

**FARKLI STOK YOĞUNLUKLARININ GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) KAS DOKUSU
AKTİN&MİYOSİN mRNA SEVİYESİ VE BAZI
BÜYÜME PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

İbrahim GECİLİ

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. A. Necdet SİRKECİOĞLU**

2014

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI STOK YOĞUNLUKLARININ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhynchus mykiss*) KAS DOKUSU AKTİN&MİYOSİN mRNA
SEVİYESİ VE BAZI BÜYÜME PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ

İbrahim GECİLİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

FARKLI STOK YOĞUNLUKLARININ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhynchus mykiss*) KAS DOKUSU AKTİN&MİYOSİN mRNA SEVİYESİ VE
BAZI BÜYÜME PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU danışmanlığında, İbrahim GECİLİ tarafından hazırlanan bu çalışma 10/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı-Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mevlüt KARAOĞLU


İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Necdet SİRKECİOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 28/08/2014 tarih ve 39/1083 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI STOK YOĞUNLUKLARININ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) KAS DOKUSU AKTİN&MİYOSİN mRNA SEVİYESİ VE BAZI BÜYÜME PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

İbrahim GECİLİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU

Bu çalışmada farklı stok yoğunluklarının (15, 20, 25, 30, ve 35 kg/m³) gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansları ve iskelet kası α -aktin ve β miyosin ağır zincir mRNA ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yapılan ölçümler sonucunda en iyi deneme sonu ağırlık kazancı (SA), spesifik büyüme oranı (SBO) ve yem değerlendirme oranı (YDO) S2 stoğunda olduğu, bu bakımdan kanallarda gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği için 20 kg/m³'lük yoğunluğun en ideal yoğunluk olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca yapılan analizler sonucunda kanal sistemlerinde farklı stok yoğunluklarında yetiştirilmelerinin balıkların ağırlık kazançları ile iskelet kası proteinleri olan aktin ve ağır zincir miyosin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerine etki etmediği belirlenmiştir.

2014, 47 sayfa

Anahtar Kelimeler: Miyofibriler proteinler, aktin, ağır zincir miyosin, mRNA ekspresyonu, gökkuşığı alabalığı, stok yoğunluğu.

ABSTRACT

MASTER THESIS

THE EFFECTS OF DIFFERENT STOCKING DENSITY ON ACTIN&MYOSIN mRNA LEVELS AND INVESTIGATION OF SOME GROWTH PARAMETERS IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

İbrahim GECİLİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology
Animal Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. A. Necdet SİRKECİOĞLU

In this study, the effects of different stocking density (15, 20, 25, 30, 35 kg/m³) on mRNA levels of α -actin and β myosin heavy chain genes of skeletal muscle and growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were studied.

The highest weight gain, specific growth rate and feed conversion ratio at the end of the trial was found at the 20 kg/m³ stocking density that means this density is suitable for rainbow trout production in channels.

The other results of this study are that no effects of different stocking density on mRNA levels of actin and β myosin heavy chain which are proteins of skeletal muscle and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

2014, 47 pages

Key Words: Myofibrillar proteins, actin, heavy chain myosin, mRNA level, rainbow trout, different stocking density.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın hazırlanması ve yürütülmesinde değerli bilgileri ve önerileri ile beni yönlendirerek destek olan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU'na teşekkür ederim.

Öğrenim gördüğüm süreçte ve çalışmalarım sırasında desteğini her zaman gördüğüm kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL'a teşekkürlerimi arz ederim.

Laboratuvar ve tez çalışmalarımında desteklerini esirgemeyen Sayın Sait ÇIRAK'a, Sayın Onur VURAL'a, Sayın Osman Tolga ÖZEL'e, Sayın İsmail BAYIR'a, Sayın Semra ÇİÇEK'e, Sayın Elif BASTEM'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bilimsel tecrübelerinden her zaman faydalandığım, saygıdeğer hocalarım Sayın Doç. Dr. Recep AYDIN'a, Sayın Doç. Dr. Ünsal DOĞRU'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap BAYIR'a ve desteklerini her zaman gördüğüm Sayın Prof. Dr. Ahmet DODOLOĞLU'na ve Prof. Dr. Mevlüt ARAS'a ve Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim HALİLOĞLU'na saygılar sunuyorum.

İnsani ve ahlaki değerlerinin yanında mütevazı kişiliği ile her zaman örnek aldığım, eşine nadir rastlanan şahsiyetlerden olan pek muhterem hocam Sayın Prof. Dr. Mevlüt KARAOĞLU'na, tanımakla onur duyduğum, sevecenliği ve yardımseverliği ile bizleri bağrına basan, mümtaz şahsiyet sahibi çok kıymetli dekanımız Sayın Prof. Dr. Muhlis MACİT'e saygılarımı arz ediyorum.

Koşulsuz sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan annem, babam ve kardeşlerime teşekkürlerimi arz ederim.

İbrahim GECİLİ

Temmuz 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Balıklarda Kas Sistemi	1
1.2. Stresin Kas ve Metabolizma Üzerindeki Etkileri	8
1.3. Araştırmanın Hedefleri.....	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Araştırma yeri ve süresi.....	16
3.1.2. Balık materyali	16
3.1.3. Su materyali.....	16
3.2. Metot	17
3.2.1. Deneme düzeni	17
3.2.2. Balıkların bakımı ve beslenmesi	17
3.2.3. Balıklardan doku örneklerinin alınması	18
3.2.4. Total RNA izolasyonu.....	18
3.2.5. RNA'nın kalitatif tayini.....	21
3.2.6. Taqman Prob ve primer dizaynı	23
3.2.7. RT-PCR ile cDNA sentezi	25
3.2.8. Real time PCR uygulamaları.....	26
3.2.9. Gen ekspresyonu hesaplamaları	28
3.2.10. İstatistik analizler	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. Balıkların Yaşama Oranı Değerleri ve Bazı Büyüme Parametreleri.....	29

4.2. Bireysel Ortalama Canlı Ağırlık Miktarları	29
4.3. Oransal Büyüme	30
4.4. Spesifik Büyüme	31
4.5. Yem Değerlendirme	32
4.6. Balıkların Kas Dokularından Elde Edilen RNA'lara Ait Elektroforez Görüntüleri, Konsantrasyon Değerleri, 260/280 Oranları.....	33
4.7. RNA Elektroforezi	35
4.8. Real Time PCR Analizleri Sonucu Elde Edilen Amplifikasyon ve Standart Eğri İle Primer Etkinlik Oranı	36
4.9. Balıkların Kas Dokusundan Elde Edilen Aktin mRNA Seviyesi.....	38
4.10. Balıkların Kas Dokusundan Elde Edilen Miyosin mRNA Seviyesi	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
5.1. Balık Ağırlıkları, Bazı Büyüme Parametreleri	40
5.2. Yem Değerlendirme Oranı	41
5.2. Balıkların Kas Dokusundan Elde Edilen Aktin ve Ağır Zincir Miyosin mRNA Seviyesi.....	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin Difosfat
AMP	Adenozin Monofosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
Dak	Dakika
ddH ₂ O	Deiyonize Distile Su
DEPC	Dietil Pirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
°C	Santigrat Derece
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EF-1	Elengasyon Faktör
GH	Büyüme Hormonu
GH-I	Büyüme Hormonu Tip 1
gr	Gram
HSP 70	Isı Şok Proteini
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Tip 1
kDa	Kilodalton
lt	Litre
mg	Miligram
MHC	Miyosin Ağır Zinciri
MOPS	Morpholinopropanesulfonik asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
MSP	Kas Spesifik Proteinleri
MYH	Miyosin Ağır Zinciri
ng	Nanogram
NMHC	Esansiyel Miyosin Hafif Zinciri
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit

rpm	1 Dakikadaki Rotor Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	Standart Sapma
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn	Saniye
TM	Tropomiyosin
TN	Troponin
V	Volt
\bar{X}	Aritmetik Ortalama
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Balıklarda kasların genel görünümü.....	2
Şekil 1.2. Kas lifi hücre zarı.....	3
Şekil 1.3. İskelet kasında kas fibrili ve miyofibrilin görünümü	4
Şekil 1.4. Sarkomeri meydana getiren kontraktıl proteinler	5
Şekil 1.5. Kas yapısını oluşturan birimlerin genel görünümü	6
Şekil 1.6. Miyofibriler Proteinler.....	7
Şekil 1.7. Ca ⁺⁺ molekülü ve kasın aktif birimleri	8
Şekil 3.1. Araştırmanın yürütüldüğü deneme ünitesi	17
Şekil 3.2. Araştırmada kullanılan otomatik nükleik asit izolasyon robotu	19
Şekil 3.3. Dokuların parçalanmasında kullanılan parçalayıcı.....	20
Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan nanodrop spektrofotometre	20
Şekil 3.5. Araştırmada kullanılan görüntüleme cihazı.....	21
Şekil 3.6. cDNA kütüphanesi oluşturmada kullanılan PCR.	26
Şekil 3.7. Real time PCR	27
Şekil 3.8. Real time PCR protokolü.....	28
Şekil 4.1. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) deneme sonu bireysel ortalama canlı ağırlık miktarları (gr).	30
Şekil 4.2. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) deneme sonu oransal büyüme yüzde değerleri. ...	31
Şekil 4.3. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) deneme sonu spesifik büyüme (%) değerleri.....	32
Şekil 4.4. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) deneme sonundaki yem değerlendirme oranları (%).....	33
Şekil 4.5. RNA'nın kantitatif tayini.....	36
Şekil 4.6. Gen örneklerinin RT-PCR uygulaması ile elde edilen amplifikasyon görüntüsü	37

Şekil 4.7. Gen örneklerinin RT-PCR uygulaması ile elde edilen standart eğrisi, primer etkinlik oranları ve amplifikasyon görüntüsü.....	37
Şekil 4.8. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşığı alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) aktin mRNA seviyesi.....	38
Şekil 4.9. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşığı alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) miyosin mRNA seviyesi.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ve Gökkuşuğu alabalığı için hazırlanan primer ve propların baz dizilimleri	24
Çizelge 3.2. Real time PCR karışımı	27
Çizelge 4.1. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) başlangıç ağırlıkları (BA), son ağırlıkları (SA), spesifik büyüme oranı (SBO), oransal büyüme (OB), yem değerlendirme oranı (YDO) değerleri.	29
Çizelge 4.2. Total RNA konsantrasyonları (ng/μL) ve A260/A280 (nm) oranları.....	34
Çizelge 4.3. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarının (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) aktin ve MYC değerleri	39

1. GİRİŞ

Canlılar vücut aktivitelerini aksatmadan sürdürebilmesi için hareket sistemlerine ihtiyaç duymaktadır. Balık ve diğer tüm canlıların hareket sistemlerinin temelini protein yapıda olan kas dokusu oluşturmakta olup kontraksiyon yapabilen, uzayabilen özelliklere sahiptir. Bu özellikler kasın vücutta bulunduğu yere göre yapısal, kimyasal, fizyolojik ve aynı zamanda işlevsel, fonksiyonel yönlerden farklılık arz etmektedir. Bu farklılıklar bir kasın fonksiyonu bakımından diğerinden üstünlüğü ya da zayıflığı anlamına gelmemektedir. Aksine oluşan bu farklılıklar metabolik faaliyetlerin ve hareket mekanizmasının uyum içerisinde cereyan etmesini mümkün kılmaktadır.

Kas dokusunu oluşturan yapısal ve fonksiyonel birimler çeşitli stres faktörlerine maruz kaldıklarında gerek proteinel yapılarında gerekse çalışma mekanizmalarında moleküler değişimler söz konusu olmaktadır. Bu değişimlerin oranı canlı mekanizmanın stres karşısında etkilenim seviyesi hakkında öngörüde bulunmamızı sağlamaktadır.

