



**İSKENDERUN TEKNİK**  
ÜNİVERSİTESİ

**YÜKSEK  
LİSANS  
TEZİ**

**KONTROLLÜ LABORATUVAR  
KOŞULLARINDA ZEBRA BALIĞI  
(*Danio rerio*, HAMILTON 1822)  
YAPAY ÜRETİMİ ve CİNSİYET  
ORANI**

**Kemal DEDE**

**SU ÜRÜNLERİ  
ANABİLİM DALI**

**OCAK 2020**



**KONTROLLÜ LABORATUVAR KOŞULLARINDA ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, HAMILTON 1822) YAPAY ÜRETİMİ VE CİNSİYET ORANI**

**Kemal DEDE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2020**

Kemal DEDE tarafından hazırlanan “KONTROLLÜ LABORATUVAR KOŞULLARINDA ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*, HAMILTON 1822) YAPAY ÜRETİMİ VE CİNSİYET ORANI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile İskenderun Teknik Üniversitesi Su Ürünleri Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Şehriban ÇEK YALNIZ

Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, İskenderun Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. ....

.....

**Başkan:** Prof. Dr. Şehriban ÇEK YALNIZ

Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, İskenderun Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. ....

.....

**Üye:** Prof. Dr. Mahmut Ali GÖKÇE

Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. ....

.....

**Üye:** Prof. Dr. Yasemin BİRCAN YILDIRIM

Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, İskenderun Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum. ....

.....

Tez Savunma Tarihi: 28.01.2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Tolga DEPCİ

Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

İskenderun Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu,
  - Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
  - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirim, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Kemal DEDE

28/01/2020

KONTROLLÜ LABORATUVAR KOŞULLARINDA ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*,  
HAMILTON 1822) YAPAY ÜRETİMİ VE CİNSİYET ORANI  
(Yüksek Lisans Tezi)

Kemal DEDE

İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2020

ÖZET

Zebra balıkları model organizma olarak, insan genlerini ve hastalıklarını incelemek amacıyla biyomedikal araştırmalarda yaygın kullanılmaktadırlar. Buna rağmen, zebra balığının yapay üretimi zayıf bir şekilde tanımlanmıştır ve evrensel olarak kabul edilen herhangi bir yapay kültür protokolü yoktur. Biyomedikal alanda çalışan bilim insanlarını tatmin etmek için kontrollü laboratuvar koşullarında standart bir zebra balığı kültür yöntemi geliştirilmelidir. Bu tez ile laboratuvar koşullarında zebra balığının yapay kültürü araştırılmıştır. Ek olarak embriyogenez, yumurta çapı ve cinsiyet oranı, incelenmiştir. Çalışmada, erkek ve dişiler için ortalama vücut uzunlukları sırasıyla  $3,34 \pm 0,40$ ;  $2,97 \pm 0,3$  cm ve ortalama ağırlıklar sırasıyla  $0,38 \pm 0,14$ ;  $0,25 \pm 0,27$ g olarak ölçülmüştür. Yumurtlama kapları ve çakıllar anaçların yumurtlatılması için kullanılmamıştır. Hem erkek hem de dişiler için olgunlaşma aşaması, kuluçkadan 90 gün sonra saptanmıştır. Abdomenleri şişmiş olan erkek ve dişi anaçlar önceden ürettiğimiz stoklardan seçilmiştir. Önce ovaryumlara yapılan baskı ile yumurtalar, sonra erkeklerden süt yumurtalar üzerine alınmıştır. Döllenme kuru yöntemle ile yapay olarak yapılmıştır. Yumurtalar  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 4- 5 günde açılmıştır. Ortalama yumurta çapları ve yumurta verimliliği ölçülmüştür. Embriyogenez başlıca yedi aşamada tanımlanmıştır; zigot, bölünme, blastula, gastrula, segmentasyon, fargula ve çıkış aşamalarıdır. Örneklenen 163 balığın cinsiyet oranı 109: 54 (erkek: dişi) idi ve bu fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Buna ilaveten, Dişilerin canlı ortalama ağırlıkları erkeklerinkinden daha yüksek ( $p > 0,05$ ) olarak kaydedilmiştir. Bu çalışma sonuçları, cinsiyet oranının erkekler lehine olduğunu ve doğru yapay kültür koşulları ve uygun el ile sağım yönteminde biyomedikal araştırma için gerekli yumurta ve embriyoların kolayca elde edilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Sağım, Embriyogenez, Yumurta çapı, Cinsiyet oranı, Biyomedikal çalışmalar

Sayfa Adedi : 43

Danışman : Prof. Dr. Şehriban ÇEK YALNIZ

ARTIFICIAL ZEBRAFISH (*Danio rerio*, HAMILTON 1822) BREEDING AND SEX RATIO  
UNDER CONTROLLED LABORATORY CONDITION  
(M.Sc. Thesis)

Kemal DEDE

ISKENDERUN TECHNICAL UNIVERSITY  
ENGINEERING AND SCIENCE INSTITUTE

January 2020

ABSTRACT

Zebrafish are considered as model organism and widely used in biomedical research to study human genes and human diseases. Despite this, the artificial reproduction of zebrafish is poorly described and there is not any standard universally accepted artificial culture protocol. In order to satisfy the scientist working in biomedical area, a standard culture method of zebrafish under controlled laboratory conditions must be developed. This thesis investigates artificial culture of zebrafish in the laboratory where culture conditions were maintained. In addition, embryogenesis, egg diameter, sex ratio were investigated. Mean body lengths for female and male were  $3.34\pm 0.40$ ;  $2.97\pm 0.3$ cm and the mean weights were  $0.38\pm 0.14$ ;  $0.25\pm 0.27$ g, respectively.

Spawn traps and gravels are not used for spawning of broodstock. The maturation stage for both male and females was detected at 90 days after hatching. Female and male broodstock were selected from our previously cultured stock, based on their swollen abdomens. First eggs were squeezed from the ovaries then milt was taken from the testes onto the eggs. Fertilization was done artificially by the dry method. The eggs hatched within 4-5 days at  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ . The mean diameter of eggs and fecundity were measured. Mainly seven developmental stages of embryogenesis were described; the zygote, cleavage, blastula, gastrula, segmentation, pharyngula and hatching stages. The sex ratio of the 163 sampled fish was 109:54 (male: female) and this difference was significant ( $p < 0.05$ ). Additionally, final live mean weight of the females was higher than that of the males ( $p > 0.05$ ). The results of the present study suggest that sex ratio was male biased and with the right artificial culture conditions and proper manual stripping, the required number of eggs and embryos for biomedical research can be easily obtained.

Keywords : Stripping, Embryogenesis, Egg diameter, Sex ratio, Biomedical studies

Page Number : 43

Supervisor : Prof. Dr. Şehriban ÇEK YALNIZ

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, lisansüstü öğrenimime başladığım ilk günden itibaren hem mesleğe hem de hayata yaklaşımıyla bana örnek olan, bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan, tez çalışmamın tüm aşamalarında, büyük titizlik, sabır ve özveri ile bana destek veren, akademik görevlerine ve yükümlülüklerine rağmen bana desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, insani ve ahlaki değerleri ile de kendime örnek edindiğim, beraber çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam, Prof. Dr. Şehriban ÇEK YALNIZ'a; tez çalışmamda yardımını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Yavuz MAZLUM'a derin saygı ve minnettarlığımı iletmek isterim.

Denemeler sırasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Yüksek Su Ürünleri Müh. Kamuran Umut YARAŞ' a; beni her zaman destekleyen eşim Selda DEDE'ye ve çocuklarım Mehmet Serkan ve Mustafa Serdar DEDE' ye en önemlisi beni büyüten ve bu aşamaya getiren annem Emine DEDE, babam Genççağa DEDE'ye en içten teşekkürlerimi bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	vii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Üreme Biyolojisi .....	4
2.2. Cinsiyet Oranı.....	6
2.3. Embriyonik Gelişimi.....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Zebra Balığı'nın ( <i>Danio rerio</i> ) sistematikteki yeri ve dağılımı.....	10
3.1.2. Deneme yeri .....	10
3.1.3. Deneme akvaryumları ve suyun özellikleri .....	10
3.1.4. Deney balıkları .....	11
3.1.5. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar.....	12
3.1.6. Balık yemleri.....	13
3.2. Yöntem .....	14
3.2.1. Dişi anaçlardan yumurta elde edilmesi .....	14
3.2.2. Erkek anaçlardan sperm elde edilmesi.....	16
3.2.3. Cinsiyet oranı .....	17



3.2.4. Döllenmiş yumurtaların bakımı ve çaplarının ölçümü .....	17
3.2.5. İstatistiksel analizler.....	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	19
4.1. Su Kalitesi Parametreleri.....	19
4.2. Yumurta Verimliliği ve Çapı .....	19
4.3. Cinsiyet Oranı.....	19
4.4. Yumurta Çapı ve Boy Ağırlık İlişkisi.....	21
4.5. Embriyogenez .....	21
5. TARTIŞMA .....	28
5.1. Su Kalitesi Parametreleri.....	28
5.2. Zebra balığının ( <i>D. rerio</i> ) Yumurta Verimliliği ve Çapı .....	29
5.3. Cinsiyet Oranı.....	30
5.4. Yumurta çapı ve boy ağırlık ilişkisi.....	31
5.5. <i>D. rerio</i> 'daki Embriyogenezin Evreleri .....	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	32
KAYNAKLAR .....	35
ÖZGEÇMİŞ .....	41
DİZİN.....	43

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalar sırasında su kalitesi parametreleri, ortalama $\pm$ sd.....	19
Çizelge 4.2. Farklı akvaryumlardaki zebra balıklarının ( <i>Danio rerio</i> ) cinsiyet dağılımı ve oranı (%). .....	20
Çizelge 4.3. <i>D. rerio</i> 'daki embriyogenezin $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de evreleri .....	22



## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1 <i>Danio rerio</i> ' nun erkek ve dişi arasındaki cinsiyet oran ilişkisi.....	20
Şekil 4.2. Dişi <i>Danio rerio</i> ' nun vücut ağırlığı ve yumurta çapı arasındaki ilişki.....	21



## RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Araştırmanın gerçekleştirildiği deney düzeneği .....	11
Resim 3.2. Anaç balıklarının bulunduğu akvaryum düzeneği (orijinal resim).....	12
Resim 3.3. Suyun ölçümünde kullanılan YSI Oksijenmetre (orijinal resim) .....	12
Resim 3.4. Yumurtaların ölçümünde kullanılan mikroskop (SEILERSCOPE SXS-820) (orijinal resim).....	13
Resim 3.5. <i>Artemia salina</i> (orijinal resim).....	13
Resim 3.6. 1/10µl kinaldin çözeltisi ile anestezi uygulaması .....	14
Resim 3.7. 1/10µl Kinaldin çözeltisi ile anestezi uygulaması (orijinal resim).....	15
Resim 3.8. Zebra balığında morfolojik olarak erkek ve dişi ayrımı; a, Erkek; b, Dişi (orijinal resim).....	15
Resim 3.9. Pipet yardımı ile dişi anaçtan alınmış yumurtalar .....	16
Resim 3.10. Erkek anaçlardan sperm alımında yararlanılan mikro pipet .....	17
Resim 3.11. Gelişmeleri takibe alınmış döllenmiş yumurtalar.....	18
Resim 4.1. Döllenmiş yumurtaların petri kabındaki görünümü (orijinal resim) .....	23
Resim 4.2. Döllenmiş yumurta hücresinin stereo mikroskop altındaki görüntüsü (5X Büyütme) (orijinal resim).....	23
Resim 4.3. Zigot aşamasındaki embriyo.Z, Zigot (5X Büyütme) (orijinal resim) .....	24
Resim 4.4. Cleavage evresindeki embriyo. K, Koryon; CS, Cleavage stage(5X Büyütme) (orijinal resim).....	24
Resim 4.5. Blastodisk evresindeki embriyo. K, Koryon; BD, Blastodisk (5X Büyütme) (orijinal resim).....	25
Resim 4.6. Gastrulasyon evresindeki embriyo. OL, Optik lens; BK, Besin kesesi; K, Kuyruk (5X Büyütme) (orijinal resim) .....	25
Resim 4.7. Segmentasyon evresinin başlangıcındaki embriyo. OL, Optik lens; OP, Otik pleakod; BK, Besin kesesi; N, Notokord (5X Büyütme)(orijinal resim).....	26
Resim 4.8. Segmentasyon evresinin son zamanlarında ki embriyo. G, Göz; BK, Besin kesesi; N, Notokord; K, Kuyruk (5X Büyütme) (orijinal resim) .....	26
Resim 4.9. Faringula aşamasında bulunan embriyo. M, Melonosit (5X Büyütme)(orijinal resim) .....	27
Resim 4.10. İnkubasyon sürecini tamamlamış zebra balığı ( <i>D. rerio</i> ) (5X Büyütme) (orijinal resim).....	27

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

%

°C

pH

NO<sub>3</sub>

C

CaCO<sub>3</sub>

### Açıklamalar

Yüzde

Santigrat derece

Asitlik Bazlık Dengesi

Nitrat

Karbon

Kalsiyum Karbonat

### Kısaltmalar

BD

BK

cm

CS

g

K

K

l

µm

µl

mg

mg/l

mm

ml

N

ng/l

OL

OP

ppm

### Açıklamalar

Blastodisk

Besin kesesi

Santimetre

Cleavage stage

Gram

Koryon

Kuyruk

Litre

Mikrometre

Mikrolitre

Miligram

Miligram/Litre

Milimetre

Mililitre

Notokort

Nanogram/Litre

Optiklens

Optik pleakod

Parts per million

## 1. GİRİŞ

Zebra balığı insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Son on yılda yapılan araştırmalarda kanserden balık davranış bilimleri gibi oldukça geniş bir alanda, biyomedikal çalışmalarda fare ve ratlara alternatif bir model organizma olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Çek, Shang, Perera, Su ve Dunham 2016; Çek ve Aydın, 2016; Davis, Bryda, Gillespie, ve Ericsson, 2016a; 2016b; Gaulke, Barton, Proffitt, Tanguay ve Sharpton, 2016; Moon ve diğ., 2016 ; Tsang, Zahid, Ansari, Lee, Partap ve Gerlai., 2017; Meyers, 2018).

Zebra balığı insan hastalıklarının araştırılmasında model organizma olarak ilk kez Streisinger, Walker, Dower, Knauber ve Singer (1981) tarafından kullanılmıştır. Araştırma sinir sistemi gelişimini etkileyen genetik mutasyonlar üzerine yapılmıştır (Streisinger ve diğ., 1981). Cooper (2017) yaptığı derlemede, zebra balıklarının insanlarda melanosit hastalıklarının nasıl anlaşıldığı ve nasıl tedavi edildiğine geliştirmeye yönelik bilgiler sunmuştur. Gasch, Payseur ve Pool (2016) model organizmaların genom dizilimlerinin bilinmesi sayesinde insanlara ait hastalıkların gelişim süreçleri, fizyolojik ve biyolojik süreçlerinin anlaşılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

İnsanlarda genetik kaynaklı hastalıkların araştırılmasında en yaygın model organizma olarak kullanılmasının başlıca nedeni gen dizilimi bakımından (Howe ve diğ., (2013)) insan ve zebra balıklarının %70 oranında ortolok genlere sahip olmalarıdır. Denek olarak kullanıldığı başlıca diğer alanlar ise organ rejenerasyonu (Shi, Fang, Li ve Luo, 2015). anjiyogenez (Chávez, Aedo, Fierro, Allende ve Egaña, 2016), Nörobilimdir. (Perathoner, Cordero-Maldonado, Crawford, 2016). Ayrıca, çoklu enfeksiyöz hastalıklar (Shan, Zhang, Zhuo, Peng ve Fang, 2016), kök hücre gelişimi (Staal, Spaink ve Fibbe, 2016) ve insanlarda görülen kanserlerdir (Feitsma ve Cuppen, 2008; Liu ve Leach., 2011). İnsan organlarında görülen tüm kanserler zebra balıklarında da görülmektedir. Melanoma, böbrek, karaciğer, beyin, pankreas, ovaryumlar ve testislerde oluşan tümörlerin hücresel bazda mikroskop altındaki görünimleri insan ve zebra balıklarında oldukça benzerdir. Bu benzerlik iki canlıdaki kanser oluşumunu, yayılmasını, tedavisini kıyaslamakta bilim insanlarına kolaylık sağlamaktadır.

