırıldığında çok yüksek bir dozdur. Bu olayın sebebi, kolsişin'in hücrelere direkt ya da dolaylı olarak etki etmesine bağlanabilir.

Vitturi ve ark. (22), *Bothus podas*'da yaptıkları kromozom analizinde XX-XY cinsiyet kromozom modelini bulmuşlardır. Bu çalışma dışında diğer çalışmaların hiçbirisinde cinsiyet kromozomlarına ilişkin bir bilgi yoktur.

Yapılan bu çalışmada da eşey kromozomları belirlenememiştir. Her iki eşeyde de aynı sayı ve yapıda kromozom bulunmasına karşın, gen düzeyinde farklılıklar olması kaçınılmazdır. İleri sitogenetik ve biyokimyasal çalışmalar sonucu bu sorunun da çözüleceği ileri sürülebilir. Balık kromozomlarının elde edilmesinde karşılaşılan diğer bir güçlükde kaliteli metafazların elde edilememesidir (1,13,18,23,24). Evrimsel olarak yeni türlerin oluşmasında görev alan süreçlerin anlaşılmasında da kromozomal yapıların bilinmesi önemli bir süreçtir.

Örneğin gökkuşuğu alabalıkları üzerine çalışan araştırmacılar popülasyondaki evrimsel değişimin translokasyonlarla gerçekleştiğini belirlemişlerdir (9).

Goodier ve Davidson (25), alabalık türlerinde genomun tekrarlanan dizileri üzerine çalışmışlar ve alabalıkların evriminde duplikasyon olayının önemli bir süreç olduğunu saptamışlardır. Kaelbling ve ark. (26), fare kromozomları üzerine *Alu I*, *Hinf I*, *Mbo I*, *Eco RII* ve *Hae III* enzimlerinin etkilerini araştırmışlardır. *Alu I*, *Hinf I* ve *Mbo I* enzimlerinin C bant benzeri yapılar ürettikleri, *Eco RII* ve *Hae III*'ün ise G bant ortaya çıkardığını saptamışlardır. Bu çalışmada da *Alu I*, *Hinf I*, *Mbo I*, *Nhe I* ve *Hae III* enzimleri kullanılmış ve C ve G bant yapısı ortaya çıkardıkları saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Al-Sabti, K.: Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes. Ljubljana, 1991; 97.
2. Kence, A., Bilgin, C.: Türkiye Omurgalılar Tür Listesi. Nuru Matbaacılık. Ankara 1996; 119.
3. Nishikawa, S., Amaoka, K., Karasawa, T.: On the Chromosomes of Two Species of Eels (*Anguilla*) Chrom Inf Serv. No.12, Shiminoseki University of Fisheries, Shiminoseki. 1971; 27-28.
4. Nishikawa, S., Amaoka, K., Karasawa, T.: A preliminary study on the chromosomes of *Cichlasoma citrinella* (Cichlidae; Pisces), Chrom Inf Serv. No.14 Shiminoseki University of Fisheries, Shiminoseki 1973; 32-33.
5. Yamazaki, F.: A chromosome study of the Ayu, a salmonoid fish. Nippon Suisan Gakk. 1971; 73: 707-710.
6. Jankun, M., Rab, P., Vuorinen, J.: A karyotype study of vendace, *Coregonus albuta* (Pisces, Coregoninae). Hereditas. 1991; 115: 291-294.
7. Baker, C.J.: A method for display of chromosomes of plaice *Pleuronectes platessa* and other marine fishes. Copeia. 1972; 2: 365-368.
8. Çolak, A., Sezgin, İ., Süngü, S.: Sazangiller (Cyprinidae) Familyasına Ait Beni Balığı'nda *Cyprinion macrostomum* (Heckel, 1843) Kromozomal Araştırmalar. Doğa Bilim Dergisi A2. 1985; 9: 193-195.
9. Lloyd, M.A., Thorgaard, G.H.: Restriction endonuclease banding of rainbow trout chromosomes. Chromosoma. 1988; 96: 171-177.
10. Wong, A.K.C., Rattner, J.B.: Sequence organisation and cytological localisation of the minor satellite of mouse. Nucleic Acids Res. 1988; 16: 11645-11661.
11. Cooper, D.N.: Eukaryotic DNA methylation. Hum. Genet. 1983; 64: 315-333.
12. Ekmekçi, A., Menevşe, S., Menevşe, A.: Fare kemik iliği hücrelerinde difenilhidantoin'in indüklediği sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve bunlar üzerine eksojen prostaglandin E1'in azaltıcı etkisi. Doğa. Tr.J. of Medical Sciences. 1990; 14: 177-184.
13. Amemiya, C.T., Gold, J.R.: Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). Hereditas. 1990; 112: 231-237.
14. Bron, S., Murray, K.: Restriction and modification in *Bacillus subtilis*. Mol. Genet. 1975; 143: 25.
15. Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K.: A new specific endonuclease from *Anthrobacter luteus*. J. Mol. Biol. 1976; 102: 157-165.
16. Gelinis, R.E., Myers, P.A., Roberts, R.J.: Two sequence-specific endonucleases from *Morexella bovis*. J. Mol. Biol. 1977; 114: 169.
17. Hartley, S.E.: C, Q and restriction enzyme banding of the chromosomes in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Hereditas. 1991; 114: 253-261.
18. Oellerman, L.K., Skel-ton, P.H.: Hexaploidy in yellowfish species. (Barbus, Pisces, Cyprinidae) from southern Africa. J. Fish Biol. 1990; 37: 105-115.
19. Gül, S., Çolak, A., Sezgin, İ.: Siraz Balığı *Capoeta capoeta umbla* (Güldenstadt,1773)'da sitogenetik incelemeler. C.Ü. Fen Bilim. Derg. 1998; 20: 19-25.
20. Gül, S., Çolak, A., Sezgin, İ.: Gümüş Balığı'nda (*Chalcalburnus mossulensis* Heckel,1843) Karyotip Analizi. Turk. J. Biol. 2000; 24: 657-662.
21. Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H.: Human Cytogenetics, a Practical Approach. IRL Press. Oxford. England, 1986: 136.
22. Vitturi, R., Catalano, E., Colomera, D.: Chromosome analysis of *Bothus podas* (Pisces, Pleuronectiformes) from the Mediterranean Sea. J. Fish Biol. 1993; 43: 221-227.

23. Bolla, S.: Cytogenetic studies in Atlantic salmon and rainbow trout embryos. *Herditas*. 1987; 106: 11-17.
24. Cestari, M.M., Pedro, M., Galetti, J.: Chromosome studies of *Serrasalmus spiloleura* (Characidae, Serrasalminidae) from the Parana-Paraguay rivers: Evolutionary and Cytotaxonomic considerations. *Copeia*. 1992; 1: 108-112.
25. Goodier, J.L., Davidson, W.S.: Characterization of a repetitive element detected by *Nhe I* in the genomes of Salmo species. *Genome*. 1994; 37: 639-645.
26. Kaelbling, M., Miller, A.D., Miller, J.O.: Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes. *Chromosoma*. 1984; 9: 128-132.