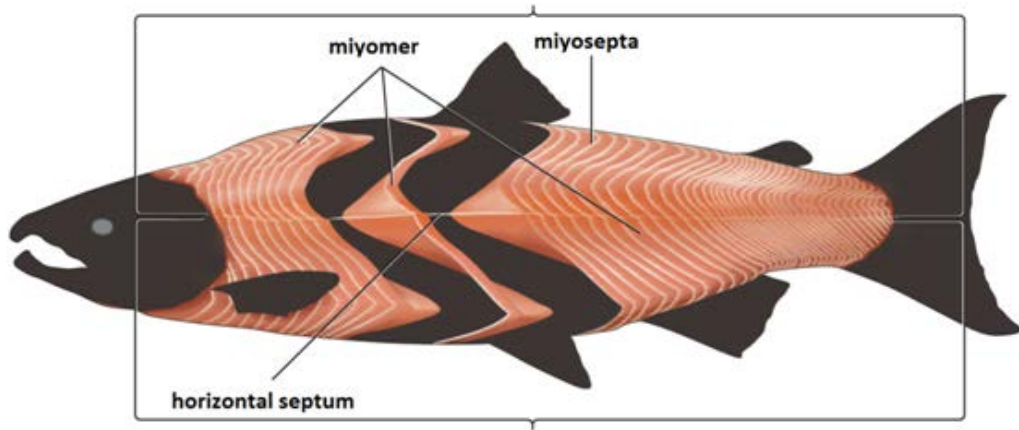
Stres faktörleri translasyon faaliyet veriminin yanında hormonal, enzimial ve kan parametrelerinin değişimleri gibi çeşitli metabolik aktörlerle dışavurum sağlamaktadır. Söz konusu parametrelerin her biriyle canlıda tezahür eden stres oluşum seviyelerinin ölçülmesi mümkün olmaktadır. Bilakis metabolik faaliyetler, etkilenim eşik düzeyine ulaşılmış durum karşısında bütünsel tepki vermektedir. Nedeni ise canlı metabolizmasının bütünsel denge içerisinde uyumla çalışmasıdır.

1.1. Balıklarda Kas Sistemi

Canlılarda hareket denildiğinde kas dokusu akla gelmektedir. Çoğu metabolik olaylarda istemli ya da istemsiz hareketleri sağlamakla birlikte vücudun şeklini belirler, kemik ve kıkırdak yapının hareketini sağlarlar. Kan dolaşımına kadar bütün hayati fonksiyonların yerine getirilmesi kasların çalışması ile mümkündür. Tüm hayvansal organizmalarda olduğu gibi balıklarda da kas sistemi istemli ve istemsiz kaslar olmak üzere iki gruba

ayrılmaktadır. İstemsiz kas grubunda olan viseral kaslar düz kaslardan oluşmakta ve aynı zamanda sindirim, boşaltım gibi fonksiyonları sağlamaktadır. Diğer kas çeşitlerine göre yavaş ve düzenli çalışma gösterirler ve kasılmayı devam ettirebilmek için gerekli olan enerji, kasılma ve gevşeme başlangıcı süresi, kasılma gücü diğer kaslara göre daha düşüktür (Guyton and Hall 2006).

İstemli hareketi sağlayan kaslar ise somatik kaslardır. Somatik kaslar çizgili kaslar olup genellikle başın arka kısmından kuyruğa kadar halkasal bir şekilde uzanırlar. Miyomer diye adlandırılan, balıkların hareketini sağlayan bu kaslar, her bir yüzgecin kaidesine yerleşmişlerdir. Diğer yandan düz kasların hareketini sağlayan fonksiyonel bölümü, kas hücresi, çekirdek, glikojen zerrelere, mitokondri, vb. bir miktar miyofibril içeren sarkoplazmadan oluşmaktadır. Hücre ise sarkolemma adı verilen bağ dokunun bir kılıfı ile sarılmıştır. Miyofibriller, kontraktıl proteinler, aktin ve miyosin içerirler (Huss 1998).



Şekil 1.1. Balıklarda kasların genel görünümü (Anonymous 2014a)

İskelet kası kompleks bir yapıya sahip olmakla birlikte yüksek düzeyde özelleşmiş bir dokudur. Vücudun total kütleinin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bu kas sisteminin birincil fonksiyonu kimyasal enerjiyi mekanik işe dönüştürerek solunuma yardımcı olmak, vücut duruşunun korunmasını ve hareket etmeyi sağlamaktır. İkincil fonksiyonları ise ısı üretimi, elektrolit, su ve protein deposu görevi yapmaktır; bundan

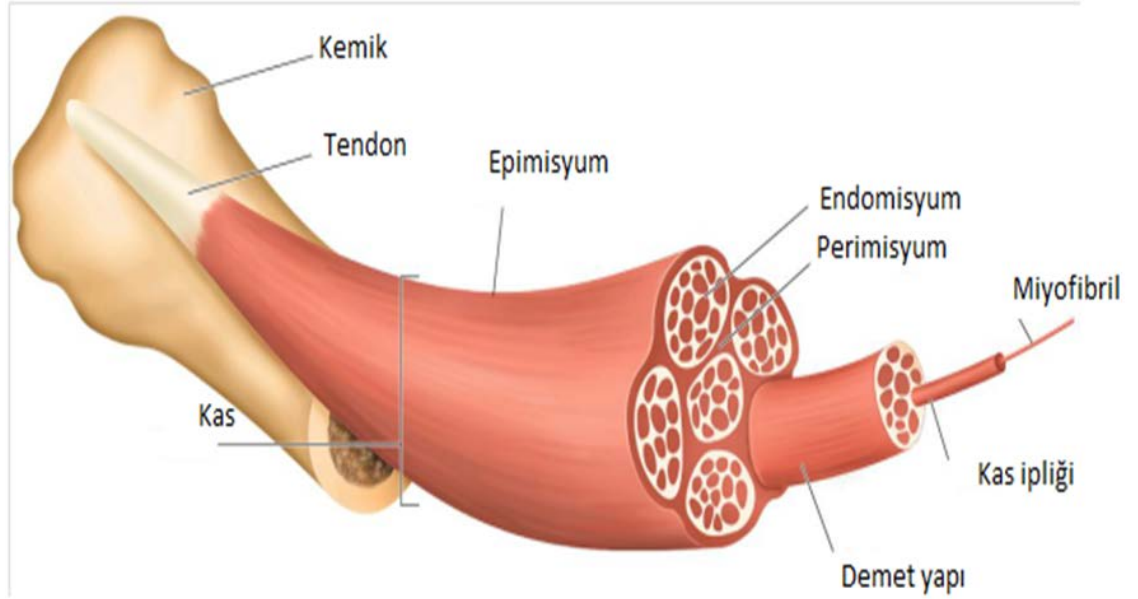
dolayı, organizmanın genel metabolizmasında önemli bir homeostatik rol oynar (Bingöl ve Mutluer 1992).

Kaslar kollagenöz bağ dokusu vasıtasıyla bir arada tutulan çok sayıda liften oluşur. Kas lifleri uzun, çok sayıda nükleusa ve silindirik görünüme sahip hücrelerdir. Kas lifleri iki yolla oluşmaktadır. Fötal evrede myoblastların füzyonuyla ve sonraki süreçte satellit hücrelerinin rejenerasyonu sonucu meydana gelmektedirler (Bingöl ve Mutluer 1992).

Kas lifi hücre zarına plazmalemma adı verilmektedir. Hareket ve diğer vücut fonksiyonlarının oluşabilmesi için kas liflerinin son-plak bölgesinde oluşan elektriksel sinyallerin iletimini sağlamaktadır (Elmqvist *et al.* 1964).

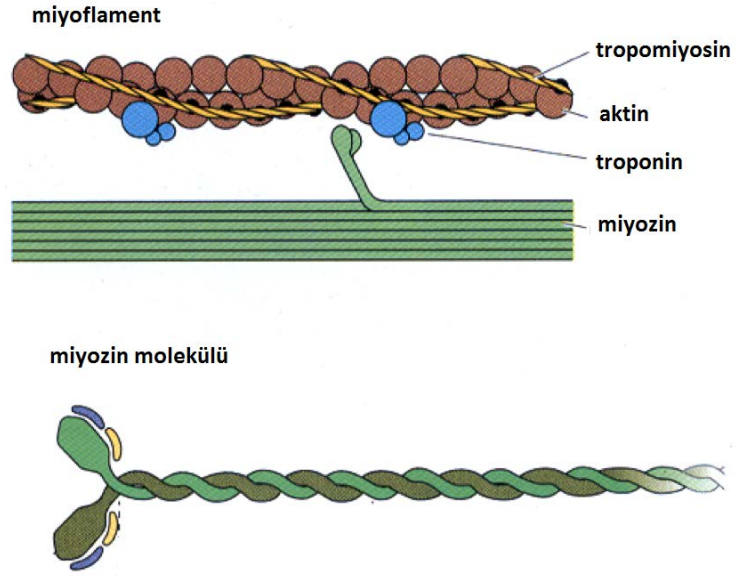


Şekil 1.2. Kas lifi hücre zarı (McNeil and Khake 1992)



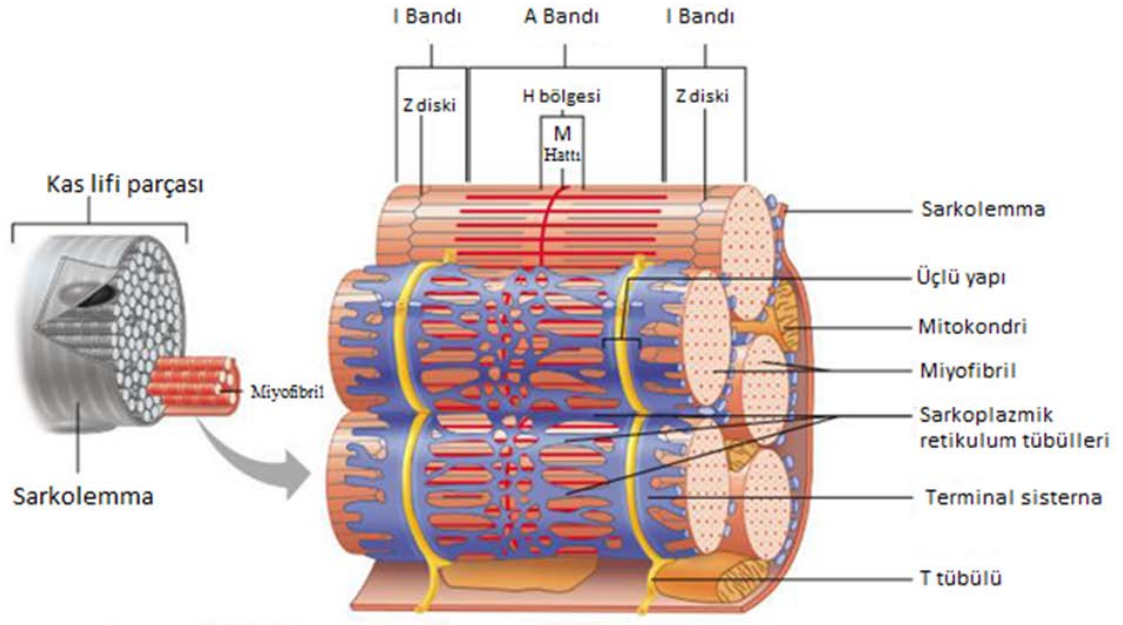
Şekil 1.3. İskelet kasında kas fibrili ve miyofibrilin görünümü (Anonymous 2014b)

Kaslar çok sayıda fibrillerden, fibriller ise miyofibrillerden oluşmaktadır. Kas yapısını oluşturan fibrillerin çapları 0,05-0,1 mm iken miyofibriller yaklaşık olarak 1 μ m çapındadır (Foegeding *et al.* 1996; Brenner 2009). Miyofibriller yapılarında birbirini takip eden "Sarkomer" adlı birimlerden meydana gelmişlerdir. Myoflamanların sarkomer içindeki düzenlemesi koyu renkli A ve açık renkli I bantlarının ortaya çıkmasına, dolayısıyla da iskelet kaslarının karakteristik özelliklerinden olan transvers çizgilenmenin görülmesine yol açar (Wang *et al.* 1993).