Zebra balığı ile çalışmanın avantajlarından bir diğeri ise, sucul omurgalıların çevreden yayılan çeşitli stres faktörlerine diğeri canlılardan daha fazla maruz kalmalarıdır. Zebra balığı

yumurta ve embriyoları toksik ajanlara karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle son yıllarda toksisite çalışmalarında zebra balığı yumurtaları, embriyoları ve anaçları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Hisaoka ve Battle, 1958; Kimmel, Ullmann ve Schilling, 1995; Lele ve Krone, 1996; Din, 2002). Brundo ve Salvaggio (2018) nano toksikoloji çalışması için yeni bir model olabileceğini bildirmişlerdir.

Zebra balığı memeli olan fare ve ratlara göre birçok avantaja sahiptir. Zebra balığının kötü çevre koşullarına karşı dayanıklı bir tür olması, tüm dünya ülkelerine dağılmış ve kolay bulunması, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmesi ve çoğalması, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmesi, yumurta ve embriyosunun saydam oluşu (yumurta ve larva gelişiminin kolay izlenebilmesine olanak sağlar), çok kısa bir yaşam döngüsüne sahip olması fare ve ratlara olan üstünlükleridir. Oldukça ucuz olmaları da bir avantajdır. Fareler bir batında 3-5 yavru verebildikleri halde zebra balıkları bir batında her hafta 100 ile 300 adet arasında yumurta verebilmektedir. Bu durum biyomedikal araştırmalarda denek olarak tercih edilmesinin en önemli nedenlerinden birisidir (Lawrence, 2007). Bilim insanlarını istatistiksel olarak daha güçlü kılmaktadır. Üreme işlevlerinin incelenmesi bakımından *D. rerio*' nun 20 yıl önce denek olarak yaygın kullanılan nematod *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila sp*'de mevcut olan temel pozitif özelliklerin bir çoğuna sahip olduğu rapor edilmiştir (Streisinger, Walker, Dower, Krauber ve Singer, 1981).

Bu temel özelliklerinden dolayı zebra balıkları son on yılda en fazla biyomedikal araştırmalarda denek olarak kullanılan omurgalı olmasına rağmen yapay üretimi üzerine çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Laboratuvar koşullarında Zebra balığı yapay olarak üretilmesinde uluslararası standart bir yöntem geliştirilememiştir. Doğada üremesi genellikle akarsular, kanallar, hendekler, göletler, pirinç tarlaları ve durgun sular gibi yavaş hareket eden sularda muson yağmurlarıyla birlikte sabahın erken saatlerinde gerçekleşmektedir. Doğal ortamlarda yumurtanın döllenenmesi ve çıkışı oldukça düşük orandadır (Lawrence, 2007; Adu ve Thomsen 2011).

Akvaryum ve laboratuvar koşullarında en yaygın kullanılan yumurtlatma yöntemleri ise yumurtlama kaplarının üzerlerinin bitkiler ile kaplanarak ve balığın yumurtlamaya teşvik edilmesidir. Bir diğer yöntem ise yumurtlatma kapları tabanına çakıl taşları yerleştirilmesi ve balığın çakıl taşlarına yumurtalarını bırakmasıdır (Lawrence, 2007; Adu ve Thomsen 2011). Ancak bu yöntemlerde aynı yaşta ve boyda çok sayıda embriyo elde etmek oldukça zordur. Biyomedikal çalışmalar için aynı yaşta ve boyda çok miktarda embriyo elde etmek

amacıyla yumurtlama yapay olarak yapılmalıdır. Yumurta ve sperm sağım yolu ile alınmalı ve el ile dölleme yapılmalıdır. Sadece yapay olarak yapılan döllemede yumurtaların sayısı, yumurta büyüklüğü, olgunlaşma yaşı, büyüklüğü belirlenebilir ve deneylerin tasarlanması için son derece önemli olan aynı yaştaki çok sayıda embriyoların doğru bir şekilde elde edilmesi sağlanabilir. Bu nedenle, bu tezin birincil amacı, zebra balıklarını yapay olarak elde etmek ve evrensel olarak kabul edilebilecek bir üretim yöntemini geliştirmektir. Bu başlangıç noktasından hareketle, laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen döllemeyi izleyerek döllemiş yumurtanın, diğer bir ifade ile zigotun belli bazı gelişim evreleri incelenerek değerlendirilmiştir. Yumurtanın çapı, yumurta verimliliği, olgunlaşma yaşı gibi parametreler de incelenmiştir. Genel bir ifade ile diğer bilimsel araştırmalar gibi bu çalışmanın da çeşitli deneysel uygulamalara ve biyomedikal çalışmalara zemin oluşturacağına inanılmaktadır.

Zebra balığı üretilmesinde cinsiyetlerin belirlenmesi farklılaşması ve özellikle cinsiyet oranı da oldukça önemli bir parametredir. Cinsiyet oranı çok sayıda bilim insanı tarafından araştırılmıştır (Sharma ve Patino, 2013; Liang, ve diğ., 2015; Ye, Zhu, Zhang, Xiong ve Wong, 2019; Kossack, High, Hopton ve Yan, 2019). Yumurtadan çıkışı izleyen 20 gün sonra Liang ve diğ., (2015) progesteron ve norgestrel uyguladıkları zebraların önemli oranda dişileştiklerini kaydetmişlerdir. Kossack ve diğ., (2019) tarafından yapılmış olan bir çalışmada, insan ve zebra balıklarının ortak atalarında mevcut olan wnt4a geninin sonradan kaybolduğunu ve cinsiyet oranının zebralarda erkek cinsiyet lehine olduğunu ileri sürmüşlerdir. wnt4a geni zamanla mutasyona uğrayıp etkisini kaybettiğinden dolayı erkek cinsiyeti baskılayıcı bir unsur kalmadığını ifade etmişlerdir. Bu tez de ikincil önemli amaç olarak cinsiyet oranı incelenmiştir. Böylece zebra balıklarının kontrollü laboratuvar koşullarında üreme biyolojilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Üreme Biyolojisi

Zebra balıklarının doğal ortamda üremelerinin oldukça kolay ancak, doğal ortamlarda yumurtanın döllenenmesi ve çıkışının oldukça düşük oranda olduğu saptanmıştır. Zebra balıkları çevresel şartlara özellikle de su sıcaklığına karşı dayanıklıdır. Su sıcaklığının 20-35°C arasında değişen aralıklarda sorun olmadan yaşayabilmektedir. Sık aralıklarla üreme için optimum sıcaklığının 28 °C (Dede ve Çek-Yalnız, 2018) ve pH' nın 6,5-7,5 arasında olması gerektiği belirtilmiştir (Lawrence, 2007; Hekimoğlu, 2009; Dede ve Çek-Yalnız, 2019).

Carfagnini, Rodd, Jeffers ve Bruce (2009) dişi zebra balıkları üzerine yaptıkları araştırmada, farklı iki grup tank kullanmışlardır. Birinci grup tank sentetik bitkiler ile donatılmış, ikinci grup tanklar ise boş bırakılmışlardır. Bitkilendirilmiş olan tanklardaki dişi zebra balıklarında üreme ve yumurta verimliliği, ikinci grup ve boş olan tanklardaki zebra balıklarından önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bitkisiz olan tanklarda çiftleşme ve yumurta verimliliği azalmıştır (Carfagnini ve diğ., 2009).

Lee, Tyler ve Paull, (2018) tank değişimlerinin zebra balıklarının üreme performansı üzerine etkilerini incelemiş ve çalışma periyodu süresince, farklı tanklara alınan zebrealar ile sürekli aynı tanklarda tutulan zebreaların üreme performansları arasında önemli bir farklılık saptamamışlardır.

Dabrowski ve Miller, (2018) ışık, tuzluluk ve besin miktarını kullanarak kontrollü koşullarda zebra balıklarını 45 gün içerisinde eşeyssel olgunluğa getirmeyi başarmışlardır. Deney gruplarını, yumurta çıkışını izleyen 46-48 gün süresince sürekli ışığa tabii tutmuşlar, tuzluluk oranını ‰1,8-2,1 arasında sabitlemiş, besin olarak ise rotifer ve artemia kullanmışlardır. Deneme süresince canlı yem haricinde bir yem kullanmamışlardır (Dabrowski ve Miller, 2018). Yazarlar bulgularına dayanak bir yılda sekiz generasyon zebra balığı üretilebileceğini önermişlerdir.

Tsang, Zahid, Ansari, Lee, Partap ve Gerlai, (2017) yapmış oldukları derlemede zebra balığı üretim tekniklerini kıyaslamış ve bu farklı tekniklerde bir standardın olmadığını bildirmiş ve farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçları kıyaslayabilmek için üretim tekniklerinde bir standardın olması gerektiğini önermişlerdir.

Delomas ve Dabrowski, (2018b) farklı sıcaklık derecelerinin zebra balıklarının üremeleri, yaşama ve büyüme oranları üzerine etkilerini araştırmışlardır. Önceki literatürlerde yer alan optimum 28 °C üreme sıcaklığı ile yazarların çalıştıkları 23 °C arasında üreme büyüme ve yaşama oranları arasında önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir.

Kucharczyk, Stepien, Nowosad, Kupren, Targonska ve Kujawa, (2018) zebra balıklarının yumurtlama aralığına düşük sıcaklık derecelerinin etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre 19 °C de 20 gün aralıklarla dişilerin kaliteli yumurtlaması gerçekleşmiştir (Kucharczyk ve diğ., 2018).

Kontrollü laboratuvar koşullarında, zebra balığında yumurtlama döngüsü ve yumurta verimliliği ilk kez Eaton ve Farley, (1974) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada yapay yöntem kullanılmamış balıklar akvaryum koşullarında doğal yolla üremeye bırakılmışlardır. Her bir çift balık başına üretilen günlük yumurta miktarının 23,1 ile 60,4 arasında değiştiği kaydedilmiştir. Yazarlar tarafından anaçların beslenmesi sadece canlı yemler ile yapılmıştır. Anaçları sürekli canlı yemlerle beslemenin yumurta verimliliğini artırdığını belirtmişlerdir (Eaton ve Farley, 1974).

Mills, (1986) ise bir dişi zebra balığının haftada yaklaşık 100-300 adet yumurta bıraktığını bildirmiştir. Zebra balıklarının ovipar üreme ile çoğaldıkları ve döllenmiş olan yumurtanın gelişiminin yüksek omurgalılarınkine benzemekle birlikte, ovipar üreme göstermesini diğer yüksek omurgalılar ve memelilerden üstün olan bir özellik olarak belirtilmiştir (Wixon, 2000; Dede ve Çek-Yalnız, 2018).

Brand, Granato ve Nusslein-Volhard (2002) zebra balığının diğer model organizmalarla karşılaştırıldığında, daha yüksek döl verimine sahip olduğunu ve optimal şartlarda, bir dişinin haftada 200 yumurta ürettiğini yapmış oldukları çalışmalarla ortaya koymuşlardır.

Canlı yemler ve protein ağırlıklı yemlerle yapılan beslemenin zebra balıklarının üremesi üzerine olumlu etkileri olduğu bazı yazarlar tarafından kaydedilmiştir. Karga ve Mandal (2016) zebra balıklarının üzerine yapmış oldukları bir besleme çalışmasında zooplanktonun yavru zebra balıklarında daha iyi büyüme, üreme performansı ve hayatta kalma oranı sağladığını bildirmişlerdir. Ulloa ve diğ. (2013) erişkin zebra balıklarının yemlerinde bitkisel ve hayvansal protein kullanarak yaptıkları bir besleme çalışmasında bitki kaynaklı protein diyetin gen ekspresyonuna etki ettiğini ve üremeyi olumlu yönde desteklediğini ifade etmişlerdir.

Üreme dönemine gelmiş olan bir zebra balığının doğal ortamında boyu 4-6 cm arasında değişirken, laboratuvar koşullarında 2-4 cm olmaktadır (Dede ve Çek-Yalnız, 2018). Genellikle akarsular, kanallar, hendekler, göletler, pirinç tarlaları ve durgun sular gibi yavaş hareket eden sularda buldukları ve doğal ortamında sivrisinek larvaları ve diğer böcekler ile beslendikleri kaydedilmiştir (Lawrence, 2007).

Üreme mevsimi Nisan ile Ağustos ayları arasında küçük akarsu havuzlarında muson yağmurlarının gelmesi ile meydana gelir (Lawrence, 2007; Adu ve Thomsen, 2011). *D. rerio*' nun ömrü kontrollü laboratuvar koşullarında beş yıldır, 3 ayda olgunlaşma aşamasına ulaştığı ve yapay üremeye hazır hale geldiği bildirilmiştir (Lawrence, 2007).

Wolenski ve Hart (1987) tarafından *D. rerio*' da spermatozoonun yumurtaya girişi ve gametlerin morfolojileri tarama elektron mikroskobu ile çalışılmıştır.

## 2.2. Cinsiyet Oranı

Delomas ve Dabrowski, (2018a) ergin triploid zebra balıkları üzerine yapmış oldukları araştırmada, bu bireylerin tamamının erkek olduğunu bildirmişlerdir. Triploid erkek zebra balıklarını dişileştirmek amacıyla uyguladıkları 100 ng/l estradiol (E<sub>2</sub>) etkili olmamıştır. Triploid erkeklerden elde edilen sperm ile yumurta döllenebilmiş ancak döllenme oranı %1±3.1 olarak oldukça düşük olduğu bildirilmiştir. Yazarlar triploidinin oosit gelişimini önlediği ve dişileri erkekleştirdiği sonucuna varmışlardır (Delomas ve Dabrowski, 2018a).

Hofsten ve Olsson, (2005) yapmış oldukları derlemelerinde, zebra balıklarında cinsiyeti kontrol eden genlerin ve cinsiyet kromozomlarının olmadığını bildirmişlerdir. Zebra balıklarında cinsiyet steroidlerinin sentezlenmesini kontrol eden bazı genlerin cinsiyet oranının belirlenmesinde etkin rol oynadığını belirtmişlerdir. FTZ-FI genlerinin steroid biosentezini güçlü bir şekilde kontrol ettiklerini ifade etmişlerdir.

Sharma ve Patino, (2013) trioid bezi hormonlarının ciddi anlamda zebra balıklarında cinsiyet oranını etkilediğini belirlemişlerdir. Dışarıdan trioid hormonu uygulandığı zaman balıkların erkek cinsiyet lehine geliştikleri görülmüştür.