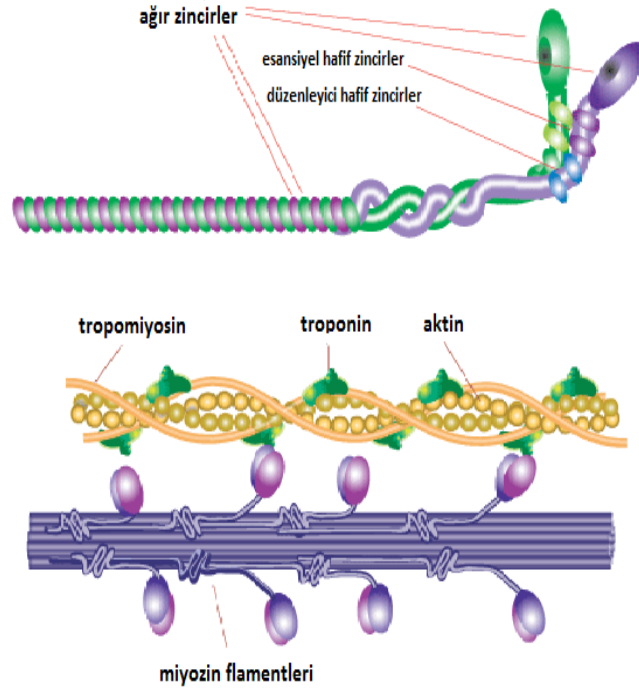
Şekil 1.4. Sarkomeri meydana getiren kontraktıl proteinler (Anonymous 2014c)

Sarkomer aktin, miyosin ve troponin-tropomiyosin adlı kontraktıl proteinlerden oluşur. Miyofibriler yapıda A (Anizotropik) bandı sarkomerin orta bölgesinde yer almaktadır, kalın flamanlardan oluşur ve orta kısmında H-bölgesi yer alır, burası ince flamanların yer almadığı kısımdır. H-bölgesinin orta kısmında da M çizgisi vardır ve bu çizgi üzerinde kalın flamanların birbirine bağlanma yerleri mevcuttur (Şekil 1.5). I bantları ise açık renkli olan kısımlardır (Demirkazık 2005)



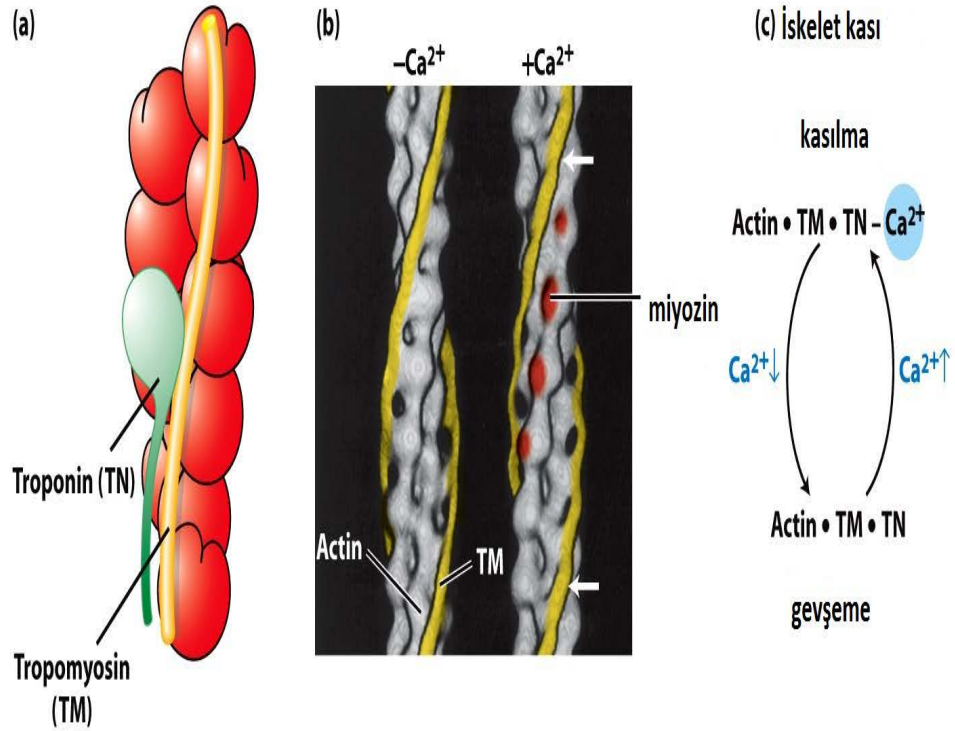
Şekil 1.5. Kas yapısını oluşturan birimlerin genel görünümü (Anonymous 2014d)

Kas dokusunun moleküler bileşimi tüm kas türlerinde protein içeriği yönünden aktin ve miyosin önemli yer tutmaktadır. Miyofibrillerin yapısında bulunan ve doğrudan kasılma aktivitesi ile ilişkili olan miyosin, aktin, tropomiyosin ve troponin gibi kas proteinleri önem taşımaktadır. İskelet kasında bulunan miyosin, total iskelet kası proteininin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Ceylan 2009).



Şekil 1.6. Miyofibriler Proteinler (Anonymous 2014e)

Miyofibriller aktin ve miyosin gibi kasılma özelliğine sahip yapılardır. Bir kasın kasılması olayı kalsiyum döngüsü ile düzenlenir. Omurgalılarda ve balıklarda da her bir kas fibrili birçok miyofibrilden meydana gelmektedir. Miyofibriller ise aktin ince filamentleri ve miyosin kalın filamentlerini, sarkomer adı verilen düz yapısal zincirler vasıtasıyla organize etmektedir. Kasılma organizasyonunda sinir impulsu iskelet kas fibriline ulaştığı zaman plazma membranı boyunca elektriksel potansiyel üzerinde değişime neden olmaktadır. İskelet kas fibrilleri bu elektriksel sinyali hızlı bir şekilde sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarına salarak sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun seviyesinde artışa çevirir. Bu süreçten sonra kalsiyum yeniden başlangıç konsantrasyonuna dönüşüm gerçekleştirir (Potter and Gergely 1974).



Şekil 1.7. Ca⁺⁺ molekülü ve kasın aktif birimleri (Anonymous 2014f)

Miyosin hafif zinciri (MLC) proteinini elektriksel sinyal iletiminde rol oynamakla birlikte söz konusu proteinin kalsiyuma bağlanması ile oluşan hücresel etkileri in vitro olarak değerlendirmişlerdir. MLC proteinin farklı tiplerinin olduğunu ve bu proteinlerin yapılışında Ca⁺⁺ ye bağlanarak biyolojik fonksiyon gösterdikleri ortaya konulmuştur (Ebashi 1976).

1.2. Stresin Kas ve Metabolizma Üzerindeki Etkileri

Canlı organizmalar doğal yaşam sirkülasyonu sürecinde çeşitli nedenlere bağlı olarak istenmeyen durumlar karşısında metabolik faaliyetleri değişebilmekte ve fiziksel, biyokimyasal, fizyolojik vb. aksaklıklara maruz kalabilmektedirler. Stres, bunu oluşturan etmenler ile organizmanın savunma reaksiyonları arasındaki karşılıklı etkileşimdir. Hayvanların vücudun sabit iç dengesini (homeostasi) tehdit eden stres faktörleri iç ya da dış kaynaklı olaylardır (Altınçekiç ve Koyuncu 2012).

Genelde karşılaşılan stres kaynakları; balığı uygun olmayan biçimde yakalamaya çalışmak ve elle muamele etmek, su sıcaklığı değişimleri, oksijen yetersizliği gibi faktörlerdir. Diğer yandan biyolojik stres faktörleri arasında stok yoğunluğu, mikro canlılar, makro canlılar, cinsiyet, diğer balık türleri, genetik geçmiş ve yaşam evresi yer almaktadır (Küçük 2008).

Stres ve aşırı hareketlilik sonrası balığın aneorobik enerjiyi kullandığı, laktik asit fermantasyonuyla ölüm sonrasında kasta pH seviyesinin düşmesiyle sonuçlandığı ve bu düşüşün kas içeriğinin kalitesiyle ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Stresin kas fibrillerine ya da bağ dokularına proteazların salınımına neden olduğu ve bu durumun kas yumuşamasına ve kas yapısını bozulmasına vesile olduğunu ortaya koymuşlardır. Kalpain gibi bazı strosolik enzimlerin balık ya da memeli kaslarının canlılığının ölümü sonrasında dokularının bu enzimlerin etkisiyle daha hızlı bozulduğunu ve kas dokusu bozulmalarında lizozomal katepsinlerin ve stok yoğunluğunun etkisi ortaya çıkarılmıştır (Bahuaud *et al.* 2009).

1.3. Araştırmanın Hedefleri

1. Baraj kaynaklı sulama kanal sistemlerinde yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) ideal stok yoğunluklarının belirlenmesi.
2. Farklı stok yoğunluklarının bazı büyüme parametreleri (Bireysel büyüme oranı, spesifik büyüme oranı, ve oransal büyüme) üzerine etkilerinin araştırılması.
3. Stok yoğunluğunun yetiştiricilik için önem arz eden yem değerlendirme oranı üzerine etkilerinin belirlenmesi.
4. Balık eti kalitesinin belirleyici unsurları olan kas yapısını farklı stok yoğunluklarının nasıl etkilediği ve kasın kontraktil kısmını oluşturan aktin ve ağır zincir miyosin mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenerek incelenmesi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Aksakal *et al.* (2011), ortalama ağırlıkları 130 gr olan gökkuşağı alabalıklarını (*Onchorhynchus mykiss*) 4 farklı stok yoğunluğunda ve ilk grup kontrol grubu seçilmek üzere sırasıyla 15, 20, 25, 30 kg/m³ olarak dizayn etmişlerdir. Balıklar amaca yönelik yetiştirme süresi olan 2 ay boyunca vucut ağırlıklarının %1'i kadar yemleme işlemine tabi tutulmuşlardır. Çalışmada farklı stok yoğunluklarının stres geni (HSP 70) üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Diğer yandan stok yoğunluğu artışı ile stres geninin mRNA ekspresyonu artışı arasında pozitif korelasyon olduğu ortaya konulmuştur. Çalışma elderlerine göre optimum stok değerlerinin aşılması durumunun balıklar için stres kaynağı teşkil ettiği ve bundan dolayı ekonomik balık yetiştiriciliği için bu değerlerin, stres gen ekspresyonu verimi göz önünde bulundurularak belirlenmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Hevroy *et al.* (2006), ortalama ağırlıkları 175±28 gr olan atlantik salmonları (*Salmo salar*) 68 gün boyunca farklı oranlarda hidroliz edilmiş balık unu diyeti ile beslenerek, iskelet kası proteini olan ağır zincir miyosin (MyHC) geni ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Diyet içeriğine farklı oranlarda karışımı sağlanan yüksek protein konsantrasyonunun miktarı arttıkça büyümeye bağlı olarak MyHC'nin ekspresyonu artış değerliğe sahip pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Liang *et al.* (2013), Mandarin balığında (*Siniperca scherzeri*) kas gelişimi üzerine esansiyel miyosin hafif zincirlerinin (EMLC) fonksiyonlarını ve gen ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Bu çalışmada miyosin hafif zinciri (MLC) proteinini mandarin balığından izole ederek amino asit ve nükleotid dizilimlerini belirlemişlerdir. Ayrıca bu proteinin kalsiyuma bağlanması ile oluşan hücresel etkiler in vitro olarak değerlendirmişlerdir. MLC proteinin farklı tiplerinin olduğunu ve bu proteinlerin yapılışında Ca⁺⁺ye bağlanarak biyolojik olarak fonksiyon gösterdikleri ortaya konulmuştur.

Bahuaud *et al.* (2009), somon balığında ölüm öncesi stresin et kalitesi üzerine etkisini ve çeşitli dokular üzerinde bu etkilerin gelişimi ayrıca kas dokusu üzerinde yaşanan tahribatların nedenleri araştırılmıştır. Stres ve aşırı hareketlilik sonrası balığın aneorobik enerjiyi kullandığı, laktik asit fermantasyonuyla ölüm sonrasında kasta pH seviyesinin düşmesiyle sonuçlandığı ve bu düşüşün kas içeriğinin kalitesiyle ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Stresin kas fibrillerine ya da bağ dokularına proteazların salınımına neden olduğu ve bu durumun kas yumuşamasına ve kas yapısını bozulmasına vesile olduğunu ortaya koymuşlardır. Kalpain gibi bazı stosomal enzimlerin balık ya da memeli kaslarının canlının ölümü sonrasında dokularının bu enzimlerin etkisiyle daha hızlı bozulduğunu ve kas dokusu bozulmalarında lizozomal katepsinlerin ve stok yoğunluğunun etkisi ortaya çıkarılmıştır.

Veiseth-Kent *et al.* (2010), yoğun ortamda yaşayan somon balığında (*Salmo salar*) stresle birlikte ortaya çıkan metabolik değişiklikleri kas dokusu ve kan dokusunda incelemişlerdir. Strese maruz kalan çipura ve alabalık karaciğerinde gen ifadesi üzerine etkileri çalışılmıştır. Çeşitli genlerle ilgili farklı metabolik süreçler, proteolitik yollar ve immün fonksiyonu bu stres nedeniyle değişim gösterdiği vurgulanmıştır. Alabalık da strese yanıt olarak proteomiks kas proteinleri değişiklikleri çalışılmıştır. Bu proteinlerin çoğunluğu kasın yapısal içeriği ve enerji metabolizması ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Böylece strese neden olan faktörler balık et kalitesini negatif etkilediği ileri sürülmüştür. Balıkta artan metabolik oranlar, kasta laktik asit birikimi, aneorobik metabolizma ürünlerinin artışı fileto kalitesi üzerinde büyük etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Wakabayashi *et al.* (1994), kasın yapısında bulunan aktin ve miyosin filamentlerinin aktivitesini açıklığa kavuşturabilmek için kasın kasılma faaliyetleri sırasında incelemiş olup, sinkrotron radyasyon kullanarak aktif kasların uzaması yüksek çözünürlüklü alan dedektörü ile analiz edilmiştir. İnce ve kalın kasların tam örtüşmesinde, kasların izomerik kasılması esnasında %0,25 örtüşme fazlalığı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Dinlenme durumunda olan sarkomerlerde aktin filamentlerin miyosin filamentlerini

büyük ölçüde örttüğü gösterilmiştir. Sonuç olarak etkin bir kas sarkomer uygunluğunun, aktin ve miyosin uygunluğuna bağlı olduğu bildirilmiştir.

Soyer *et al.* (1994), balıktaki protein yapısının yanında lipidler ve diğer metabolik bileşiklerin ölüm sonrası oluşan ortam nedeniyle biyokimyasal reaksiyonlara olanak sağladığı vurgulanmaktadır. Balıkların yapılarında bulundurdukları temel enerji kaynağı olarak bilinen adenzin trifosfat (ATP) ve kaslarda bulunan kas glikojenlerinin, ölüm sonrasında sürekli enerji üretim mekanizmalarının çalışmaması sonucunda bu enerjinin süratle harcandığı bu metabolik aktivite sonucunda membran bütünlüğünün bozulması, bunu takiben aktin ve miyosin köprülerinin geri dönüşümü olmaksızın oluştuğunu ortaya koymaktadırlar. ATP'nin parçalanması, kas glikojeninden laktik asit oluşumu, trimetilamin oluşumunun enzimlerin ve mikroorganizmaların aktivitelerini ileri düzeyde artırdığı bu reaksiyonların kas ve diğer protein yapıların yanında lipitlerde de değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir.

Bagni *et al.* (2007), balık kültürü yönetiminde ölüm öncesi ve ölüm anı önem arz etmektedir. Ölüm öncesinde uygulanacak prosedürlerinin kabul edilebilir refah düzeyinde olması gerektiği, yüksek kalitede et ürünü elde edilebilmesi için heyecan, korku, stres gibi faktörlerin, balıkları etkilemediği bir ortamda yapılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Levrek ve çipura üzerinde bazı stres faktörlerin ölüm öncesi ve ölüm sonrası süreçlerinde ne tür etki bıraktıkları amaçlanmıştır. Yüksek ve düşük yoğunlukta iki farklı öldürme metodu (havada ve soğutulmuş suda) denenmiş aynı zamanda kas katılaşmasının başlangıcı ve gelişimi incelemiştir. Kas katılaşması üzerine iki öldürme metodunda da yüksek stres oluşturduğu ortaya konulmuştur. Soğutulmuş suda ölen balıkların havada ölen balıklardan daha uzun sürede öldüğü ortaya çıkarılmıştır.

Skjervold *et al.* (2001), somon balığında (*Salmo salar*) soğukun ve balık yoğunluğunun stres üzerinde etkilerini analiz etmişlerdir. 4 deney grubu oluşturulmuş ve her grupta 50 adet balık incelenmiştir. 1. grup gözlem grubu, 2. grup yoğun balık ortamı, 3. grup soğuk ortam, 4. grup ise yoğun ve soğuk ortam olarak seçilmiştir. Yoğun ve soğuk ortama bırakılan balıklarda kortizol, laktat, osmolalite seviyelerinin önemli derecede arttığı,

plazma glukoz seviyelerinin soğuk ortamda bulunan balıklarda % 20, yoğun ve soğuk ortamdaki balıklarda ise % 70 civarında artış olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan soğuk ortamda bulunan balıklarda stres ve kas katılma seviyelerinin daha düşük olduğu ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak yoğun ortamda yaşayan balıkların fleto kalitesi düşüklüğünün, soğuk ortamda bulunan balıklarda görülmediği saptanmıştır.

Akpınar (2010), farklı stok yoğunluklarının minekop yavrularının büyüme performansı, hayatta kalma oranları, glikoz ve kortizol seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma için seçilen balıkların ortalama ağırlıkları sürecin başında belirlenmiş olup balıklar farklı stok yoğunlukları oluşturularak 12 hafta boyunca serbest yemleme yöntemiyle yemlenmişlerdir. Stok yoğunluğu az olan gruplarda son ağırlık, yaşama oranı, canlı ağırlık artışı, günlük canlı ağırlık kazancı, günlük yem alım oranı, ortalama günlük büyüme, günlük büyüme indeksi, spesifik büyüme oranı gibi değerleri stok yoğunluğu fazla olan gruplara nazaran daha iyi sonuçlar vermiştir. Diğer yandan stok yoğunluğunun stres üzerindeki etki seviyesini ölçmek için kortizol değerleri üzerinde yapılan analizler sonucunda stok yoğunluğu az olan grupların diğer gruplara göre daha iyi seviyede oldukları gözlenmiştir. Sonuç olarak minekoplarda yapılan bu çalışmaya göre stok yoğunluğunun büyüme ve metabolik süreçler üzerinde ciddi etkilerinin olduğu ifade edilmektedir.

Bryson-Richardson *et al.* (2005), zebra balığı embriyosunda kas liflerinin iki farklı dokuya ait fonksiyonlarını net bir şekilde tespit edebilmek için moleküler işaretleyiciler kullanılarak zebra balığında hızlı ve yavaş MyHC'yi kodlayan genleri ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca bu genlerin hızlı ve yavaş tip MyHC izoformlarını ortak ekprese ettiğini saptamışlardır.

Xu *et al.* (2000), yapılan bu deneyde zebra balıkları üzerinde çalışılmış ve balıklardan elde edilen cDNA kalıplarının, kas spesifik proteinlerini (MSP) ve hızlı iskelet kas izoformlarının çoğunu kodladığı ve karakterizasyonunu yaptığı ileri sürülmüştür. Bu cDNA problemleri kullanılarak yetişkin ve embriyo gelişimindeki gen ifade kalıpları northern blot hibridizasyonu ve *in situ* hibridizasyonu yöntemleri kullanılarak

karşılaştırma yapmışlardır. Bu genlerin tümü embriyo ve yetişkinlerde ifade edilmekte olup aynı zamanda iskelet kasında yüksek miktarda ekspresyonunun yapıldığını ifade etmişlerdir. Kas spesifik protein genleri ekprese edilerek aynı zamanda solungaç, göz, çene, baş kasları oluşumunun gerçekleştiği öne sürülmüştür. Deneysel 10 MSP genlerinin ekspresyon sırasını göstermektedir ve kas lif yapısının gen dizilimini yansıtmaktadır. Her birey için MSP gen ekspresyon ifade süresi, somit hücre grupları ile benzer zamanlama gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Yüzbaşıoğlu (2008), hücrel yapıların, dokuların çevresel faktörlere karşı verdikleri mRNA düzeyindeki tepki metabolizmasının incelenmesi için RT-PCR ve kantitatif PCR uygulama yöntemleri kullanılmaktadır. RT-PCR yöntemi uygulamalarında çalışılmak istenilen genin ifade seviyesinin ele alınabilmesi için aynı dokuda ekspresyonu değişiklik arz etmeyen diğer bir gen ürünü olan mRNA ile normalizasyonu sağlanması gerekli olduğu ifade edilmektedir. Bu deneylerde, uygunluk gösteren housekeeping genler seçilerek normalizasyon aşamalarında kullanılabilirler. Diğer yandan dokularda gerçekleşen radikal değişimler karşısında söz konusu genlerin ifade düzeylerinin güvenilirliği açısından kesin bilgiler bulunmamaktadır. Bundan dolayı kaslarda meydana gelen radikal doku dejenerasyonlarının olduğu zamanlarda doğru sonuçlar elde etmek için güvenilir bir normalizasyon geni ihtiyacı doğmaktadır. Çalışmada ulaşılmak istenilen nokta şudur: Doku yapısı farklılıklarının olduğu iki farklı kronik kas dejenerasyonu modelinde, dejenerasyon sürecinde, ifade düzeyi en az değişen housekeeping genlerin ortaya çıkarılmasıdır. Kas dokusunun yapısal proteinlerinden biri olan miyosin ağır zincir ekspresyonu analizi de yapılmış olup izlenen ekspresyon miktarının kas atrofisi ile ilişkilendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Costas *et al.* (2007), yüksek stok yoğunluklarında yetiştirilen balıklarda gerekli enerji ihtiyaçları karşılanmadığı durumlarda kronik strese maruz kalabileceklerini ve bu durumun enfeksiyonlara zemin hazırlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada 3 farklı stok yoğunluğu ortamı hazırlanmıştır. Balıklar (*Solea senegalensis*) 63 günlük süre boyunca düşük, orta ve yüksek stok yoğunluklarında muhafaza edilmişlerdir. Hastalık çıkışı yüksek yoğunluklu stoklarda müşahade edilmesine rağmen büyüme ve besin tüketimi yönünden farklılık arz etmediği ileri sürülmektedir. Plazma kortizol ve

serbest amino asit seviyesi yönünden 3 grup arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Diğer yandan plazma glukoz ve ozmolalite seviyesi orta yoğunluklu stoklarda daha yüksek bulunmuştur ve bu balıkların stres altında olabileceği düşünülmektedir. Yüksek yoğunluklu ortamda bulunan balıkların serbest amino asitlerinin normal seviyeden fazla kullanımı, protein sentez ve diğer önemli metabolitlerin sentez hızının yüksek olması, enerji üretimi talebinin yüksek oluşu metabolizmanın stresle başa çıkmak için verdiği bir tepki olduğu savunulmaktadır. Sonuç olarak amino asit kullanım artışı seviyesinin yüksek stok yoğunluğunun oluşturduğu stres olabileceği işaret edilmektedir.

Öğüt (2005), balıklarda stresin direkt olarak analizi, salgılanan hormonların ölçümü ile gerçekleştirilebilmektedir. Diğer yandan stres cevabından sonra kan ve dokularda oluşan fizyolojik değişimlerin ortaya çıkarılmasıyla, doku ya da organlarda oluşan zararların göstergesi olan enzimlerin analizi, kanda bulunun glukoz seviyesi değişimi ve iyon regülasyonunun işareti olan CI düzeyi stres seviyesi tespitinde kullanılabilir. Balıklarda stres tepkisine neden olabilecek biyolojik stres faktörleri stok yoğunluğu, mikro ve makro canlılar, yaşam evresi, genetik geçmiş, diğer balık türleri ve cinsiyettir.