İnsanlarda doğum kontrol haplarının ana bileşenleri olan iki sentetik formdaki hormon, progesteron ve norgestrel 'in zebra balıkları cinsiyet oranı üzerine etkileri Liang ve diğ., (2015) tarafından çalışılmıştır. Bu hormonların, cinsiyet hormonlarının salgılanmasını kontrol eden genleri etkiledikleri sonucu çıkmıştır (Liang ve diğ., 2015).

Zebra balıklarına progesterin uygulandığında erkekler lehine cinsiyetin değiştiği Svensson, Mustafa, Fick, Schmitz ve Brunstrom, (2016) tarafından rapor edilmiştir.

Zebra balıklarında üreme kanalı ve dişi cinsiyetin gelişiminin Wnt4 genine bağlı olduğu Kossack ve diğ. (2019)'nin yaptığı araştırmalar sonucu, ifade edilmiştir. Aynı yazarlar memelilerde ve memeli olmayan tüm omurgalılarda Wnt4 geninin üreme kanalı gelişimi ve dişi cinsiyetin oluşumunu kontrol edebileceğini tartışmaya açmışlardır.

Ye ve diğ. (2019)'nin yaptıkları araştırmada erken embriyonik gelişim aşamasında germ hücrelerinin sayılarının artışı zebra balıklarında dişi cinsiyetin oluşumunu sağlamaktadır.

Çevresel faktörlerin zebra balıkları cinsiyet oranı üzerine etkileri Lee ve diğ. (2019) tarafından araştırılmıştır. Denemelerinde bazı akvaryumlar bitkilendirilmiş ve bazı akvaryumlarda ise akvaryum tavanı boş bırakılmıştır. Bitkilendirilmiş olan akvaryumlarda yaşama oranı daha iyi iken, iki akvaryumdaki zebra balıklarının cinsiyet oranları arasındaki fark önemli bulunmamıştır (Lee ve diğ., 2019).

### **2.3. Embriyonik Gelişimi**

Kimmel, Ballard, Kimmel, Ullmann, ve Schilling, (1995) zebra balığının embriyonik gelişimi üzerine çalışmışlardır. Yazarlar farklı su sıcaklıklarına bağlı olmakla birlikte embriyonik gelişimin oldukça hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Embriyonik gelişim başlıca 7 farklı evreye ayrılmıştır. Her evre de ayrıca kendi arasında alt bölümlere ayrılmıştır. Bu evreler; zigot, segmentasyon, blastula, gastrula, faringula, kuluçka ve larval evrelerdir. Mevcut evreler birbirleri ile keskin bir şekilde ayrılmamakta ve her bir evre arasındaki zaman uzunluğu başta su sıcaklığı olmak üzere çevresel faktörlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Yumurta döllendikten sonraki 45 dakikalık evre zigot evresi olarak tanımlanmıştır (Kimmel ve diğ., 1995). Zigot evresi ile birlikte ilk bölünmeler gerçekleşir ve blastomerler her 15 dakikada bir bölünürler. Yumurta döllendikten bir saat sonra 4 blastomer oluşmakta ve bölünmeler meroblastik şekilde oluşmaktadır. (Kimmel ve diğ., 1995; Ekici, 2007; Dede ve Çek-Yalnız, 2018).

Zebra balıklarında embriyonik gelişim evrelerini inceleyen Sharmili ve Angel., (2015), embriyonun, blastula evresinde blastodisk bir futbol topu gibi görüldüğünü ifade etmiştir. Blastodisk oluşumu elektron mikroskobu çalışmalarıyla Sarka ve Wallace (1993) tarafından asenkronize tipte ovaryuma sahip olan zebra balıklarında araştırılmıştır. Bu evrede embriyo, 128 blastomerli, diğer bir ifade ile 8. hücre bölünmesinin gerçekleştiği evre olarak

tanımlanmaktadır. Blastula evresi gastrula evresinin başlangıcına kadar devam eden evredir. Gastrula evresinin, su sıcaklığına bağlı olarak fertilizasyondan sonra 5. ve 24. saatler arasında gerçekleştiği rapor edilmiştir. Epibol olarak ifade edilen en yoğun bölünmenin gastrula evresinde gözlemlendiği kaydedilmiştir. Bu evrede bölünmeler yumurta sarısının %50 sini kaplamaktadır.

Vitellusun küçülmeye başlaması, gastrulasyonun başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Sharmili ve Angel., 2015). Gastrulasyonda gerçekleşen en önemli olaylar kuyruk tomurcuğu ve bir kalkan görevi gören germ halkasının oluşmasıdır. Bu evrede baş bölgesinin belirginleştiği ve evre sonunda somitlerin oluşumunun tamamlandığı rapor edilmiştir (Kimmel ve diğ., 1995; Ekici, 2007; Sharmili ve Angel., 2015; Dede ve Çek-Yalnız, 2018). Endoderm, ektoderm ve mezoderm katmanlarının da bu aşamada oluştuğu Roper ve Tanguay (2018) tarafından bildirilmiştir. Gastrulasyon sırasında oluşan hücre hareketleri Warga ve Kimmel (1990) tarafından incelenmiştir.

Faringula evresi vitellüs kesesinin küçülmeye devam ettiği embriyonun baştan kuyruğa doğru uzanmaya başladığı evredir. Döllenmenin gerçekleşmesinden sonraki 25. ve 48. saatler arasındaki bu evrede, organeller oluşmaya başlamaktadır. Evrede yüzgeçler şekillenir, pigment hücreleri farklılaşır, beyin taslağı oluşur. Dolaşım sistemi oluşmaya ve kalp atmaya başlar (Kimmel ve diğ., 1995). Özet olarak bu evrenin en önemli özelliği, organların oluşmaya başladığı evre olmasıdır (Roper ve Tanguay, 2018).

Zebra balığı embriyoları 72. Saatten itibaren koryondan çıkar ve bu evre larval evre olarak adlandırılır. Döllenmeyi izleyen 96. Saatte ise bütün organeller tamamlanmıştır. Zebra balığı, gelişiminin 3. ayında ergin döneme ulaşır (Westerfield, 1995; Stern ve Zon, 2003; Roper ve Tanguay, 2018).

Zebra balıklarında embriyogenezin iyi tanımlanmasını izleyen araştırmalarda, Westerfield (2000) ve Wixon (2000) yaptıkları çalışmalarda zebra balık embriyosunun nörobiyoloji ve gelişimsel biyolojide büyük bir model haline geldiğini bildirmişlerdir.

Carpio ve Estrada (2006) Zebra balığı, embriyo gelişimindeki genetik kontrolünün kolaylığı ve deneysel avantajlarından dolayı son yıllarda deneysel çalışmalarda tercih edilen model organizma haline geldiğini ve bu balığın üretiminin kolay ve hızlı bir gelişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

Embriyonik gelişimin insan ve diğer omurgalılarda oldukça benzer olduğu bildirilmiştir (Lele, Engel ve Krone 1996). Yazarlar bu nedenle, zebra balığı insan ve diğer omurgalılarda hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanıldığını ifade etmişlerdir.

Amsterdam ve Hopkins (2006) zebra balığında; embriyo gelişiminin dışı balığın vücudu dışında olması, yumurtaların transparan özellikte olması, morfolojik olarak mutantların izlenebilmesi, kolay manipüle edilebilir olması nedeniyle su ürünlerinde ve insan hastalıklarında model canlı olarak kullanılmışlardır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Zebra Balığı'nın (*Danio rerio*) sistematikteki yeri ve dağılımı

Zebra balığı (*Danio rerio*) tropikal tatlı su türüdür ve Spence, Gerlach, Lawrence ve Smith (2008)' in sınıflandırmasına göre en zengin omurgalı aile olan Cyprinidae'nin bir üyesidir.

Alem	<i>Animale</i>
Şube	<i>Chordata</i>
Sınıf	<i>Actinopterygii</i>
Takım	<i>Cypriniiformes</i>
Aile	<i>Cyprinidae</i>
Alt-aile	<i>Danioninae</i>
Cins	<i>Danio</i>
Tür	<i>Danio rerio</i>

Günay Asya orjinli bir türdür. Himalaya bölgesine özgü, Hindistan, Bangladeş, Nepal, Myanmar'dan Pakistan'a geniş bir dağılıma sahiptir (Lletta ve Kwong, 2018). *D. rerio* dünya çapında yaklaşık 45 *Danio* türünden biridir. Cyprinidae familyası içerisindeki en küçük boylu türdür.

##### 3.1.2. Deneme yeri

Bu çalışma İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü akvaryum ünitesinde yapılmıştır.

##### 3.1.3. Deneme akvaryumları ve suyun özellikleri

Zebra balıkları denemenin yapıldığı İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü akvaryum ünitesinde ebatları 23x35x37 cm (yükseklik, en, boy) ve kapasitesi 29 litre olan akvaryumlara yerleştirildi. Haftalık su değişimleri elle %70 oranında yapıldı.



Resim 3.1. Araştırmanın gerçekleştirildiği deney düzeneği

Akvaryumun bulunduğu ortam fotoperiyodu sağlamak için 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ışıklandırılmıştır. Optimum su sıcaklık ihtiyacı 28,5 °C olduğu bildirilmiştir (Mayers, 2018), bu çalışmada ise suyun sıcaklığı 28±1 °C' ye ve pH 7,06-7,08 olacak şekilde ayarlanmıştır. Denemede toplamda 9 adet akvaryum kullanılmıştır. Deneysel çalışma sırasında, balıklar artemia ve dafniya olarak beslenmiştir. Yemleme günde 2 kez at libutum şekilde yapılmıştır.

#### **3.1.4. Deney balıkları**

Çalışmada kullanılan 20 adet dişi 40 adet erkek damızlık zebra balığı Antakya'daki akvaryumculardan temin edilmiştir.





Resim 3.2. Anaç balıklarının bulunduğu akvaryum düzeneği (orijinal resim)

Çalışmada balıklar 5 dişiye 3 erkek gelecek şekilde 23x35x37 cm (yükseklik, en, boy) ebadında çiftleştirme akvaryumlarına bırakılmıştır.

### 3.1.5. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar



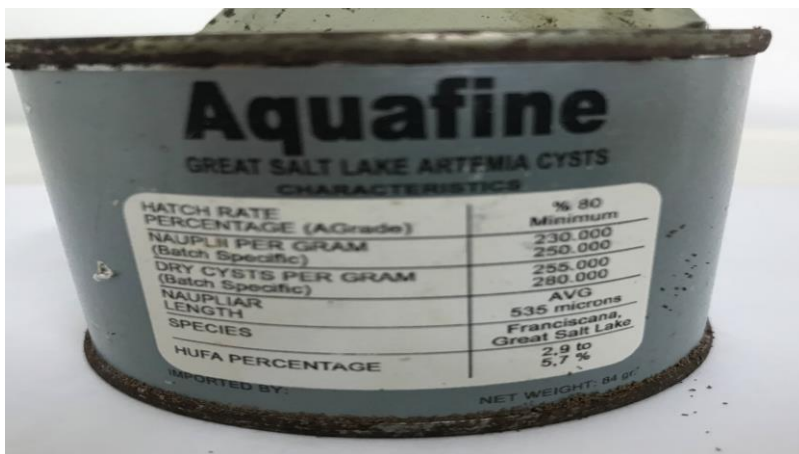
Resim 3.3. Suyun ölçümünde kullanılan YSI Oksijenmetre (orijinal resim)



Resim 3.4. Yumurtaların ölçümünde kullanılan mikroskop (SEILERSCOPE SXS-820) (orijinal resim)

### 3.1.6. Balık yemleri

Deneysel çalışmalar boyunca, zebra balıkları iki farklı canlı yem *Daphnia* (Tropical) ve *Artemia* (Aq) kullanılarak beslemeleri yapılmıştır. Besleme altı ay boyunca günde iki kez at-libutum olarak yapılmıştır. Balık deneyleri, hayvan etiği komitesi yönergeleri ile uyumlu bir şekilde yürütülmüştür. *Artemia salina* kistleri 28-30°C sıcaklık, %0,25 tuzluluk ve pH 8-8,5 değerleri olan su içerisinde, hava difüzörü kullanılarak ve tam zamanlı aydınlatma uygulanarak inkübe edilmiştir (Karaçuha ve Aral, 2008).



Resim 3.5. *Artemia salina* (orijinal resim)

### 3.2. Yöntem

Bu çalışmada kullanılan erkek ve dişiler daha önceki stokların karnı şişmiş anaçlarından seçilmiştir. Deneme de ortalama boyları  $3,34 \pm 0,40$ ;  $2,97 \pm 0,3$  cm ve ortalama ağırlıkları ise  $0,38 \pm 0,14$ ;  $0,25 \pm 0,27$  g olan dişi ve erkek zebra balıkları kullanılmıştır. Döllenme kuru yöntem ile yapay olarak yapılmıştır. Yumurtalar 4-5 gün içinde  $28 \pm 1$  °C' de inkübe olmuştur. Yumurtaların ortalama çapları mikroskop altında ölçülerek hesaplanmıştır.

#### 3.2.1. Dişi anaçlardan yumurta elde edilmesi

Üreyebilecek olgunluğa ulaşan zebra balıkların seçimleri yapıldı. Anaç balıklardan döl alımı sırasında balıkların stres altında kalmasını engellemek ve bu uygulama sırasında nadir de olsa meydana gelebilecek balık ölüm ölümlerinin önüne geçebilmek için balıklar anestezi solüsyonunda tutulmuştur. Anestezi uygulamasında  $10 \mu\text{l/l}$  lik bir kinaldin solüsyonu kullanılmıştır. Balıkların anestezi solüsyonunda çok uzun süre tutulmamasına dikkat edilerek zebra balıkları solüsyondan çıkarılmışlardır.



Resim 3.6.  $1/10\mu\text{l}$  kinaldin çözeltisi ile anestezi uygulaması



Resim 3.7. 1/10µl Kinaldin çözeltisi ile anestezi uygulaması (orijinal resim)



Resim 3.8. Zebra balığında morfolojik olarak erkek ve dişi ayırımı; a, Erkek; b, Dişi (orijinal resim)

Erkek ve dişiler için ortalama vucut uzunlukları sırasıyla  $3,34 \pm 0,40$ ;  $2,97 \pm 0,3$  cm ve ortalama ağırlıklar sırasıyla  $0,38 \pm 0,14$ ;  $0,25 \pm 0,27$ g olarak ölçüldü. Anestezi solüsyonundan çıkarılan dişi balığın vücudu hafif nemli kalacak şekilde genital bölge ise tamamen kurulanmıştır. Dişi balıktan yumurta, iki parmak kullanılarak serçe parmağı ile abdomen bölgesine uygulanan hafif baskı ile masaj yapılarak pipet ve yardımıyla elde edilmiştir.



Resim 3.9. Pipet yardımı ile dişi anaçtan alınmış yumurtalar

Elde edilen yumurtalar spatula yardımıyla 90 mm' lik steril petri kaplarına aktarılmıştır. Erkekten alınan sperm ile kuş tüyü ile karıştırılarak dölleme kuru yöntemle ile yapay olarak yapılmıştır. Dişi balıktan yumurta eldesi sırasında yumurtaların su ile temas etmemesine dikkat edilmiştir. Yumurta alımından sonra dişi balıklar anestezinin etkisinden kurtulmaları amacıyla akvaryum suyuna bırakılmıştır.