Erik (2009), miyosinler, genomik özellikleri ve moleküler düzeydeki benzerlikleri ele alınarak yapılan düzenlemeler sonucu 17 sınıfta gruplandırılmış ve aynı zamanda proteinlerin büyük üst familarından birisidir. Sarkomerik miyosinler, düz kas miyosinleri ve kas dışı miyosinlerini içermektedir. Memelilerde, kas dışı miyosin ağır zincirin (NMHC) üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar NMHC-IIA, NMHC-IIB ve NMHC-IIC'dir ve sırasıyla MYH9, MYH10 ve MYH14 genleri tarafından şifrelenmektedir.

Balığın kas dokusu düz kaslardan meydana gelmektedir. Fonksiyonel bölüm, kas hücresi, çekirdek, glikojen zerrelere, mitokondri, vb. bir miktar miyofibril içeren sarkoplazmadan oluşmaktadır. Hücre, sarkolemma adı verilen bağ dokunun bir kılıfı ile sarılmıştır. Myofibriller, kontraktıl proteinler, aktin ve miyosin içerirler (Huss 1998).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri ve süresi

Araştırma KUDAKA (Kuzeydoğu Anadolu Kalkınma Ajansı) ve SODES (Sosyal Destek Projesi) tarafından desteklenen, Kuzeydoğu Anadolu Su Ürünleri Derneği ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi ortaklığı ile sürdürülen projeler kapsamında, Erzurum ili Aziziye ilçesi Alaybey mahallesi sınırları içerisinde Daphan ovası sulama kanallarında 31 Ağustos–30 Eylül 2011 tarihleri arasında yürütülmüştür. Laboratuvar çalışmalar ise Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1.2. Balık materyali

Deneme materyali olarak her biri ortalama 15,15 gr olan 1720 adet gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Balık materyalleri Erzincan ili Tercan ilçesi Akın Balıkçılık Şirketi'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Su materyali

Kuzgun Barajı kaynaklı sulama kanalları içerisinde araştırmalar yapılmakta olup, deneme sürecinde (31 Ağustos- 30 Eylül 2011) sabah saat 6.00'dan başlamak üzere 6 saat aralıklarla yapılan ölçüm ve analizler sonucunda su sıcaklığı $14,5\pm 2,5^{\circ}\text{C}$; çözünmüş oksijen miktarı ise $9,0\pm 0,5$ mg/lit olarak analiz edilmiştir. Su sıcaklığı ve çözünmüş oksijen miktarı YSI marka arazi tipi ölçüm sistemi kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Deneme düzeni

Araştırmada 4x5 m ebatlarında 15 parsellik deneme kafesi kullanılmıştır. Her bir parsel 1 m³ hacimli olup 100x100x100 cm ebatlarında tül ađ kullanılarak hazırlanmıştır (şekil 3.1). Çalışmada gökkuşağı alabalıkları (*Onchorhynchus mykiss*) parsellere S1: 15 kg/m³, S2: 20 kg/m³, S3: 25 kg/m³, S4: 30 kg/m³, S5: 35 kg/m³ olacak şekilde  tekerrürlü plansız olarak dağıtım yapılmıştır.



şekil 3.1. Araştırmanın yürütüldüğü deneme nitesi

3.2.2. Balıkların bakımı ve beslenmesi

Deneme gruplarındaki gökkuşağı alabalıklarına günlük olarak canlı ağırlıklarının %4' oranında yem verilmiştir (Aras vd 2000). Yemleme işlemi iki öğün sabah ve iki öğün öğleden sonra olmak üzere günde dört kez yapılmış olup dört hafta boyunca aksatılmadan devam edilmiştir.

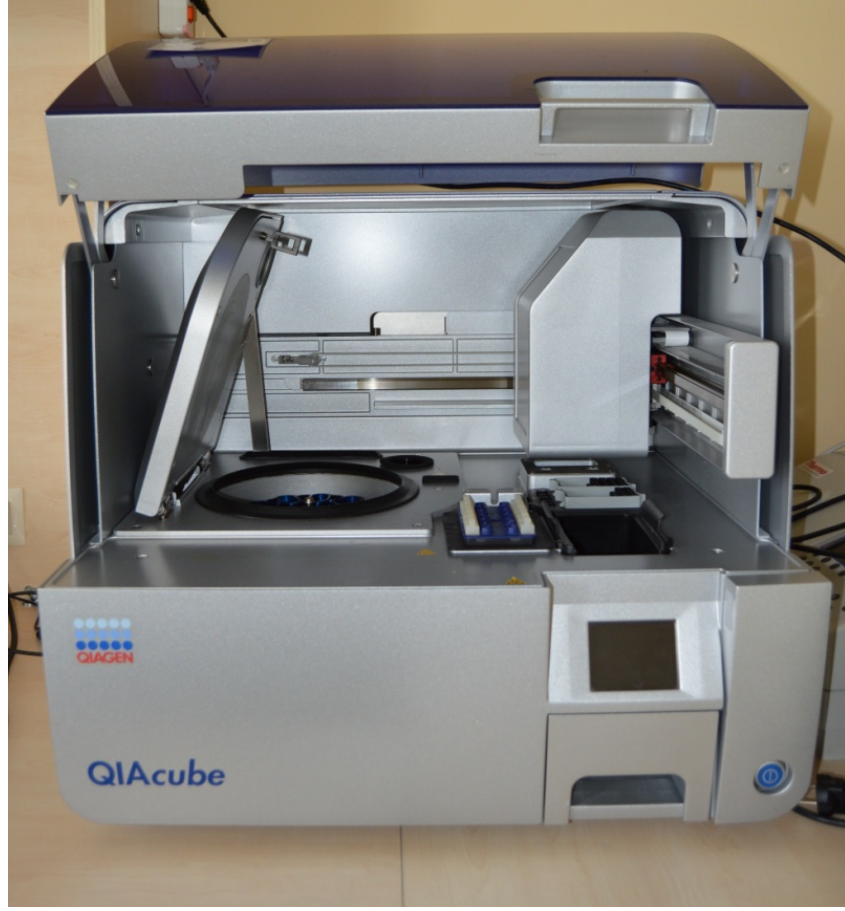
3.2.3. Balıklardan doku örneklerinin alınması

Çalışmalar sonunda analizler için örnekler her deneme parselinden plansız şekilde alınan 5 balık sıvı azot tankı vasıtasıyla laboratuvara getirilip analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Gen ekspresyon derecelerinin belirlenmesi için total RNA analizinde kullanılacak kas örnekleri 1,5 ml'lik tüplere konularak üzerlerine RNA Later Stabilizasyon Regent solüsyonu (QIAGEN, Katalog No: 76106) ilave edilerek 80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Total RNA izolasyonu

RNA izolasyon işlemlerinde RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Cat:74804) kullanılarak QIACUBE otomatik izolasyon sisteminde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). RNA izolasyonu sürecinde otomatik sisteme yükleme aşamasına kadar aşağıdaki basamaklar sırasıyla izlenmiştir.

1. RNA later solüsyonundan arındırılan örnekler 100 mg alınarak steril 2 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 1 ml QIAzol[®] Lysis Reagent ilave edilmiştir. Tüp içerisine 5 mm'lik 2 adet çelik boncuk (QIAGEN Cat No:69989) atılıp Tissuelyser LT' de 40 Hz'de 6 dakika süreyle parçalanmıştır (Şekil 3.3).
2. Doku örneklerinin parçalama işlemi bittikten sonra çelik boncuklar alınıp örnek üzerine 200 μL kloroform ilavesi yapılmıştır. Daha sonra 15 sn vortekslenmiştir. Ardından 2-3 dak. düz zeminde bekletilmiştir.
3. Örnekler 12000 rpm'de 4°C 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj işleminin sonucunda oluşan 3 tabakadan en üste olan fazdan 500 μL alınarak steril 2 ml' lik tüp içerisine aktarılmıştır.
5. Fazlar QIAGEN- QIACUBE DNA-RNA izolasyon robotuna yerleştirilmiştir.
6. İzole edilen RNA'lar -80°C 'de saklanmıştır.



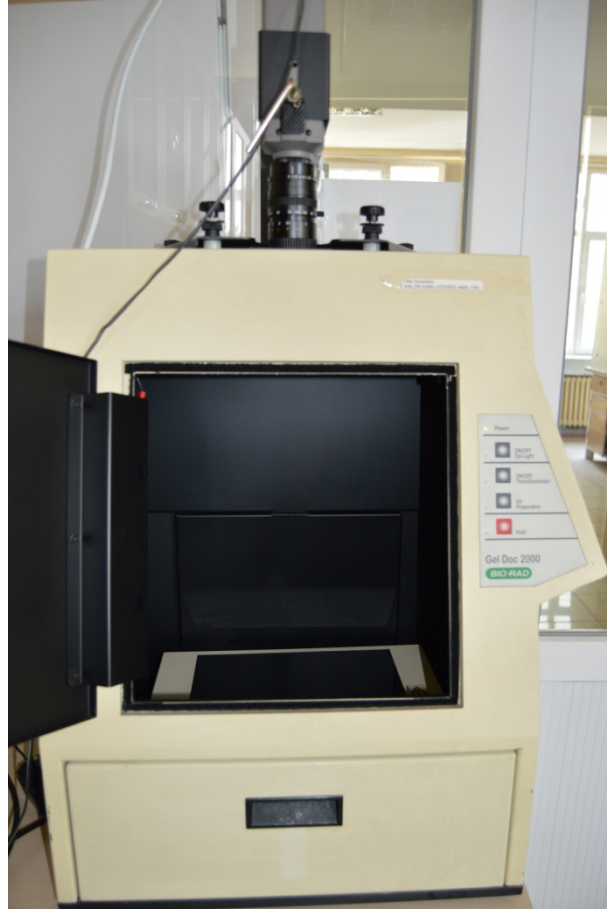
Şekil 3.2. Araştırmada kullanılan otomatik nükleik asit izolasyon robotu



Şekil 3.3. Dokuların parçalanmasında kullanılan parçalayıcı



Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan nanodrop spektrofotometre



Şekil 3.5. Araştırmada kullanılan görüntüleme cihazı

3.2.5. RNA'nın kalitatif tayini

%1'lik agaroz jel elektroforezinde total RNA'nın kalitatif tayini yapılırken aşağıdaki sıra izlenmiştir. 70 ml'lik elektroforez küveti kullanılarak %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bu işlem için 0,7 gr agaroz (Cat No: Sigma A 9539) tartılarak bir erlenmayere aktarılmıştır. Üzerine 66,5ml ddH₂O ve 4,38 ml 20 MOPS solüsyonu eklenmiştir. Bileşenler tamamen çözünene kadar mikrodalga fırında yaklaşık 3 dak. bekletildikten sonra hafif çalkalama işlemi yapılarak soğutulur. Üzerine 15,6 µL formamid (Cat No: Simga F 9037) ve 12,8 µL etidyum bromür (10µg/µl) (Cat No: Sigma E8751) ilave edilir. Jel tankına tarak yerleştirildikten sonra hazırlanan jel tankın içerisine boşaltılır. Bu işlem uygulanırken kabarcık oluşmamasına özen gösterilmelidir. Jelin katılaşması için 30 dakika bekletilir. Bu 30 dk içerisinde kuyulara yüklenecek olan

örnekler hazırlanır. Steril 0,2 ml'lik ependorf tüp içine 5 µL formamid, 0,5 µL 20 MOPS solüsyonu, 3,5 µL ddH₂O ve 1 µL izole edilen RNA örneklerinden konulur. 65°C'de 15 dak. etüvde inkübe edilir. Jel katılaştıktan sonra üzerine jeli kaplayacak kadar 1 MOPS solüsyonu dökülür. Ardından örnekler jel yükleme tamponu (Brom Fenol Blue (Cat No: İnvitrogen 10816-015)) ile boyanarak kuyucuklara yükleme işlemi yapılır. 90V'ta 30 dak. yürütüldükten sonra görüntüleme cihazında (Şekil: 3.5) UV ışık altında bant oluşumu gözlenir.