### 3.2.2. Erkek anaçlardan sperm elde edilmesi

Sperm almaya hazır erkekler anaçlar arasından birincil olarak kur yapma davranışlarına bakılarak seçilmiştir. Eğer erkek sürekli dişi balığı takip ediyor ve dişiyi sıkıştırıyor ise o erkek sperm alımı için hazır olarak değerlendirilmiştir. Erkeğin agresif davranışları da sperm alımı için bir gösterge olmuştur. İkincil olarak erkeğin yaşı oldukça önemli bir unsurdur en az yaşının 6-7 aylık olması gerekir. Üçüncül özellik olarak erkek bireyin bütün yüzgeçleri

incelenmiştir. Yüzgeçler oldukça uzun, parlak ve canlı renklere sahip olması da önemli bir gösterge olarak kullanılmıştır. Erkek balıklar akvaryumdan seçildikten sonra her birine anestezi uygulanmıştır. Anesteziden sonra genital papillaları morfolojik olarak incelenmiştir. Eğer genital papilla hafif uzun, şişkin ve hafif kırmızımsı ise bu da sperm almadan önce bir parametre olarak kullanılmıştır. Anestezi içerisinde yan yatmaya başlayan erkek balıklar nazikçe el ile alınır ve peçete yardımı ile yumuşakça silinerek fazla sular, dışkılar vs alınmıştır. Sperm alımında Resim 3.10'da görüldüğü gibi atılabilir mikro pipetler kullanılmıştır. Steril olan mikro pipetler (DRUMMOND, U.S.A), her erkek balık için 1 kez kullanıldıktan sonra atılmıştır. Sağım sırasında sürekli büyüteç kullanılmıştır. Sağım her zaman iki kişi ile gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.10. Erkek anaçlardan sperm alımında yararlanılan mikro pipet

### 3.2.3. Cinsiyet oranı

Bu çalışmada, yumurtadan çıkışı izleyen 90 gün süresince, laboratuvar koşullarında üretilen *Danio rerio*' nun cinsiyet oranı belirlenmiştir.

### 3.2.4. Döllenmiş yumurtaların bakımı ve çaplarının ölçümü

Döllenmiş yumurtalar embriyonik gelişimleri süresince 90 mm çapındaki steril petri kabında inkübatörde (WiseCube WIG-50) 28 °C de sabitlenmiş sıcaklıkta muhafaza edilerek

inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. Yumurta çapları ışık mikroskobuna yerleştirilmiş mikrometre kullanılarak alınmıştır.



Resim 3.11. Gelişmeleri takibe alınmış döllenmiş yumurtalar

Döllenen yumurtalar (127 adet) mikroskop altında çapları ölçülerek sayım işlemi gerçekleştirildi.

### 3.2.5. İstatistiksel analizler

Akvaryumlardaki *D. rerio* için cinsiyet oranı ki-kare ( $\chi^2$ ) testi ile belirlenmiştir (Zar, 1984). Erkek ve dişi *D. rerio* cinsiyet oranları ilişkisi korelasyon analizi ile yapılmıştır. Erkekler ve dişilerin vücut ağırlığı ve uzunluğu arasındaki farklar Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile (Windows 10.0; SPSS, Chicago, 17), ve Duncan parametrik olmayan çoklu karşılaştırma prosedürü ile test edildi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Su Kalitesi Parametreleri

Deneysel çalışmalar sırasında su kalitesi parametreleri ölçülmüştür. (Çizelge 4.1). Deneme süresince su sıcaklığı klima kullanılarak  $28 \pm 1$  °C de tutulmuştur. Deney süresince pH 7,06 ve 7,08, karbon konsantrasyonu 15,09-17,02 mg/l arasında değişmiştir. Oksijen seviyesi 4,9 ila 6 mg/l arasında değişmiştir. Toplam alkalinite 225-250 CaCO<sub>3</sub> mm/l arasında bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Deneysel çalışmalar sırasında su kalitesi parametreleri, ortalama  $\pm$  sd

Zaman (Aylar)	T(°C)	Oksijen (mg/l) $\pm$ sd	pH (mg/l) $\pm$ sd	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg/l) $\pm$ sd	NO <sub>3</sub> (mg/l) $\pm$ sd	C (mg/l) $\pm$ sd
Mayıs	28 $\pm$ 1	5,9 $\pm$ 0,71	7,08 $\pm$ 0,38	0,69 $\pm$ 0,51	70,57 $\pm$ 6,35	16,8 $\pm$ 0,47
Haziran	28 $\pm$ 1	7,5 $\pm$ 0,84	7,08 $\pm$ 0,49	0,81 $\pm$ 0,79	73,86 $\pm$ 5,91	15,9 $\pm$ 0,55
Temmuz	28 $\pm$ 1	6,42 $\pm$ 0,91	7,7 $\pm$ 0,21	1,41 $\pm$ 0,57	62,62 $\pm$ 4,70	17,3 $\pm$ 0,66
Ağustos	28 $\pm$ 1	6,18 $\pm$ 0,98	7,08 $\pm$ 0,21	1,70 $\pm$ 0,51	59,63 $\pm$ 7,0	16,8 $\pm$ 0,71
Eylül	28 $\pm$ 1	7,03 $\pm$ 0,70	7,06 $\pm$ 0,21	0,90 $\pm$ 0,53	60,65 $\pm$ 2,55	17,02 $\pm$ 0,12
Ekim	28 $\pm$ 1	6,86 $\pm$ 0,42	7,7 $\pm$ 0,38	1,95 $\pm$ 0,97	58,61 $\pm$ 5,23	16,6 $\pm$ 0,29

### 4.2. Yumurta Verimliliği ve Çapı

Tek bir yumurtlama zamanında üretilen yumurta sayısı ile toplu olarak elde edilen yumurta oranını bireyler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Yumurta sayısı 7 ile 110 arasında olup balıkların boyları ve ağırlıkları 3,34 ile 2,97 cm uzunluğunda ve 0,38 ve 0,25 g' dır. Zebra balıkları 4 aylık iken yumurtlama işlemi gerçekleşmiştir. Yumurtalar yapışkan olmayıp şeffaftırlar.

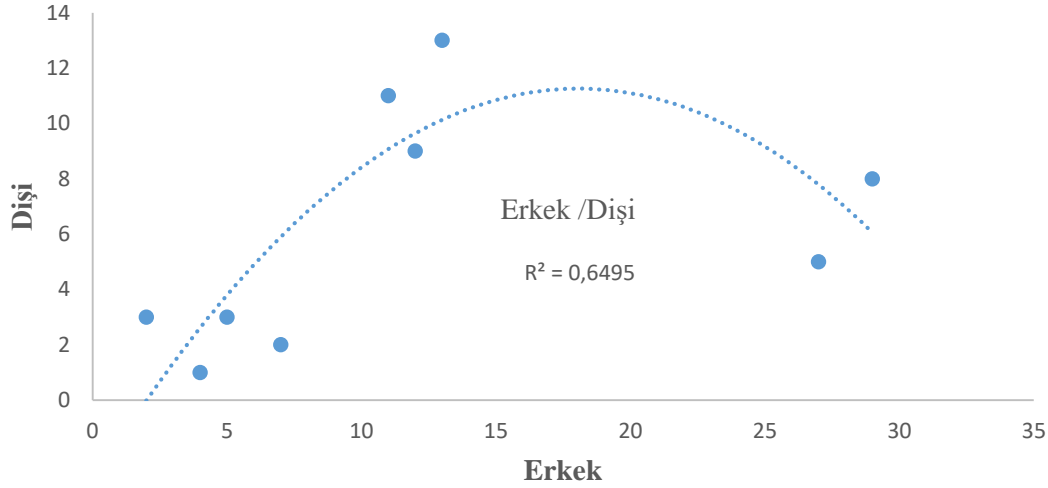
Döllenmeden kuluçkalamaya kadar olan gelişme dönemi,  $28 \pm 1$  °C de 4 günde gerçekleşmiştir. Yumurtaların çapının Ortalama  $405 \pm 0,001$  ila  $570 \pm 0,001$  µm arasında değiştiği kaydedilmiştir. Ortalama yumurta çapı değeri ise,  $490 \pm 1,45$  olarak bulunmuştur.

### 4.3. Cinsiyet Oranı

Farklı akvaryumlara yüksek ve düşük stoklama yoğunluğunda yerleştirilen balıkların cinsiyet oranları Çizelge 4.2'de ve cinsiyet oranları korelasyonu ise Şekil 4.1'de verilmiştir. Erkek ve dişi cinsiyeti arasındaki regresyon değeri 0,65 ( $R^2= 0.6495$ ) olarak kaydedilmiştir.



Bu değer zebra balıklarında cinsiyetin erkekler lehine olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1). Stok yoğunluğunun en yüksek olduğu IX nolu akvaryumda en yüksek miktarda erkek balık olduğu saptanmıştır. En düşük erkek cinsiyet ise VI no lu akvaryumda not edilmiştir. Bu akvaryum stoklama yoğunluğunun da en az olduğu akvaryumdur.



Şekil 4.1 *Danio rerio*'nın erkek ve dişi arasındaki cinsiyet oran ilişkisi

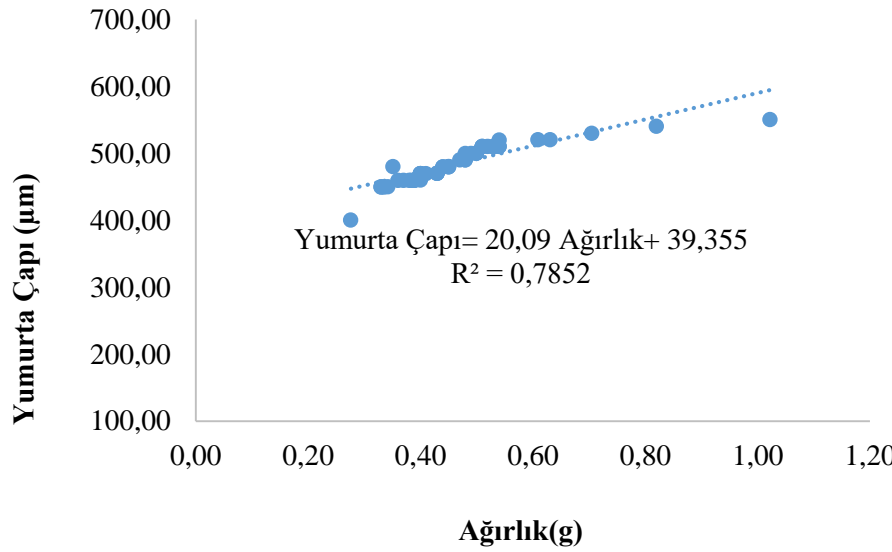
Çizelge 4.2. Farklı akvaryumlardaki zebra balıklarının (*Danio rerio*) cinsiyet dağılımı ve oranı (%).

Akvaryum sayısı	Cinsiyet Dağılımı		Cinsiyet Oranı (%)	
	Erkek: Dişi (E:D)		E:D	( $\chi^2$ )
I	4:1 (n=5)		80;20	--
II	5:3 (n=8)		62.5;37.5	--
III	13:13 (n=26)		50;50	--
IV	11:11(n=22)		50;50	--
V	7:2 (n=9)		77.77;22.22	--
VI	2:3 (n=5)		40;60	--
VII	27:5 (n=32)		84.37;15.62	15.125 <sup>2</sup>
VIII	12:9 (n=21)		57.14;42.85	--
IX	29:8 (n=37)		78.37;21.62	9.757 <sup>2</sup>
Toplam	109:54(n=163)		66.06;33.30	18.558 <sup>2</sup>

*D. rerio* için gözlenen cinsiyet oranı, iki akvaryumda beklenen 1: 1 Erkek: Dişi oranından önemli ölçüde farklı olarak bulunmuştur. Bu iki akvaryumda balıklar yüksek yoğunlukta stoklanmıştır (Çizelge 4.2). Diğer akvaryumlarda cinsiyet oranı, 1:1 beklenen cinsiyet oranından ve istatistiksel olarak farklı değildi. Ancak, yumurtadan çıktıktan sonraki 3 ay sonunda alınan 163 balıkta gözlenen cinsiyet oranı 109: 54'tur (Erkek: Dişi); bu fark

istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0,05$ ), (Çizelge 4.1). Tüm akvaryumlar göz önüne alındığında, Dişilerden daha fazla erkek kaydedilmiştir. Cinsiyet oranı, yüksek stoklama yoğunluklu akvaryumlarda (akvaryum VII ve akvaryum IX) beklenen 1M : 1F ( $P < 0,05$ ) oranından önemli ölçüde farklıydı. Akvaryumların çoğunda, Dişi *D. rerio*' dan daha fazla erkek *D. rerio* kaydedilmiştir.

#### 4.4. Yumurta Çapı ve Boy Ağırlık İlişkisi



Şekil 4.2. Dişi *Danio rerio*' nun vücut ağırlığı ve yumurta çapı arasındaki ilişki

Şekil 4.2'de yumurta çapı ile dişi *D. rerio* vücut ağırlığı arasında pozitif bir ilişki vardır ( $R^2 = 0,785$ ). Bu, zebra balığının vücut ağırlığının yumurta çapı ile artma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Yumurta çapı 405 µm ile 570 µm arasında değişmekte olup, ortalama 490 µm değerindedir. Dişi vücudu ağırlığı da 0,228g ile 1,022g arasındadır. Ortalama ağırlık ise 0,625 g olduğu tespit edildi (Şekil 4.2).

#### 4.5. Embriyogenez

Çalışmada 7 adet embriyogenez periyodu açıkça tespit edilmiştir. (Çizelge 4.3). Tüm dönemler 4 günde gerçekleşti. Bu gelişim aşamaları kısaca 7 aşamaya ayrıldı. Bu aşamalar: zigot, bölünme, blastula, gastrula, segmentasyon, pharyngula ve çıkış aşamalarıdır. Embriyo gelişiminin evreleri, döllenmiş yumurtanın morfolojik özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin gözlemleri temelinde sınıflandırılmıştır.

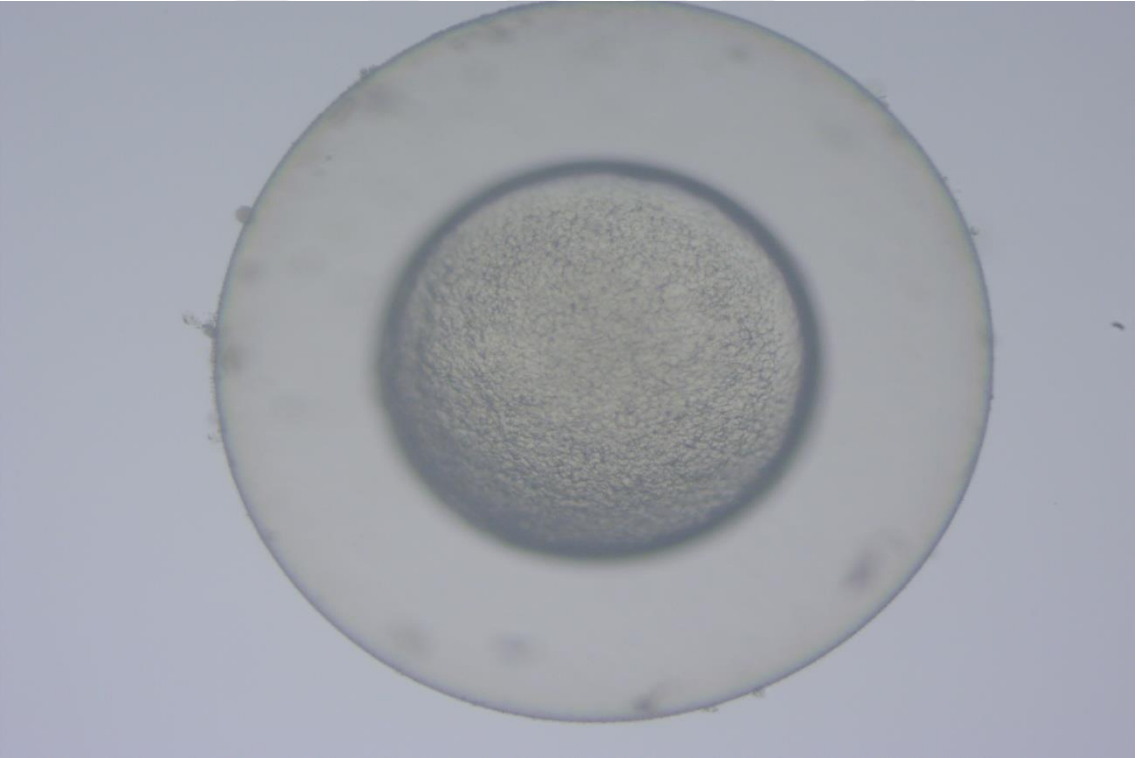
Çizelge 4.3. *D. rerio*'daki embriyogenezin  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de evreleri

Aşamalar	Zaman (Saat)	Tanım
Zigot	0-15 dpf	Çalışmamızda döllenmeden 15 dakika sonra tespit edildi.
Clavage	15 dpf-2 hpf	Sarısi dağılımı telolektandır, bu da sadece küçük bir bölgenin yumurta sarısı içermediği anlamına gelir.
Blastula	2-5hpf	Somatik hücre döngüsü bu aşamada döllenmeden 1-2 saat sonra tespit edildi.
Gastrula	5-10hpf	Bu aşamada embriyonik kalkan oluşturuldu ve embriyonun dorsal tarafı yapıldı.
Segmentasyon	27 hpf	Bu aşamada kuyruğun oluşumu net olarak tespit edilmiştir.
10- Pharyngula	27-50hpf	Omurganın doğrultulması, dolaşım, pigmentasyon, yüzgeç gelişimi gözlemlendi.
Kuluçka	73- 96 hpf	Bu aşamada birincil organ sistemlerinin oluşumu gerçekleşti. Bu aşama çoğunlukla döllenme sonrası 4 günlükken saptandı. .

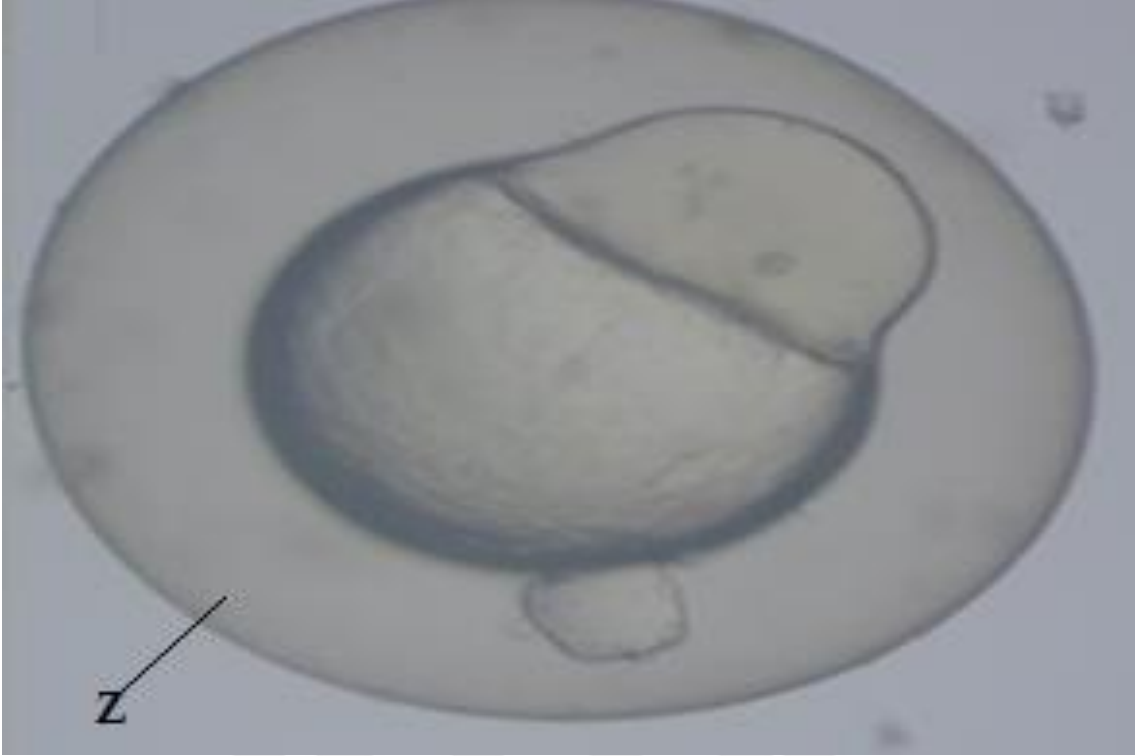
Dölenen yumurtaların mat görünümlü olduğu gözlemlenmiştir (Resim 4.1, 4.2). Döllenmiş yumurtalar gelişim esnasında bozularak yapısal değişikliklere uğramıştır. Fertilizasyondan 30 dakika sonra animal kutupta, blastodiskinin oluşumu görülmüştür (Resim 4.3). Bölünmeler döllenmeden sonraki 45 dakikada cleavage aşamasında başlamaktadır (Resim 4.4). Sekiz saatlik sürenin ardından blastuladisk oluşmuş ince bir yapıya dönmüştür (Resim 4.5). Blastuladisk oluşumunun ardından vitellus hücreler tarafından sarılmaya başlamıştır ve gastrulasyon aşaması gerçekleşmektedir. Optik lens, kuyruk oluşumu da bu evrede gözlenmektedir (Resim 4.6). Segmentasyon evresi döllenmeden sonra 27. Saatte kaydedilmiş olup otik pleokod ve notokord yapısı göze çarpmış bulunmaktadır (Resim 4.7). Segmentasyonun son aşamalarında ise göz oluşumu tamamlanmıştır ve besin kesesi incelmeye başlamıştır (Resim 4.8). 27 ila 50 saatler arasında frangula aşamasında melanositler ve dolaşım sisteminin oluştuğu görülmüştür (Resim 4.9). Döllenmeden sonraki 72 saatlik bir sürenin ardından inkübasyonu tamamlayan bireyler elde edilmiştir (Resim 4,10).



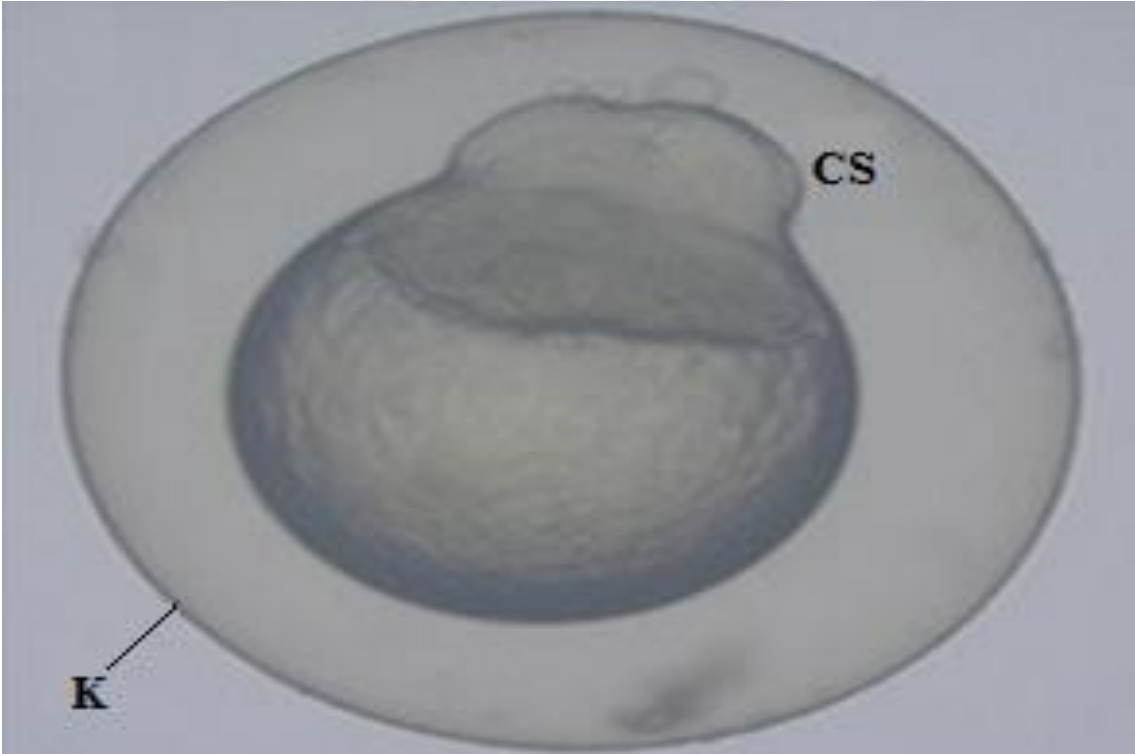
Resim 4.1. Döllenmiş yumurtaların petri kabındaki görünümü (orijinal resim)



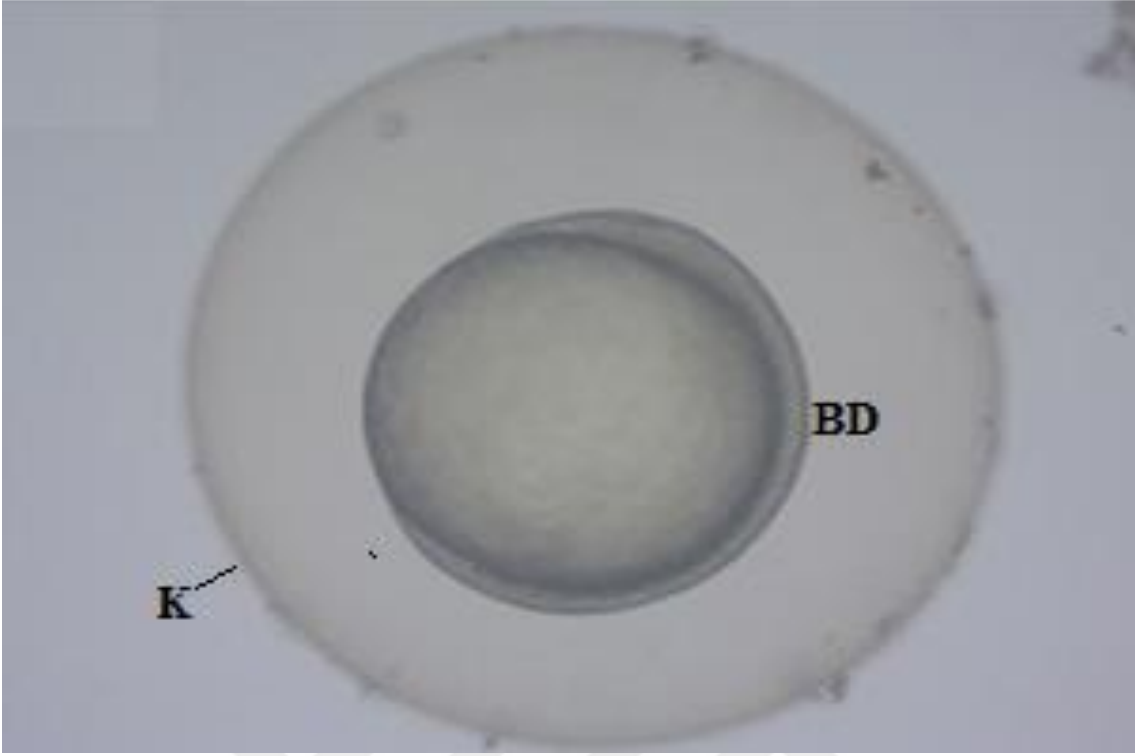
Resim 4.2. Döllenmiş yumurta hücresinin stereo mikroskop altındaki görüntüsü (5X Büyütme) (orijinal resim)



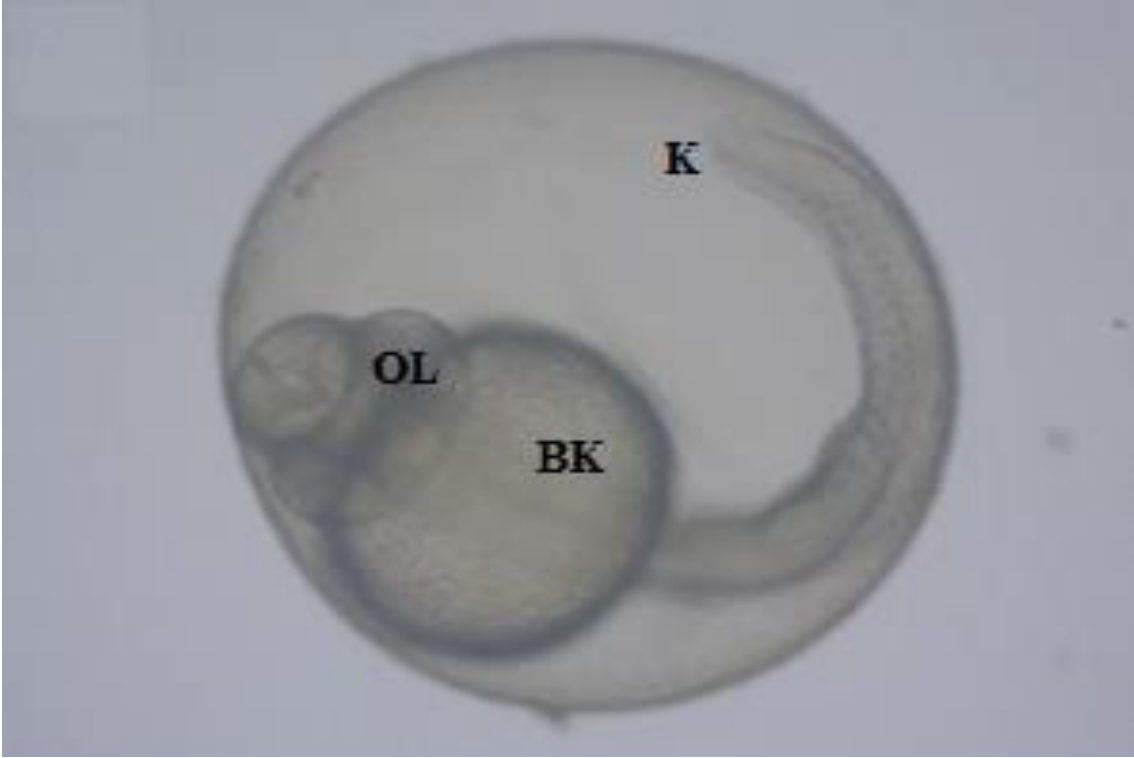
Resim 4.3. Zigot aşamasındaki embriyo. Z, Zigot (5X Büyütme) (orijinal resim)



Resim 4.4. Cleavage evresindeki embriyo. K, Koryon; CS, Cleavage stage (5X Büyütme) (orijinal resim)