500 ml DEPC hazırlanışı;

500 ml saf su ve 500 µL DEPC (Cat No: Sigma D-5758) 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılıp ardından otoklavlanır.

20xMOPS solüsyonunun hazırlanışı:

(500 ml) 41,9 gr MOPS (Cat No: Sigma M-1254), 6,8 gr sodyum asetat (Cat No: Sigma S 2889), 2,6 gr EDTA (Cat No: Sigma 93283), 400 ml DEPC H₂O verilen miktarlarda homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra pH NaOH ile 7,0'a ayarlanır. Son olarak da DEPC'li su ile hacim 500 ml'ye tamamlanır.

1×MOPS solüsyonunun hazırlanışı;

%5 oranında sulandırma yapılarak, 19 birim saf su ve 1 birim 20 MOPS solüsyonu karıştırılarak hazırlanır.

3.2.6. Taqman Prob ve primer dizaynı

Çalışmada kullanılan genlere ait primer ve prob dizilimleri kaynak bilgileri şöyledir: miyosin ağır zincir (Gen Bank No: Z487941); aktin (Gen Bank No: AF3301421); EF-1a (Gen Bank No: NM_0011243391). Bu çalışmada kullanılan genlere ait primer ve propların baz dizilimleri, ürün uzunlukları (bç), gen bankası erişim numaraları ve hangi kaynaklardan alındığı Çizelge 3.2’de verilmiştir.

TaqMan primer ve prob dizaynında dikkat edilmesi gereken hususlar; (Dorak 2006)

1. Probun bağlanma sıcaklığı ileri ve geri primerlerin bağlanma sıcaklığından 10°C daha yüksek olmalıdır.
2. Probun 5’ ucu guanin içermemelidir.
3. Probun guanin-sitozin içeriği %35-65 olmalıdır.
4. Prob ikincil bir yapı oluşmaması için kendi kendine bağlanmamalıdır. İkincil yapı oluşumu hibridizasyon etkinliğini düşürebilir ve deneyin hassasiyetini azaltmaya sebep olabilir.
5. Prob gene spesifik bölgelerden seçilmelidir.
6. Prob primer dizileri üst üste gelmeden mümkün olduğu kadar ileri ve geri primerlere yakın olmalıdır.
7. Amplifikasyon bölgesi genellikle 60-150 bç arasında olmalıdır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ve Gökkuşığı alabalığı için hazırlanan primer ve propların baz dizilimleri

Genler	Primer/Prob	Baz Dizilimi (5'-3')	Ürün Uzunluğu (bç)	Gen Bankası Erişim Numarası	Kaynaklar
Miyosin ağır zincir	Forward	AGGGACAGTTCAAGGATGCG	124	Z48794.1	Primer ve proplar dizayn edildi.
	Reverse	AGCTCCTCGATTTCAGCCAC			
	Prob	^{FAM} - ATGATGCCGTCCGCGCTGCAGA ^{-TAMRA}			
Aktin	Forward	TCCACTTTCCAGGCCATGTG	121	AF3301421	Primer ve proplar dizayn edildi.
	Reverse	CGCGATCCAGAGAAAGCAGA			
	Prob	^{FAM} -ACGAGGCAGGCCCCAGCATTGT ^{-TAMRA}			
EF-1a	Forward	ACCCTCCTCTTGGTCGTTTC	62	NM_001124331	Aksakal <i>et al.</i> (2010)
	Reverse	TGATGACACCAACAGCAACA			
	Prob	^{FAM} - GCTGTGCGTGACATGAGGCA ^{-TAMRA}			

3.2.7. RT-PCR ile cDNA sentezi

Total RNA'lardan Super Script® III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat. No: 18080-044) ile cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Analizler süresince Thermo model RT-PCR kullanılmıştır (Şekil 3.7). cDNA kütüphanesinin oluşturulmasında aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. İzole edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçümlerle cDNA kütüphanesi oluşturmada kullanılacak konsantrasyonları hesaplanmıştır. Konsantrasyonlar $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde ayarlanmıştır.
2. 0,2 ml'lik PCR tüplerine $1 \mu\text{L}$ Oligo (dT)20 Primer ($50 \mu\text{M}$) ve $1 \mu\text{L}$ dNTP Mix ($10 \mu\text{M}$) eklenmiştir.
3. Toplam hacmi $13 \mu\text{L}$ 'ye tamamlamak için konsantrasyonu $1 \mu\text{g}$ olan total RNA'dan hesaplanan miktarda (x) eklenmiştir.
4. Üzerine $11-x \mu\text{L}$ ddH₂O ilave edilmiştir.
5. 65°C 'de 5 dak. PCR' da tutulmuştur. Ardından 1 dak. buz üstünde bekletilmiştir.
6. Daha sonra kısa süreli (5-10 sn) mikrosantrifüj yapılmıştır.
7. Ardından $4 \mu\text{L}$ 5x First Strand Buffer, $1 \mu\text{L}$ 0,1 M DTT, $1 \mu\text{L}$ RNase OUT™ (40 unit/ μL), $1 \mu\text{L}$ Super Script III RT (200 unit/ μL) eklenmiştir.
8. Yavaşça pipetaj yapılmıştır.
9. Önce 50°C 'de 45 dak.
10. Sonra 70°C 'de 15 dak. PCR'da tutulmuştur.
11. Böylece cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve örnek çalışılincaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.6. cDNA kütüphanesi oluşturmada kullanılan PCR.

3.2.8. Real time PCR uygulamaları

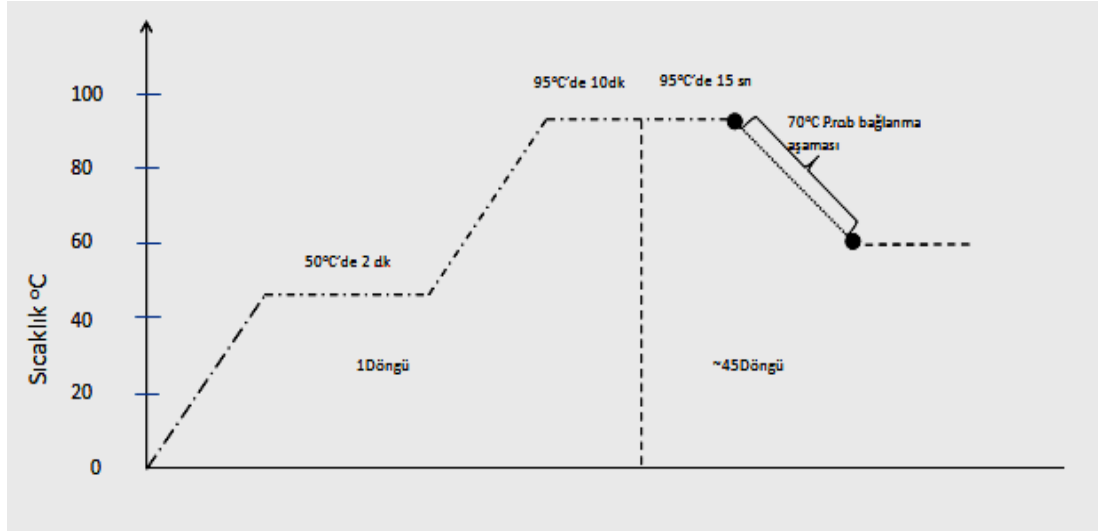
Oluşturulan cDNA kütüphanesinde ilgili genlerin kantitatif tayini sürecinde Real-time PCR kullanılmıştır. Bu amaçla gene spesifik primerler TaqMan prob ile işaretleme yapılarak gen ekspresyonu kantitatif olarak belirlenmiştir. Genlerin ekspresyon seviyeleri Real time PCR'da (Şekil 3.7) ilgili bölgenin çoğaltılması esnasında kantitatif olarak oluşan ürüne TaqMan probun bağlanması ve belirli dalga boyunda ışımaya yaparak absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülmektedir. FastStart TaqMan® Probe (Roche Cat. No: 04673417001) kullanılarak gerçekleştirilen Real time PCR karışımı ve protokolü sırasıyla Çizelge 3.1 ve Şekil 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.7. Real time PCR

Çizelge 3.2. Real time PCR karışımı

Bileşenler Konsantrasyon Hacim (μL)		
Bileşenler	Konsantrasyon	Hacim (μL)
FastStart TaqMan® Probe	2x	25
Hydroliz Prob	10 pmol	1
Forward primer	20 pmol	2
Reverse primer	20 pmol	2
cDNA		2
ddH ₂ O		18
Toplam hacim		50 μL



Şekil 3.8. Real time PCR protokolü

3.2.9. Gen ekspresyonu hesaplamaları

Deneme balıklarının gen ekspresyonunda hedef genler için spesifik olarak dizayn edilmiş primer ve problara ilişkin bilgiler Çizelge 3.2’de sunulmuştur. Genlerin mRNA seviyeleri her bir örnek için β -aktin ile standardize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ matematiksel modeline göre hesaplanmıştır (Livak and Schmittgen 2001).

$$\Delta\Delta Ct = (\text{Hedef Gen Ct} - \beta \text{ aktin Ct})_{\text{Muamele}} - (\text{Hedef Gen Ct} - \beta \text{-aktin Ct})_{\text{Kontrol}}$$

3.2.10. İstatistik analizler

İstatistik analizler SPSS 17,0 paket programında ANOVA yöntemi kullanılarak yapılmıştır. ANOVA testi sonucunda önemli çıkan grup ortalamaları arasındaki farklılığı tespit etmek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Balıkların Yaşama Oranı Değerleri ve Bazı Büyüme Parametreleri

Yapılan bu çalışmada farklı stok yoğunluklarının balıkların büyüme performansı üzerine etkileri araştırılarak elde edilen veriler Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Çalışmada balıkların başlangıç ağırlıkları, deneme sonu bireysel büyüme ortalamaları, canlı ağırlık artışı ve yem değerlendirme oranları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) başlangıç ağırlıkları (BA), son ağırlıkları (SA), spesifik büyüme oranı (SBO), oransal büyüme (OB), yem değerlendirme oranı (YDO) değerleri.

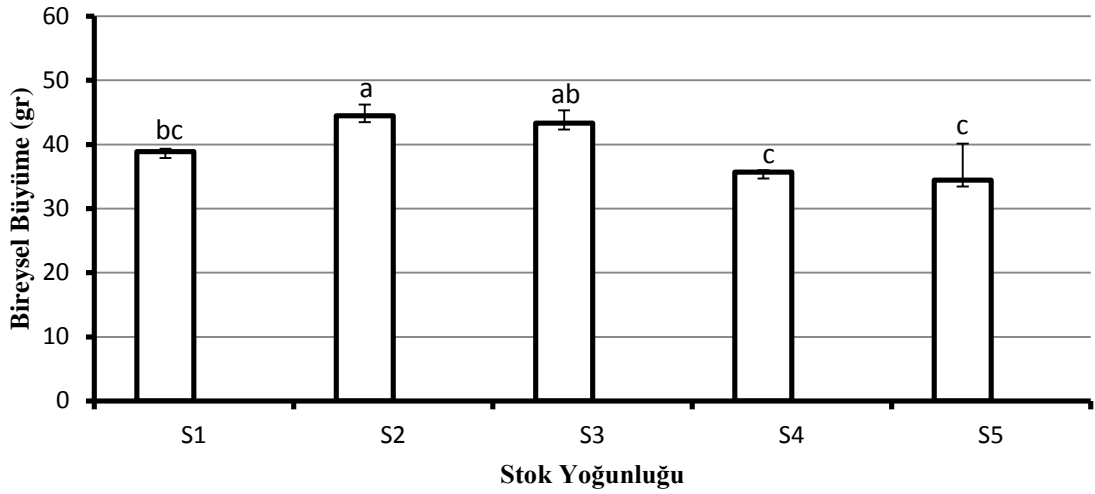
	S1	S2	S3	S4	S5
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
BA (gr)	15,16±0,04	15,157±0,15	15,147±0,208	15,13±0,36	15,16±0,40
SA (gr)	38,91±0,43 ^{bc}	44,48±1,77 ^a	43,33±2,00 ^{ab}	35,67±0,33 ^c	34,44±5,67 ^c
SBO (%)	1,57±0,21 ^{ab}	1,79±0,06 ^a	1,75±0,76 ^a	1,42±0,17 ^b	1,35±0,28 ^b
OB (%)	249,02±2,74 ^{bc}	282,49±11,22 ^a	273,91±12,64 ^{ab}	223,53±2,09 ^{cd}	210,13±34,59 ^d
YDO (%)	0,889±0,067 ^{ab}	0,718±0,123 ^a	1,041±,189 ^a	0,947±0,960 ^b	1,389±,601 ^b

Başlangıç ağırlıkları (BA), son ağırlıkları (SA), spesifik büyüme oranı (SBO), oransal büyüme (OB), yem değerlendirme oranı (YDO) değerleri.

a-d: Aynı satırda farklı harflerle belirtilen ortalamalar arasındaki fark ($p < 0,05$)’e göre önemlidir.