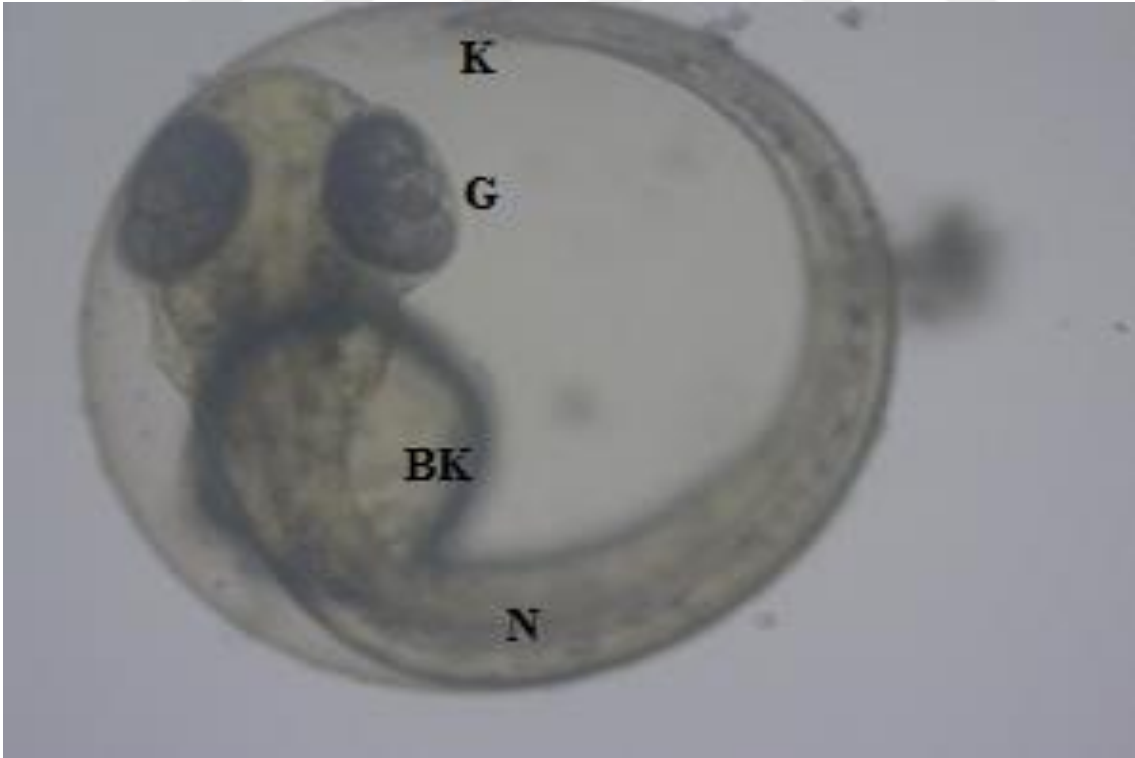
Resim 4.5. Blastodisk evresindeki embriyo. K, Koryon; BD, Blastodisk (5X Büyütme) (orijinal resim)



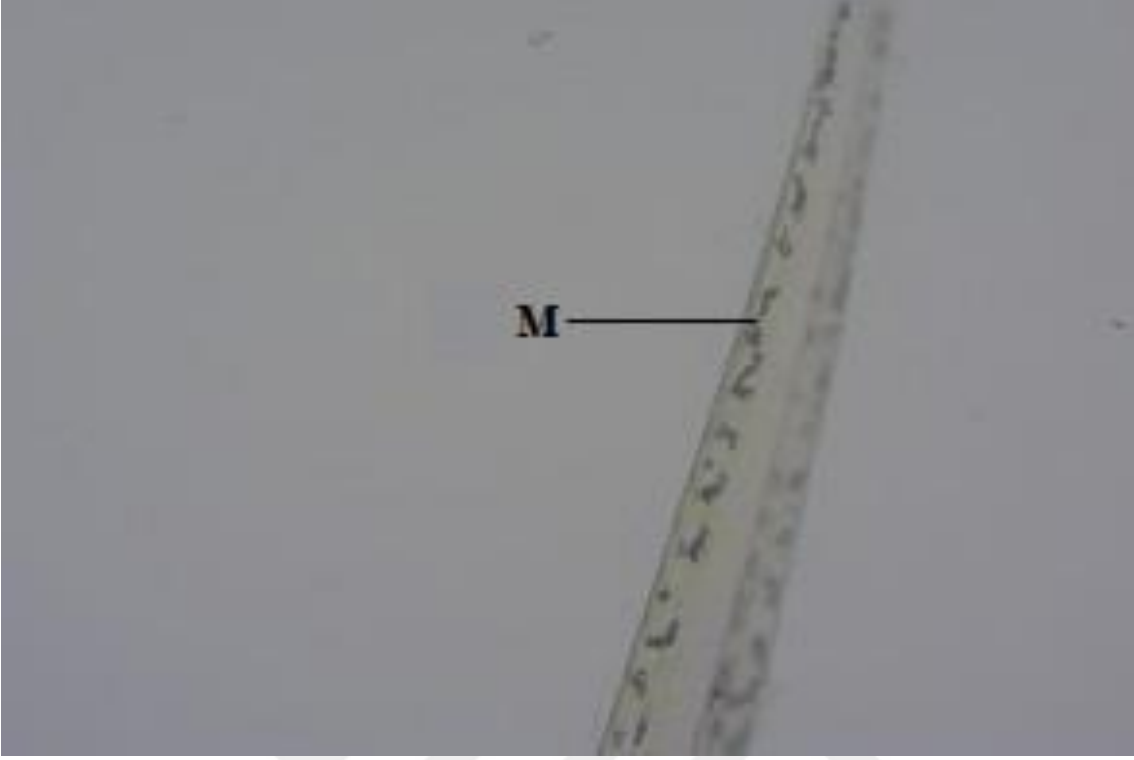
Resim 4.6. Gastrulasyon evresindeki embriyo. OL, Optik lens; BK, Besin kesesi; K, Kuyruk (5X Büyütme) (orijinal resim)



Resim 4.7. Segmentasyon evresinin başlangıcındaki embriyo. OL, Optik lens; OP, Otik pleakod; BK, Besin kesesi; N, Notokord (5X Büyütme)(orijinal resim)



Resim 4.8. Segmentasyon evresinin son zamanlarında ki embriyo. G, Göz; BK, Besin kesesi; N, Notokord; K, Kuyruk (5X Büyütme) (orijinal resim)



Resim 4.9. Faringula aşamasında bulunan embriyo. M, Melonosit (5X Büyütme) (orijinal resim)



Resim 4.10. İnkubasyon sürecini tamamlamış zebra balığı (*D. rerio*) (5X Büyütme) (orijinal resim)



## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Su Kalitesi Parametreleri

Çalışmamızda, kontrollü laboratuvar koşullarında kültüre alınan zebra balığı için en uygun su kalitesi parametrelerini belirlemek hayati önem taşımaktadır. Böylece hayatta kalma oranı maksimize edilerek balıklar hızlı büyür ve böylece sürekli olarak çok sayıda yüksek kalitede embriyo üretebilir. Lawrence (2007) ve Delomas ve Dabrowski (2018) yaptıkları bir çalışmada zebra balığının 6,7-41,7°C arasında önemli bir termal toleransa sahip olduğunu göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada zebra balığınının çoğaltılmasında gerekli olan sıcaklık  $28 \pm 1$  °C'de tutulmuştur. Düşük sıcaklıklarda çok verim alınamadığı bildirilmiştir. Delomas ve Dabrowski (2018b) literatürdeki önceki çalışmalara kıyasla, larva ve yavru zebra balıklarının 23 °C'de yeni bir yöntemle hızlı büyüdüklerini göstermişlerdir. Sıcaklık, pH ve çözülmüş oksijen seviyesi gibi parametrelerin zebra balığı yapay üretimi üzerinde derin etkileri vardır. Bu çalışmada optimum pH ve çözülmüş oksijen seviyesi sırasıyla 7,6 ve 6,86 mg/l' dir. Andrade ve diğ. (2017) zebra balığının embriyonun gelişimindeki oksijen ve pH tolerans sınırlarını araştırmıştır ve pH için 3,68 ve 10,21 aralığının dışı öldürücü konsantrasyonlar (LC50s; 96 saat) olduğunu belirlemişlerdir. Embriyonun sağ kalımı, 96 saat-LC50 0,42mg / L ile oksijen tükenmesine karşı nispeten dirençli görünmektedir. Bununla birlikte, 6mg / L ve altındaki konsantrasyon düzeylerinin ödem ve gelişimsel gerilemelere neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Sıcaklık en önemli parametrelerden biridir. Sıcaklık düşük olduğunda, erkeklerin ve dişilerin sağımı başarılı olmamıştır. Farklı balık türlerine ait yumurta hücresinin morfolojik yapısı birbiriyle benzerlik göstermektedir. Balık yumurtası; chorion adı verilen bir yumurta kılıfı ile çevrili olup, animal ve vejetatif kutup olmak üzere 2 parçaya ayrılır. Bunlar oogenez sırasında yumurta folikülünü çevreleyen zona radiata ile temas halindedir ve fertilizasyon sırasında perivitellin boşluğun oluşumunda önemli rol oynar. Balık yumurtasının yüzeyinde bulunan mikrofıl deliği vasıtasıyla sperm hücresinin yumurta hücresi içerisine girişi ile fertilizasyon gerçekleşir (Poleo, Denniston, Reggio, Godke ve Tiersch, 2001; Savaş, 2001). Zebra balığının yumurta hücresi 0,7-0,8 mm çapında olup büyük bir bölümü vejetatif kutuplu yumurta kesesinden oluşur (Kimmel ve diğ., 1995; Poleo ve diğ., 2001).

## 5.2. Zebra balığının (*D. rerio*) Yumurta Verimliliği ve Çapı

Tek bir yumurtlama zamanında üretilen yumurta sayısı ile toplu olarak elde edilen yumurta oranı bireyler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Yumurta sayısı 7 ile 110 arasında olup balıkların boyları ve ağırlıkları 3,34 ile 2,97 cm ve 0,38 ve 0,25 gr dır. Zebra balıkları 4 aylık iken yumurtlama işlemi gerçekleşmiştir. Yumurtalar yapışkan olmayıp şeffaftırlar. Eaton ve Farley (1974) yumurta verimliliği ve yumurta kalitesi üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Çalışma gruplarında, verimlilik oranını çift başına 60 yumurta olduğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise, verimlilik oranı daha yüksek olduğu görülmüştür. Eaton ve Farley'in çalışmalarındaki veriler yapay yumurtlatma verileri olmayıp doğal ortamdaki verileri içermektedir. Döllenen yumurtaların sayımı gerçekleştirilmiş, çalışmanın sonunda, tek bir yumurtlama zamanında üretilen yumurta sayısının bireyler arasında büyük farklılıklar gösterdiği rapor edilmiştir. Adu ve Thomseni (2007)'nin yaptıkları çalışmada elde ettikleri yumurta verimi çift başına 40 adettir. Mevcut çalışmada, bir çiftte 110 adet yumurta edilmiş, ve önceki çalışmalarda üretilen 40 adet yumurta üzerinde bir gelişme kaydedilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, yapay kültür durumu ve prosedürün uygun şekilde optimizasyonu ile biyomedikal araştırma için gerekli olan yumurta ve embriyo sayısının elde edilebildiğini göstermiştir.

Dölllenme aşamasından çıkış aşamasına kadar geçen süre,  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 4 gün olarak bulunmuştur. Yumurtaların ortalama çapı 405 ile 570  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir. Ortalama değer  $490 \pm 1,45 \mu\text{m}$  olarak hesaplandı. Dölllenme ve yumurtadaki çıkış oranının yüksek olması yumurtlamadaki başarıyı ortaya koymuştur. Çek, (1997) daha büyük yumurtalardan daha büyük yavru çıktığını bunların ve daha küçük olanlara göre hayatta kalma şansının daha yüksek olduğuna dikkat çekmiştir. Vücut uzunluğu ve vücut ağırlığı da büyük balıklardan daha büyük yumurtalar üretilebileceğini açıklayabilir. Ancak Bromage ve Cumarantunga (1987), küçük ve büyük yumurtalar eşit hayatta kalma şansına sahiptir. Bu çalışmada, yumurta sayısı, boy, vücut ağırlığı ve yumurta çapı arasında herhangi bir ilişki araştırılmamıştır. Bununla birlikte, hayatta kalmada daha büyük ve daha küçük yumurtalar arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir (Bromage ve Cumarantunga, 1988). Zebra balıklarında yumurta çapının ölçüldüğü bir literatüre rastlanmamıştır.

### 5.3. Cinsiyet Oranı

Bu tezde kaydedilen cinsiyet oranı beklenen (1:1) cinsiyet oranından farklı bulunmuştur. Zebra balığında cinsiyetlerin farklılaşmasını kontrol eden faktörler tam olarak belli değildir, fakat genetik, çevresel ve sosyal faktörlerin kontrolünde olabilir. Liew ve diğ., (2012) 'nin önerilerine göre cinsiyetler polygenik bir sistem ile kontrol edilmektedir. Çünkü yazarlar cinsiyetleri kontrol eden cinsiyet kromozomlarına rastlamamışlardır. Cinsiyetlerin zebra balığında farklılaşması ve oranında genetik faktörlerin etkili olduğu Kossack ve diğ., (2019) tarafından iddia edilmiştir. Wnt4 insanlarda dişi cinsiyet gelişimini desteklemekte ve erkek cinsiyetin oluşumunu önlemektedir. Zebra balıklarında Wnt4 fonksiyonları kaybolduğu için erkek cinsiyet baskın olarak ortaya çıkmaktadır (Kossack ve diğ., 2019).

Zebra balıklarında cinsiyetlerin farklılaşması ve oranı üzerine çevresel faktörlerin etkileri Abozaid ve diğ. (2011), Lawrence ve diğ. (2008) tarafından yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Abozaid ve diğ. (2011) sıcaklığın etkileri üzerine çalışmış ve yüksek sıcaklık derecelerinde erkek cinsiyetin dişi cinsiyetten önemli ölçüde farklı olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek sıcaklık derecelerinde daha fazla erkek cinsiyet görülmüştür. Yetersiz beslenmenin etkileri ise Lawrence ve diğ. (2008) tarafından araştırılmıştır. Yazarlar cinsiyetlerin farklılaşma döneminde yetersiz miktarda besin alan larvaların istatistiksel olarak önemli ölçüde erkek cinsiyet olarak geliştiğini ifade etmişlerdir (Lawrence ve diğ., 2008). Ancak, aynı yazarlar izleyen çalışmalarında deneme desenlerinde hiçbir farklılık yapmadan, denemelerini tekrarladıkları zaman, diğer bir ifade ile yayınlanmış olan başka bir makalelerinde, zebra balıklarının cinsiyetlerin farklılaştığı dönemde aldıkları yetersiz besin sonucunda erkek ve dişi cinsiyet arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Bu kez aynı yazarlar yetersiz beslenmenin cinsiyetler üzerinde etkili olmadığı sonucunu çıkarmışlardır (Lawrence ve diğ., 2012).

Cinsiyetlerin farklılaşması ve oranı üzerine sosyal faktörlerin etkileri Ribas ve diğ., (2017) tarafından araştırılmıştır. Yazarlar yüksek ve düşük stok yoğunluklarının etkilerini incelediklerinde, yüksek stok yoğunluğunda önemli ölçüde erkek cinsiyet kaydedilirken, düşük stok yoğunluğunda oldukça az sayıda erkek cinsiyet not etmişlerdir. Ancak yazarlar kontrollü laboratuvar koşullarında yaptıkları denemelerinin sonucunu, stok yoğunluğunun etkilerini ifade etmekten kaçınmış ve bir sonuç belirtmekten sakınmışlardır. Zebra balıklarında cinsiyeti kontrol eden mekanizmanın oldukça ayrıntılı incelenmesi gerektiğini önermişlerdir (Ribas ve diğ., 2017).

Bu tezde yüksek stoklama yoğunluğunda önemli ölçüde daha fazla erkek cinsiyet kaydedilmiştir. Su sıcaklığı bütün akvaryumlarda sabit ve 28 °C idi. Diğer su kalitesi parametreleri bütün akvaryumlarda aynı idi. Beslenme ise düzenli ve tüm akvaryumlarda at-libutum olarak yapılmıştır. Zebra balıklarında cinsiyet oranının daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini önermekle birlikte, bu tezin sonuçları Ribas ve diğ. (2017)'nin sonuçlarını desteklemektedir.

#### 5.4. Yumurta çapı ve boy ağırlık ilişkisi

Balık türlerine bağlı olarak yumurta çapı ve balık ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon var gibi görünmektedir. Bütün olarak incelendiğinde, iç su balıklarının yumurtaları deniz balıkları yumurta çapları ile kıyaslandığında daha büyük çaplıdır. İç su balıkları aynı zamanda daha az yumurta üretirler. Diğer yandan biyomedikal araştırmalarda denek olarak kullanılan zebra balıklarından ihtiyaç duyulan her anda çok sayıda yumurta elde etmek zor olabilmektedir. Bu durum bilim insanlarını çok sayıda anaç zebra balıklarını barındırmaya zorlamaktadır. Zebra balıkları asenkronize yumurtlama modeli göstermektedir ve her yumurtlama da az sayıda yumurta bırakmaktadır. Bu nedenle kontrollü laboratuvar koşullarında çok sayıda dişi anacı barındırmak elzemdir. Zebra balıkları her iki günde bir yumurta bırakmakta ve oldukça verimli bir balık türüdür. Ancak bazı özel çalışmalarda ve denemelerde, aynı anda çok yumurtaya ihtiyaç duyulabilmektedir. Bu tezde ortalama yumurta çapı  $490 \pm 1,45$  ve minimum yumurta çapı değeri  $405 \mu\text{m}$  maksimum ise  $570 \mu\text{m}$  olarak ölçülmüştür. Ek olarak yumurta çapı ve vücut ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Bu sonuçlar önemlidir çünkü büyük zebra balıkları, büyük çaplı yumurta üretebilirler. Çünkü büyük yumurtadan çıkacak olan larvalar, daha büyük boylu ve belki de küçük yumurtadan çıkan küçük boylu larvalara göre daha büyük yaşam oranına sahiptirler. Bromage ve Cumarantunga (1988), salmonlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda büyük çaplı yumurtadan çıkan larva ile küçük çaplı yumurtadan çıkan larva eğer uygun ilk yem temin edilebilir ise aynı yaşama şanslarına sahip olduklarını ifade etmişlerdir. Çek, (1997) küçük çaplı ve büyük çaplı yumurtaların açılma ve yaşama oranları arasında herhangi bir fark bulamamıştır. Bu tez de bir sonuca ulaşmak, çalışmanın sadece yumurta çapı ve vücut ağırlığı ile regresyonunu içerdiğinden dolayı mümkün olmamıştır. Ancak, çalışma oldukça küçük çaplı olan zebra yumurtalarından çıkan larvaların ilk yemleri mikroskobik canlı yem olması gerektiğini önermektedir.

### 5.5. *D. rerio*'daki Embriyogenezin Evreleri

7 adet embriyogenez periyodu açıkça tespit edilmiştir. Tüm dönemler 4 günde gerçekleşmiştir. Bu gelişim aşamaları kısaca yedi aşamaya ayrıldı. Yani: zigot, bölünme, blastula, gastrula, segmentasyon, pharyngula ve çıkış aşamaları. Embriyo gelişiminin evreleri, döllenmiş yumurtanın morfolojik özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin gözlemleri temelinde sınıflandırılmıştır. Bu aşamalar sırasında, değişiklikler Kimmel ve diğ., (1995); Sharmili ve Angelin, (2015) tarafından bildirilenlere benzerdi. Yukarıdaki çalışmalardan tek fark, inkübasyon süresinin 4 gün olduğu ile alakalıdır. Bu fark, bu çalışma ile önceki çalışmalar arasındaki sıcaklık farklılıklarına bağlanmıştır. Kimmel ve diğ., (1995) zebrafish'in embriyonik gelişim evrelerini incelemişlerdir. Çalışmaları kapsamlı ve ayrıntılı olarak tanımlanan gelişim evreleri daha yüksek sıcaklıklar daha kısa inkübasyon süresine neden olmuştur. Kuluçka süresinin süresi, zebrafish dahil çoğu teleost türünde su sıcaklığına bağlıdır, inkübasyon sıcaklığındaki değişiklikler hayattta kalmayı değiştirir, yavru fenotipini ve gelişme maliyetini azaltır (Mueller ve diğ., 2015). Malek, Sojadi, Abraham, Grundy ve Gerhard (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, sıcaklığın azaltılması ile zebra balığının ömrünün uzadığını gözlemlemişlerdir. Ancak, araştırmacılar sıcaklığın düşürülmesinin zebra balığının hayat döngüsünde olumsuzluklara sebep olabileceği konusunda tereddütlerinin olabileceğini ifade etmiştir. Yumurta kütleli miktarda yumurta sarısı içerir ve sadece küçük bir bölge yumurta sarısı içermez. Büyük yumurta sarısı hacmi hücre bölünmesini mikropile yakın küçük bir bölge hayvanı direğine sınırlar. Bu özellikler Kimmel ve diğ., 1995; Sharmili ve Angelin, 2015 ile benzerlik göstermiştir. Emtranslucent ve embriyonun optik berraklığı, tek tek hücrelerin doğrudan görselleşmesine ve gelişmekte olan embriyoda meydana gelen hücre hareketlerine izin vermiştir. Yapılan çalışmada, dölleme, yumurtlama başarısı ve kuluçka oranı oldukça yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar, yapay kültür durumu ve usulüne uygun optimizasyonu ile biyomedikal araştırma için gerekli olan yumurta ve embriyoların gerekli sayısının elde edilebileceğini göstermektedir. Embriyo yarı şeffaf ve optik berraklığı ve embriyoda meydana gelen hücre gelişim hareketleri görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Su kalitesi parametreleri özellikle su sıcaklığı zebra balığının yapay üretiminde önemli bir yere sahiptir. Bu tez de başarılı bir üretim için, su kalitesi parametrelerinden su sıcaklığı 28

$\pm 1$  °C derece, pH değeri 7,6 oksijen seviyesinin ise 6,4 olması önerilmiştir.

Zebra balıklarında ortalama yumurta çapı  $490 \pm 1,45$  olarak ölçülmüştür. Verimlilik birey başına 7 -110 yumurta arasında değişmektedir. Başka çalışmalar ile kıyaslandığında bu tez de tanımlanan yumurta ve sperm alma yöntemleri ile aynı yaşta olan daha fazla sayıda embriyo elde edilmiştir. Literatürde yapılan üretimin tamamına yakını, yumurtlatmayı ve sperm bırakımını teşvik amaçlı çakıl taşları, kapanlar ve bitkilerin kullanıldığı saptanmıştır. Dişi başına yumurta verimliliği hafta da 200-300 olarak belirtilmiştir. Yeni çalışmada dişi başına günlük yumurta sayısı oldukça değişken olmakla birlikte 110 adete kadar çıkabilmektedir. Tezin Materyal ve yöntem bölümünde tanımlanan teknikler uluslararası standart hale gelebilir böylece insan hastalıklarını araştırmak için denek olarak kullanılan zebra balıkları ile ilgili sonuçları kıyaslamak daha kolay olabilir. Aynı zamanda biyomedikal çalışmalar için eşzamanlı gamet elde edilebilir. Bu çalışma zebra balıkları üretimini tez de tanımlanan yapay üretiminin kullanılarak yapılmasını önermektedir. Bir bütün olarak düşünüldüğünde, zebra balıkları uygun yapay kültür koşulları ve prosedürün uygun optimizasyonu ile gerekli olan yumurta ve embriyo sayısının elde edilmesi ile biyomedikal araştırmalar yapılabileceği önerilmektedir.

Zebra balıklarında cinsiyet oranı beklenen 1E: 1D oranından önemli ölçüde farklı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Zebra balıklarında cinsiyetlerin farklılaşması ve oranı üzerindeki etkiler tam olarak belirlenebilmiş değildir. Yeni çalışmada yüksek stok yoğunluğunda önemli ölçüde erkek cinsiyet tespit edilirken düşük stok yoğunluğunda az sayıda erkek tespit edilmiştir. Diğer tüm çevresel faktörler tüm akvaryumlarda aynı olduğundan dolayı, bu tez stok yoğunluğu gibi sosyal çevre unsurlarının zebra balıklarının cinsiyeti üzerine etkili olabileceğini göstermiştir. Erkek ve dişi cinsiyeti arasındaki regresyon değeri 0,65 ( $R^2 = 0.6495$ ) olarak kaydedilmiştir. Bu değer zebra balıklarında cinsiyetin erkekler lehine olduğunu ve stok yoğunluğunun bu sonuca etki ettiğine dair güçlü bir kanıt niteliğindedir (Şekil 4.1).

Zebra balıklarında yumurta çapı  $405 \mu\text{m}$  ile  $570 \mu\text{m}$  arasında değişmekle birlikte ortalama  $490 \pm 1,45$  olarak kaydedilmiştir. Dişi vücut ağırlıkları ise 0,228 g ile 1,022 g arasında ve ortalama 0,625 olarak ölçülmüştür. Yumurta çapı ve dişi zebra balıklarının vücut ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon vardır ( $R^2 = 0.785$ ). Bu sonuç, büyük boylu zebra balıklarının büyük çaplı yumurta üretebileceğini önermektedir.

Zebra balıklarında embriyo gelişimi 7 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; zigot, bölünme, blastula, gastrula, segmentasyon, pharyngula ve çıkış aşamalarıdır. Sonuç olarak vurgulanması gereken ilk husus, laboratuvar çalışmaları ve özellikle de embriyonik araştırmalarda kullanılmak için *D. rerio*' nun çok uygun bir tür olduğudur. İkinci olarak; sunulan bulguların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesinden de anlaşılacağı üzere, embriyolojik gelişim aşamaları çok farklı araştırmalara konu olacak kadar geniş kapsamlıdır. Temel ve yapısal verileri belli ölçüde ortaya koymaya yönelik olarak gerçekleştirilen bu araştırma, ince yapı araştırmaları ve biyokimyasal çalışmalarla genişletildiği ölçüde, embriyonik gelişim sürecine dair daha ayrıntılı bilgiler elde edilecektir. Zebra balığı yüksek üreme potansiyeline sahip olması, yumurtaların şeffaf olması, embriyo gelişiminin dışı vücudunun dışında ve hızlı olması ve birçok insan hastalığı ve gelişimi genlerinin çok benzerinin zebra balığının genlerinde bulunması gibi ideal nedenlerle pek çok genetik ve deneysel araştırmada omurgalı model organizma olarak tercih edilmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abozaid, H., Wessels, S., and Hörstgen-Schwark, G. (2011). Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development*, 5(5), 259-265
- Adu, R. O. and Thomsen, J. P. (2011). Improving Production of Zebra Fish Embryos in the Lab. *Journal of Environmental Protection*, 2, 1360-1363.
- Amsterdam, A. and Hopkins, N. (2006). Mutagenesis Strategies in Zebrafish for Identifying Genes Involved in Development and Disease, *Trends in Genetics*, 22,473-478.
- Andrade, T. S., Henriques, J. F., Almeida, A. R., Soares, A. M., Scholz, S., and Domingues, I. (2017). Zebrafish embryo tolerance to environmental stress factors—Concentration–dose response analysis of oxygen limitation, pH, and UV-light irradiation. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(3), 682-690.
- Brand, M., Granato, M, Nusslein-Volhard, C. 2002. ‘‘Keeping and Raising Zebrafish ’’. In: Zebrafish: A Practical Approach, Nusslein- Volhard C, Dahm R, (eds.). Oxford: Oxford University Press, p: 7-37.
- Bromage, N.R. and Cumaranatunga PRT. (1988). Egg production in rainbow trout. In: Muhir JF, Roberts RJ editors. Recent Advances in Aquaculture. London Croom Helm. Savard.;65-138.
- Brundo, M. V., and Salvaggio, A. (2018). Zebrafish or *Danio rerio*: A New Model in Nanotoxicology Study. Recent Advances in Zebrafish Researches. doi:10.5772/intechopen.74834
- Carfagnini, A. G., Rodd, F. H., Jeffers, K. B., and Bruce, A. E. (2009). The effects of habitat complexity on aggression and fecundity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental biology of fishes*, 86(3), 403-409.
- Carpio, Y. and Estrada, M.P. (2006). Zebrafish as a Genetic Model Organism. *Biotecnology*., 23, 4.
- Chávez, M. N., Aedo, G., Fierro, F. A., Allende, M. L. and Egaña, J. T. (2016). Zebrafish as an Emerging Model Organism to Study Angiogenesis in Development and Regeneration. *Frontiers in Physiology*, 7, 56.
- Cooper, C.D. (2017). Insights from Zebrafish on Human Pigment Cell Disease and Treatment. *Developmental Dynamics*, 246(11), 889-896.
- Çek, Ş. (1997). The reproductive biology of the rosy barb (*Puntius conchonius*): Sex differentiation, gametogenesis and fecundity (Master of Science thesis). Stirling University. *Department of Aquaculture Fish Physiology and Reproduction*. Pp: 216.
- Çek, Ş. and Aydın, F. (2016) .The Spotted Gar (*Lepisosteus oculatus*, Winchell 1864) as a Model Species for Biomedical Studies.



- Çek, Ş. Shang, M., Perera, D.A., Su, B., and Dunham, R.A. (2016). Fish stem cells: Classification, Resources, Characteristics and Application Areas. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries*. 2(2), 107-119.
- Dabrowski, K., and Miller, M. (2018). Contested paradigm in raising zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 15(3), 295-309.
- Darrow, K. O., and Harris, W. A. (2004). Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, 1(1), 40-45.
- Davis, D. J., Bryda, E. C., Gillespie, C. H. and Ericsson, A. C. (2016 a). 16S rRNA amplicon sequencing dataset for conventionalized and conventionally raised zebrafish larvae. *Data in brief*, 8, 938-943.
- Davis, D. J., Bryda, E. C., Gillespie, C. H., and Ericsson, A. C. (2016 b). Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*, 311, 219–227. doi:10.1016/j.bbr.2016.05.040
- Dede, K. and Çek-Yalınz, S. (2018). Artificial Reproduction of Zebrafish *Danio rerio* Under Controlled Laboratory Condition. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*. 2(1); 1-8.
- Delomas, T and Dabrowski, K. (2018a). Why are Triploid Zebrafish all Male Model. *Reproduction and Development*. 85, 612–621.
- Delomas, T. A. and Dabrowski, K. (2018b). Larval rearing of zebrafish at suboptimal temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 74, 170-173.
- Din, 2002. Basisvalidierung genormter Verfahren zur wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung- Validierungsdokument (38415- T6), p. 27.
- Eaton, R. C. and Farley, R. D. (1974). Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, 277 *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia*, 1, 195-204.
- Ekici, A. (2007). Döllenmiş zebra balığı (*Danio rerio*) Yumurtalarına Gen (Gfp) Transferi Üzerinde Bir Araştırma. (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Feitsma, H. and Cuppen, E. (2008). Zebrafish as a Cancer Model. *The American Association for Cancer Research. Molecular Cancer Research*, 6, 685-694.
- Gasch, A.P., Payseur, B. A. and Pool, J. E. (2016). The power of Natural Variation for Model Organism Biology. *Trends in Genetics*. Cell Press, doi.org./10.1016/j.tig.2015.12.003
- Gaulke, C. A., Barton, C. L., Proffitt, S., Tanguay, R. L. and Sharpton, T. J. (2016). Triclosan exposure is associated with rapid restructuring of the microbiome in adult zebrafish. *PLoS One*, 11(5), e0154632.
- Hekimoğlu, M.A. (2009). Akvaryum teknolojisi, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yayınları, 78, 38 ,176-177.
- Hisaoka ,K.K., Battle, H.I. (1958). The Normal Developmental Stages of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Journal of Morphology*, 102, 311–328.