4.2. Bireysel Ortalama Canlı Ağırlık Miktarları

Üzerinde çalışılan balık materyalinin farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) bireysel ortalama canlı ağırlıklarına ait deneme sonu verileri Çizelge 4.1’de ve sunulmuştur. En yüksek ortalama ağırlık 44,48±1,77 gr ile S2 stoğunda en düşük ortalama ağırlık ise 34,44±5,57 gr ile S5 stoğunda tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca S5 stoğuna en yakın değer 35,67±5,67 ile S4 stoğu olmuştur. Diğer yandan S1 stoğu 38,90±0,43 ile S3 ve S4 arasında değer almıştır.

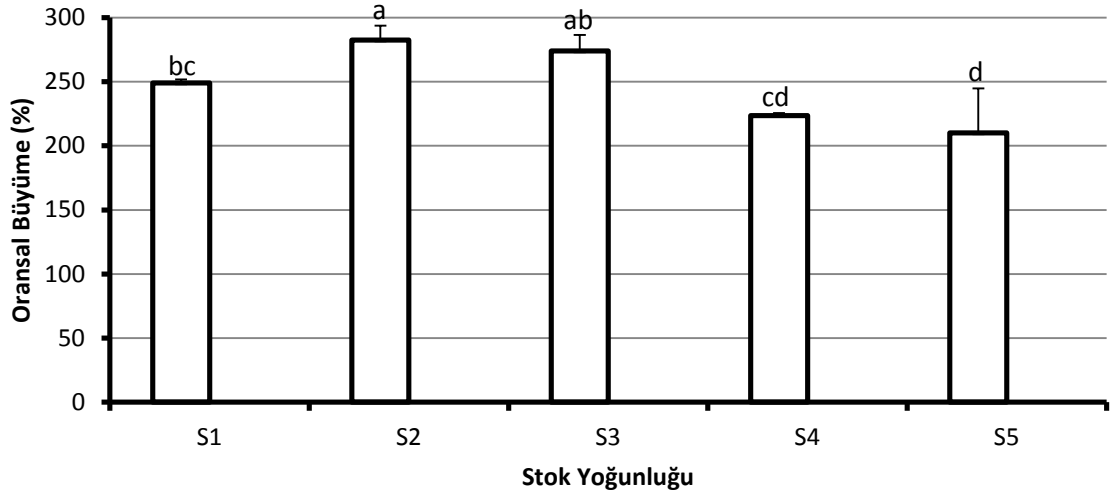


Şekil 4.1. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) deneme sonu bireysel ortalama canlı ağırlık miktarları (gr).

Deneme sonunda S2 ile S3 stoklarının bireysel büyüme farklılıkları istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Ayrıca S1, S4 ve S5 stokları arasında da bireysel büyüme farklılıkları ($p>0,05$)'e göre istatistiki yönden önem taşımadığı ortaya çıkmıştır. Diğer yandan S1, S3 stoklarına oluşturduğu grupla S4, S5 stoklarının oluşturduğu grup karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel yönden önemli bulunduğu görülmüştür ($p<0,05$).

4.3. Oransal Büyüme

Çalışmada kullanılan gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) oransal büyümeleri yüzde olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.2'deki bilgilere göre en düşük oransal büyüme değerine $210,13\pm 2,74$ ile S5 stok yoğunluğunda karşılaşılmıştır. S5 stok yoğunluğu oransal büyüme değerine en yakın $223,53\pm 2,09$ ile S4 stoğu olmuştur. Diğer yandan en yüksek oransal büyüme değerine $282,49\pm 11,22$ ile S2 stoğunda karşılaşılmıştır. İkinci ve üçüncü en yüksek oransal büyüme değerlerini sırasıyla S3, S1 stok yoğunlukları ($273,91\pm 12,64$, $249,02\pm 2,74$) takip etmiştir.



Şekil 4.2. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) deneme sonu oransal büyüme yüzde değerleri.

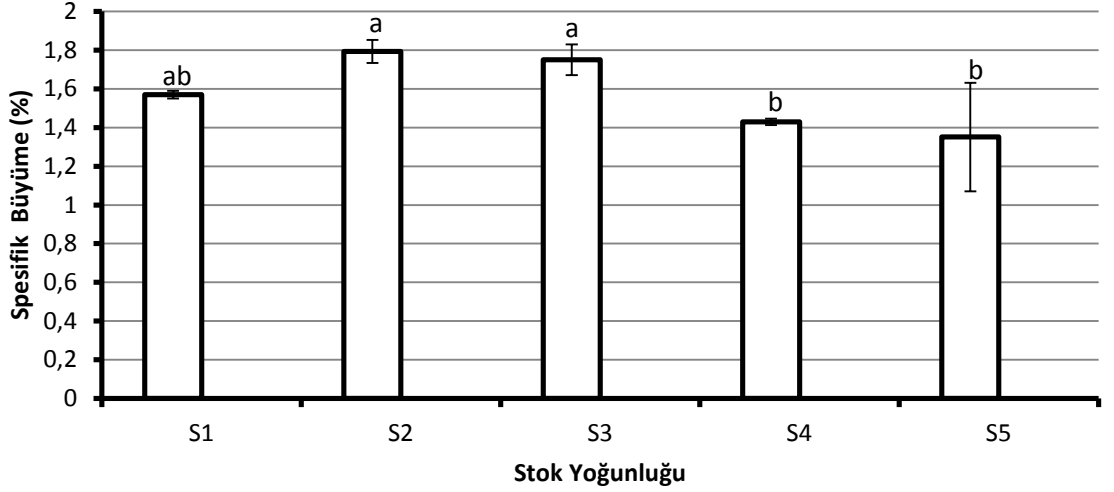
Elde edilen veriler sonucunda S2 ile S3 stokları arasında oransal büyüme bakımından istatistiki farklılığın önem arz etmediği belirlenmiştir ($p>0,05$). Aynı şekilde S1, S4, S5 stokları arasında da bu durum söz konusudur. Diğer yandan S2, S3 stoklarının oluşturduğu grup ile S1, S4, S5 stoklarının oluşturduğu grubun karşılaştırma verileri sonucunda istatistiksel farklılığın önemli olduğu ortaya konulmuştur ($p<0,05$).

4.4. Spesifik Büyüme

Balıkların belirli bir zaman aralığı içindeki büyüme değerleri olan spesifik büyüme oranları yüzde olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.3'teki grafik verilerinde de görüldüğü üzere en düşük spesifik büyüme değeri $1,35\pm 0,28$ ile S5'te, en yüksek değer ise $1,79\pm 0,28$ ile S2 stoğunda bulunmuştur.

Çalışma eldelerine göre S1, S2, S3 stok gruplarının spesifik büyüme yüzdelerinin istatistiki sonuçları önemsiz kabul edilmiştir ($p>0,05$). Aynı şekilde S4, S5 stok gruplarında spesifik büyüme yüzdelerinin istatistiki sonuçları ($p>0,05$)'e göre önemsiz bulunmuştur. Ancak S2, S3 stoklarının oluşturduğu grupla S4, S5 stoklarının

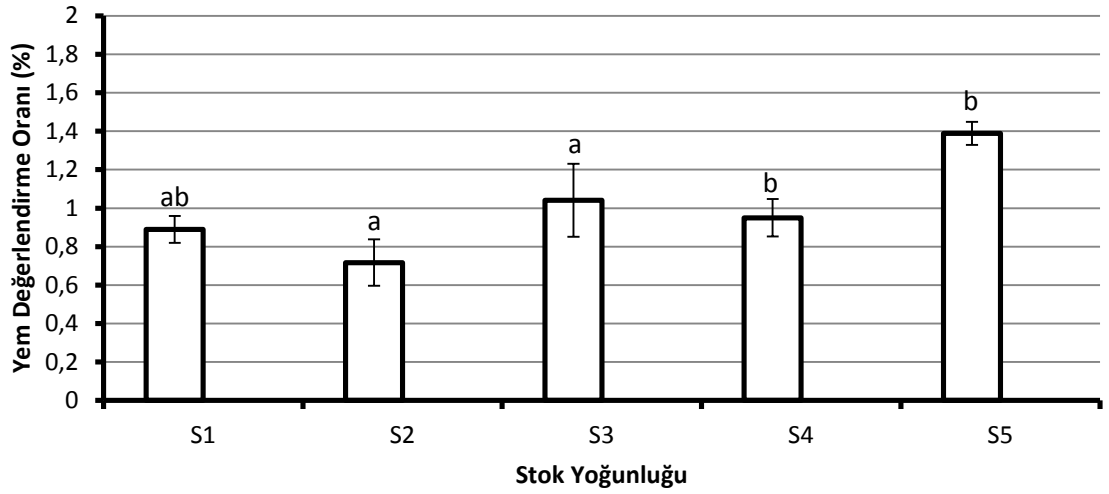
oluşturduğu grubunun karşılaştırması durumunda spesifik büyüme, istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.3. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşığı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) deneme sonu spesifik büyüme (%) değerleri.

4.5. Yem Değerlendirme

Balık materyalinin toplam yem tüketiminin (gr) yine balık materyalinin ortalama ağırlık kazancına (gr) bölünmesinden elde edilen sonucun balık sayısı ile çarpımından elde edilen sonuç yem değerlendirme oranını (YDO) vermektedir. Üzerinde çalışılan balık materyalinin yem değerlendirme oranları yüzde olarak hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre en yüksek orana $1,389\pm 0,060$ ile S5 stoğu ve en düşük orana ise $0,72\pm 0,12$ ile S2 stoğu sahip olmuştur.



Şekil 4.4. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşaağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) deneme sonundaki yem değerlendirme oranları (%)

Çalışmada elde edilen verilerine göre S2 ve S3 stokları arasındaki yem değerlendirme oranları (%) bakımından farklılıklarının istatistiksel olarak önem arz etmediği ortaya çıkarılmıştır ($p>0,05$). Aynı zamanda S4 ve S5 stokları arasında da yem değerlendirme oranları ($p>0,05$)'e göre istatistiksel olarak önemsiz kabul edilmiştir. Diğer yandan yem değerlendirme oranları bakımından benzerlik gösteren stok grubu olan S2, S3, yine kendi aralarında yem değerlendirme oranları bakımından benzerlik gösteren S4, S5 stok grubu arasındaki yem değerlendirme oran değişimleri ($p<0,05$)'e göre istatistik bakımından önemli bulunmuştur.