- Hofsten, J., and Olsson, P. E. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 63.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498.
- Karaçuha, A. ve Aral, O. (2008). Canlı Yem Katkılı Besinlerin Anaç Lepistes (*Poecilia reticulata* Peters, 1859) Balıklarının Büyüme ve Üreme Verimliliği Üzerine Etkileri, *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 25(2), 123–129.
- Karga, J.; Mandal, S.C. (2016). Effect of different feeds on the growth, survival and reproductive performance of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Aquac. Nutr*, 23, 406–413.
- Kayhan, F., Kaymak, G., Duruel, H. E. E., and Kızılkaya, Ş. T. (2018). Biyolojik Araştırmalarda Zebra Balığının (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Kullanılması ve Önemi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 38-45.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics*, 203, 253-310.
- Kossack, M. E., High, S. K., Hopton, R. E., Yan, Y. L., Postlethwait, J. H. and Draper, B. W. (2019). Female Sex Development and Reproductive Duct Formation Depend on Wnt4a in Zebrafish. *Genetics*, 211(1), 219-233.
- Kucharczyk, D., Stępień, P., Nowosad, J., Kupren, K., Targońska, K., and Kujawa, R. (2018). The Optimization of Wide-Type Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Reproduction in Low Temperatures under Controlled Conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 49-55.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 1-20.
- Lawrence, C., Ebersole, J. P., and Kesseli, R. V. (2008). Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fishes*, 81(2), 239-246.
- Lee, C. J., Tyler, C. R., and Paull, G. C. (2018). Can simple tank changes benefit the welfare of laboratory zebrafish *Danio rerio*?. *Journal of fish biology*, 92(3), 653-659.
- Lele, Z., Engel, S. and Krone, P. H. (1996; submitted) Stress Specific Differences in the Expression of Heat Shock Genes in Zebrafish Embryos Following Exposure to Heat Shock or Ethanol.
- Liang, Y. Q., Huang, G. Y., Liu, S. S., Zhao, J. L., Yang, Y. Y., Chen, X. W., ... Ying, G. G. (2015). Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 160, 172-179.
- Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., and Orban, L. (2012). Polygenic sex determination system in zebrafish. *PloS one*, 7(4), e34397.

- Liu, S. and Leach, S. D. (2011). Zebrafish models for cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6,71–93.
- Lewis, L. and Kwong, R.W. M. (2018). Zebrafish as a Model System for Investigating the Compensatory Regulation of Ionic Balance During Metabolic Acidosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1087. doi:10.3390/ijms19041087
- Malek, R. L., Sojadi, H., Abraham, J., Grundy, M. A. and Gerhard, G. S., (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 363-373.
- Meyers, J. R. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19.
- Mills D. 1986. You and your aquarium. Alfred A. Knopf, Inc. Toronto, Canada. 75 p.
- Moon Y.S., Jeon, H. J., Nam, T.H., Choi, S.D., Park, B.J., Ok, Y.S. and Lee, S. E. (2016). Acute toxicity and gene responses induced by endosulfan in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 28 (1),103-109.
- Mueller, C. A., Eme, J., Manzon, R. G., Somers, C. M., Boreham, D. R. and Wilson, J. Y. (2015). Embryonic critical windows: changes in incubation temperature alter survival, hatchling phenotype, and cost of development in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Journal of Comparative Physiology B*, 185, 315–331.
- Perathoner, S., Cordero-Maldonado, M. L. and Crawford, A. D. (2016). Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior. *Journal of neuroscience research*, 94,445–462.
- Poleo, G. A., Denniston, R.S., Reggio, B.C., Godke, R.A. and Tiersch, T.R. (2001) *Fertilization of Eggs of Zebrafish, Danio rerio, by Intracytoplasmic Sperm Injection, Biology of Reproduction*, 65, 961–966.
- Ribas, L., Valdivieso, A., Díaz, N., & Piferrer, F. (2017). Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. *Journal of Experimental Biology*, 220(6), 1056-1064.
- Roper, C., and Tanguay, R. L. (2018). Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology. In *Handbook of Developmental Neurotoxicology* (pp. 143-151). Academic press.
- Savaş, E. (2001). Diskus balıklarında (*Symphysodon spp.*) larval gelişim ve gelişme üzerine etkili faktörler, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Selman, K., R. A. Wallace and Qi. X. S., (1993). Stages of Oocyte Development in the Z Zebrafish, *Brachy danio rerio*. *Journal of Morphology*., 218: 203- 224.
- Shan, Y., Zhang, Y., Zhuo, X., Li, X., Peng, J. and Fang W. (2016). Matrix Metalloproteinase-9 Plays a Role in Protecting Zebrafish from Lethal Infection with *Listeria Monocytogenes* by Enhancing Macrophage Migration. *Fish and shellfish immunology*, 54, 79–187.

- Sharma, P. and Patino, R. (2013). Regulation of Gonadal Sex Ratios and Pubertal Development by The Thyroid Endocrine System in Zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative Endocrinology*, 184, 111-119.
- Sharmili, S. V. and Angelin, J. A. (2015). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 6(3), 6-11.
- Shi, W., Fang, Z., Li, L. and Luo, L. (2015). Using Zebrafish as the Model Organism to Understand 248 Organ Regeneration. *Science China Life Sciences*, 58, 343-51 (Review).
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., and Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), 13-34.
- Staal, F. J. T., Spaink, H. P. and Fibbe, W. E. (2016). Visualizing Human Hematopoietic Stem Cell Trafficking *In vivo* Using a Zebrafish Xenograft Model. *Stem cells and development*, 25(4), 360-365.
- Stern, H. M., and Zon, L. I. (2003). Cancer Genetics and Drug Discovery in the Zebrafish. *Nature Reviews Cancer*, 3(7), 533–539. doi:10.1038/nrc1126
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Krauber, D. and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish, *Nature*, 291, 293.
- Svensson, J., Mustafa, A., Fick, J., Schmitz, M., and Brunström, B. (2016). Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 177, 316-323.
- Tsang, B., Zahid, H., Ansari, R., Lee, R. C.-Y., Partap, A., and Gerlai, R. (2017). Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization. *Zebrafish*, 14(6), 561–573. doi:10.1089/zeb.2017.1477.
- Ulloa, P. E., Peña, A. A., Lizama, C. D., Araneda, C., Iturra, P., Neira, R., ... Medrano, J. F. (2013). Growth Response and Expression of Muscle Growth-Related Candidate Genes in Adult Zebrafish Fed Plant and Fishmeal Protein-Based Diets. *Zebrafish*, 10(1), 99-109.
- Warga, R.M. and Kimmel, C.B. (1990). Cell Movements During Epiboly and Gastrulation in Zebrafish. *Development* 108: 569–580.
- Westerfield, M. (1995). *The Zebra Fish Book: A Guide for the Laboratory use of Zebrafish (Danio rerio)*, University of Oregon Pres, Eugene.
- Westerfield, M. (2000). *The Zebra Fish Book: a Guide for the Laboratory use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4 th Edition, University of Oregon Pres, Eugene.
- Wixon, J. (2000). Featured Organism: *Danio rerio*, the Zebrafish. *Yeast*, 17, 225–221.
- Wolenski, J.S. and Hart, N.H. (1987). Scanning Electron Microscope Studies of Sperm Incorporation into the Zebrafish (*Brachydanio*) Egg, *Journal Experimental Zoology*, 243, 259.

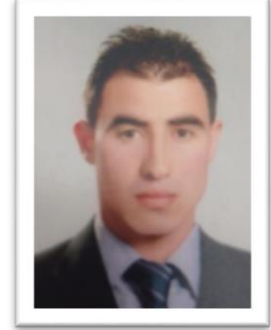
- Ye, D., Zhu, L., Zhang, Q., Xiong, F., Wang, H., Wang, X., ... Sun, Y. (2019). Abundance of Early Embryonic Primordial Germ Cell Promotes Zebrafish Female Differentiation as Revealed by Lifetime Labelling of Germline. *Marine Biotechnology*, 21, 217-228.
- Zhu, X., Chen, Z., Zeng, C., Wang, L., Xu, F., Hou, Q. and Liu, Z. (2016). Ultrastructural Characterization of the Pronephric Glomerulus Development in Zebrafish. *Journal of morphology*, 277:1104–1112.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : DEDE, Kemal  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 15.06.1977, Torul  
 Medeni hali : Evli  
 Telefon : 0 530 661 52 29  
 Faks : 0 (326) 614 18 77  
 e-mail : kemaldede61@gmail.com



### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	İskenderun Teknik Üniversitesi / Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü / Su Ürünleri Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi	2003
Lise	Trabzon Lisesi	1997

### İş Deneyimi

2006- 2008 yılları arasında Antakya Milli eğitim Müdürlüğünün görevlendirdiği orta okul ve liselerde İngilizce öğretmeni olarak görev yaptım.

2009 -2018 yılları arasında Kırıkhan ilçesinde Milli eğitim Müdürlüğünün görevlendirdiği orta okul ve liselerde İngilizce öğretmeni olarak görev yaptım.

2018 ve 2019 yılları arasında UNICEF 'de proje yöneticisi olarak çalıştım.

### Yabancı Dil

İngilizce B2- B1

### **Yayınlar ve Sempozyum Bildirileri**

- Dede, K. ve Çek – Yalnız, Ş. (2019). Sex Ratio, Egg Diameter and Relation to Body Parameters of Zebrafish, (*Danio rerio*) Cultured Under Laboratory Conditions. 6<sup>Th</sup> International Multidisciplinary Studies Congress, Gaziantep, Turkey.Pp:99-104. ISBN 978-605-7602-49-7
- Dede, K. ve Çek – Yalnız, Ş. (2018). Artificial Reproduction of Zebrafish *Dania rerio* Under Controlled Laboratory Condition, 4<sup>Th</sup> International Agriculture Congress, Nevşehir, Turkey.
- Dede, K. ve Çek – Yalnız, Ş. (2018). Artificial Reproduction of Zebrafish *Dania rerio* Under Controlled Laboratory Condition, *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 2(1): 1-8, doi: 10.9734/AJFAR/2018/44786. ISSN: 2582-3760.
- Çek – Yalnız, Ş., Dede, K. ve Turan, F. (2018). Biology of the Zebrafish *Dania rerio*: A Review. 4<sup>Th</sup> International Agriculture Congress, Nevşehir, Turkey

## DİZİN

**A**

abdomen · 16  
 Akvaryum · 2, 20, 36  
 Anaç · viii, 12, 14, 37  
 anestezi · viii, 14, 15, 17  
 Anestezi · viii, 14, 16  
 artemia · 4, 11  
*Artemia salina* · viii, 13  
 asenkronize · 7, 31  
 at-libutum · 13, 31

**B**

Besin · viii, ix, 25, 26  
 bitki · 5  
 blastula · i, ii, 7, 21, 32, 34  
 büyük çaplı yumurta · 31, 33  
 büyüme oranları · 5

**C**

Canlı yemler · 5  
 cinsiyet · i, vi, vii, 3, 6, 7, 17, 18,  
 19, 20, 30, 31, 33  
 cinsiyet oranı · i, 3, 6, 7, 17, 18,  
 20, 30, 33

**Ç**

çıkış · i, 21, 29, 32, 34  
 çiftleştirme · 12

**D**

*D. rerio* · v, vi, viii, 2, 6, 10, 18,  
 20, 21, 22, 27, 29, 32, 34  
 dafniya · 11  
 damızlık · 11  
 davranış · 1  
 dişi · i, vii, viii, 4, 5, 7, 9, 11, 14,  
 15, 16, 18, 19, 20, 21, 30, 31,  
 33, 34  
 Dişi · iv, vii, viii, 14, 15, 16, 20,  
 21, 33  
 dorsal · 22

**E**

embriyo · viii, 2, 7, 8, 9, 24, 25,  
 26, 27, 28, 29, 33, 34  
 embriyogenez · i, 21, 32

embriyonik · 7, 17, 22, 32, 34  
 erkek · i, vii, viii, 3, 6, 11, 12, 14,  
 15, 16, 20, 21, 30, 31, 33  
 Erkek · iv, viii, 15, 16, 17, 18, 19,  
 20, 33  
 evre · 7, 8

**F**

faringula · 7

**G**

gastrula · i, ii, 7, 8, 21, 32, 34  
 gelişim aşamaları · 21, 32, 34  
 genetik · 1, 8, 30, 34

**H**

hormon · 6

**İ**

İnkubasyon · viii, 27  
 inkübe · 13, 14  
 insan hastalığı · 34  
 İskenderun · 4  
 istatistiksel · 2, 20, 30

**K**

kanser · 1  
 kinaldin · viii, 14  
 Kinaldin · viii, 15  
 konsantrasyon · 28  
 Kontrollü · 5  
 kuluçka · 7, 32

**L**

Laboratuvar · 2  
 larval · 7, 8, 38

**M**

mikroskop · viii, 1, 13, 14, 18, 23  
 morfolojik · viii, 9, 15, 17, 21,  
 28, 32

**O**

Oksijenmetre · viii, 12  
 organizma · i, 1, 8, 9, 34

**P**

pharyngula · ii, 21, 32, 34  
 pipet · 16, 17

**S**

Sağım · i, 17  
 segmentasyon · i, 7, 21, 32, 34  
 Sperm · 16, 38, 39  
 stoklama · 19, 21, 31  
 su kalitesi · vi, 19, 28, 31, 32  
 Su kalitesi · 32  
 Su sıcaklığı · 31

**T**

toksisite · 2

**Ü**

üreme kanalı · 7  
 Üreme mevsimi · 6

**Y**

yapay · i, 2, 3, 5, 6, 14, 16, 28,  
 29, 32, 33  
 yumurta · i, iv, vii, viii, 2, 3, 4, 5,  
 6, 8, 14, 16, 19, 21, 22, 23, 28,  
 29, 31, 32, 33  
 Yumurta çapı · i, v, 21, 31, 33  
 yüzgeçler · 8

**Z**

zebra · i, vi, viii, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,  
 8, 9, 11, 13, 14, 20, 21, 27, 28,  
 30, 31, 32, 33, 34, 36, 39  
 Zebra · i, iv, v, viii, 1, 2, 3, 4, 5,  
 6, 7, 8, 10, 15, 19, 28, 29, 30,  
 31, 33, 34, 35, 37, 39  
 zigot · i, 7, 21, 32, 34





**TEKNOVERSİTE**



teknoversite

**İSTE**