4.6. Balıkların Kas Dokularından Elde Edilen RNA'lara Ait Elektroforez Görüntüleri, Konsantrasyon Değerleri, 260/280 Oranları

Ribozomal RNA (rRNA), ribozomlarda yer alan bir RNA tipidir ve ribozomun protein senteziyle ilişkili katalitik fonksiyonundan sorumludur. Yüksek yapıli organizmalarda ribozom iki altbirimden oluşur, bunlardan her biri rRNA ve proteinlerden meydana gelmektedir. Bundan dolayı elektroforez işlemi sonucunda 18S rRNA ve 28S rRNA olmak üzere iki bant elde edilmektedir (Winnebeck *et al* 2010).

Bantta elde edilen görüntü total RNA'dır; ancak rRNA total RNA'nın %80'ini oluşturduğu için mRNA'da izole olmuştur denilebilir. Elde edilen total RNA'ların saflığı 260 ve 280 nm'de ölçülen absorbans oranlarıyla (260/280) belirlenebilmektedir. Absorbans oranları bazların doğasına ve ekstraksiyon katsayısına bağlı olarak değişiklik arz etmektedir. Saf olarak elde edilen RNA'nın 260/280 oranı 2,0 civarındadır. Diğer yandan bu oran DNA için 1,8, proteinler için 0,57'dir. Yapılan çalışmada nanodrop (RNA örneklerinin kalite ve miktar tayini için kullanılan cihaz) spektrofotometre ile ölçülen 260/280 oranının 2,0 olması RNA izolasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığını gösterir (Şekil 3.4). RNA'lara ait konsantrasyonlar cDNA kütüphanesine koyulması gereken uygun total RNA'ları fazlasıyla içermektedir (Aksakal 2013).

Çizelge 4.2. Total RNA konsantrasyonları (ng/μL) ve A₂₆₀/A₂₈₀ (nm) oranları

Gruplar*	Konsantrasyon (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Elektroforez
S1	1345,00	2,10	+
S1	1240,31	2,16	+
S1	2013,15	1,83	+
S1	1566,23	2,08	+
S1	1765,23	2,06	+
S1	1872,54	1,97	+
S1	2234,92	1,10	+
S1	2266,69	1,64	+
S1	2353,54	1,61	+
S1	1101,92	2,17	+
S1	1829,92	2,02	+
S1	1932,62	2,12	+
S2	2652,50	1,58	+
S2	2574,19	1,84	+
S2	1348,73	2,13	+
S2	2018,80	2,12	+
S2	979,04	2,16	+
S2	2574,42	1,84	+
S2	2263,88	2,06	+

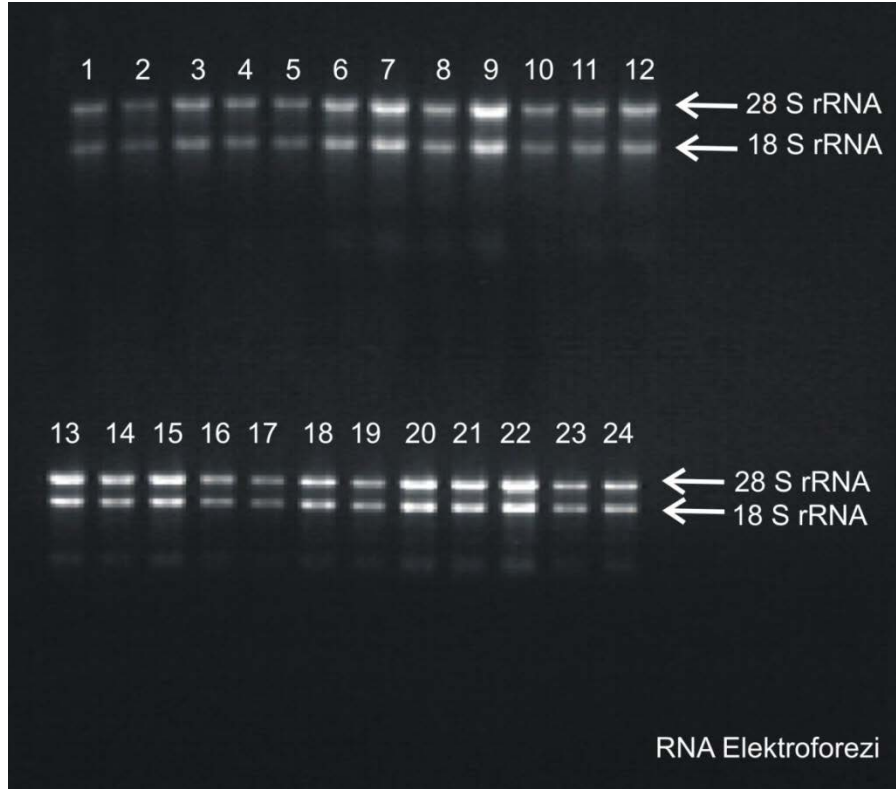
Çizelge 4.2. (devam)

Gruplar*	Konsantrasyon (ng/ μ L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Elektroforez
S2	2523,19	1,91	+
S2	1594,81	2,14	+
S2	2318,04	2,05	+
S2	1755,96	2,15	+
S2	1692,96	2,12	+
S3	1377,15	2,10	+
S3	1833,23	2,13	+
S3	1032,00	2,15	+
S3	1459,38	2,08	+
S3	739,62	2,16	+
S3	1294,00	2,18	+

*S1: 15 kg/m³ (66 adet/m³), S2: 20 kg/m³ (100 adet/m³), S3:25 kg/m³ (120 adet/m³), S4:30 kg/m³ (133 adet/m³), S5 35 kg/m³ (166 adet/m³)

4.7. RNA Elektroforezi

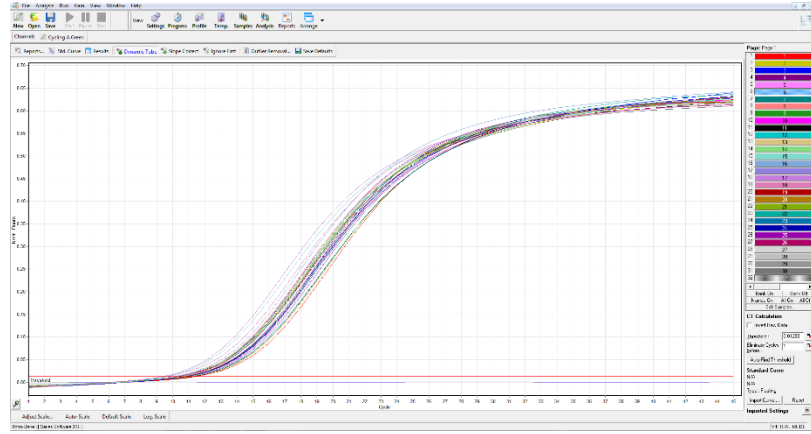
Elektroforez işlemi agaroz jel içerisinde elektriksel alana maruz bırakılan, DNA veya RNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılmasıdır. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Ayırıcı matris olan agaroz jeli agaroz ve tampondan oluşmaktadır. Bu yöntem kullanılarak PCR ürünlerinin, izole edilen DNA'ların, restriksiyon enzim kesimi sonucu oluşan ürünlerin, sekans işlemi için hazırlanan ürünlerin boyutlarının kontrolü ve yoğunluğu belirlenebilmektedir.



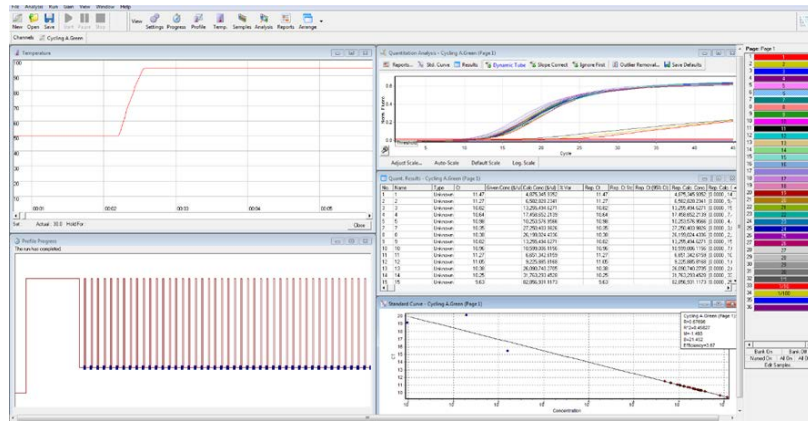
Şekil 4.5. RNA'nın kantitatif tayini

4.8. Real Time PCR Analizleri Sonucu Elde Edilen Amplifikasyon ve Standart Eğri İle Primer Etkinlik Oranı

Yapılan araştırmada aktin, miyosin ve elengasyon faktörünün mRNA seviyesinin belirlenmesinde RT-PCR kullanılarak amplifikasyon görüntüleri elde edilmiştir. İlk anlamlı artışın olduğu yerin piklerin treshold çizgisini kestiği noktadır ve pikler demet halinde yükselip 45'inci döngüden sonra birleşmeye başlamıştır (Şekil 4.6), (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Gen örneklerinin RT-PCR uygulaması ile elde edilen amplifikasyon görüntüsü



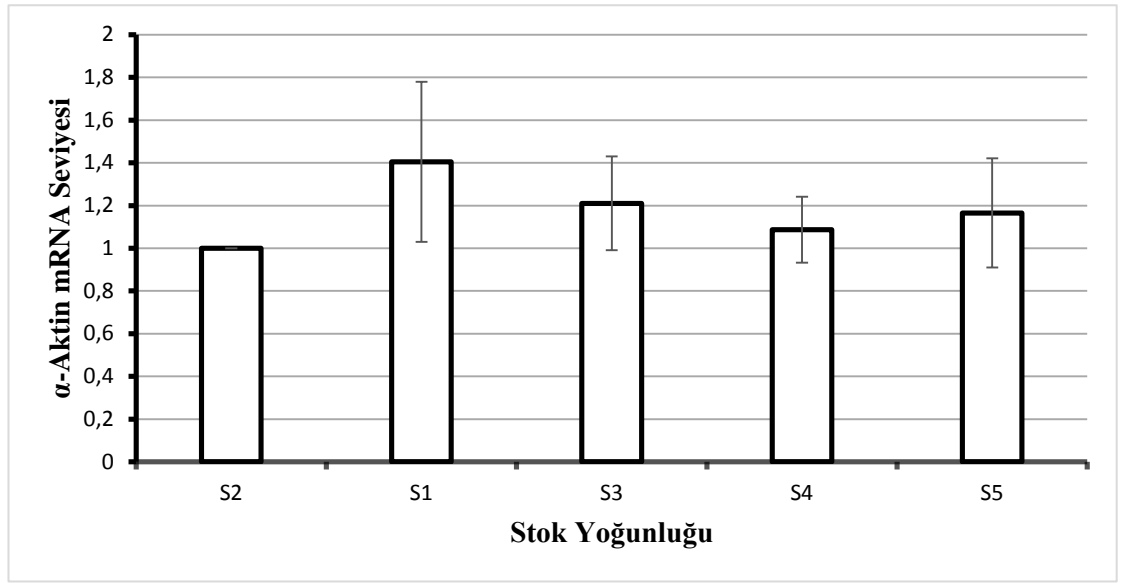
Şekil 4.7. Gen örneklerinin RT-PCR uygulaması ile elde edilen standart eğrisi, primer etkinlik oranları ve amplifikasyon görüntüsü

Amplifiye edilen DNA kopya sayıları primer etkinlik oranına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Primer etkinlik oranı %100'e yaklaştıkça elde edilen DNA miktarında bu orana paralel olarak artış gösterir.

Standart eğri grafiklerine göre primer etkinlik oranı aktin, miyosin ve elengasyon faktörü için sırasıyla %95,97, %98,20, %99,33 olarak bulunmuştur.

4.9. Balıkların Kas Dokusundan Elde Edilen Aktin mRNA Seviyesi

Çalışmada elde edilen verilere göre aktin mRNA seviyesi en yüksek değer $1,404 \pm 0,38$ ile S1 stoğunda görülmüştür. Diğer yandan aktin mRNA seviyesi en düşük değer $1,087 \pm 0,15$ ile S4 stoğunda bulunmuştur (Şekil 4.8), (Çizelge 4.3).

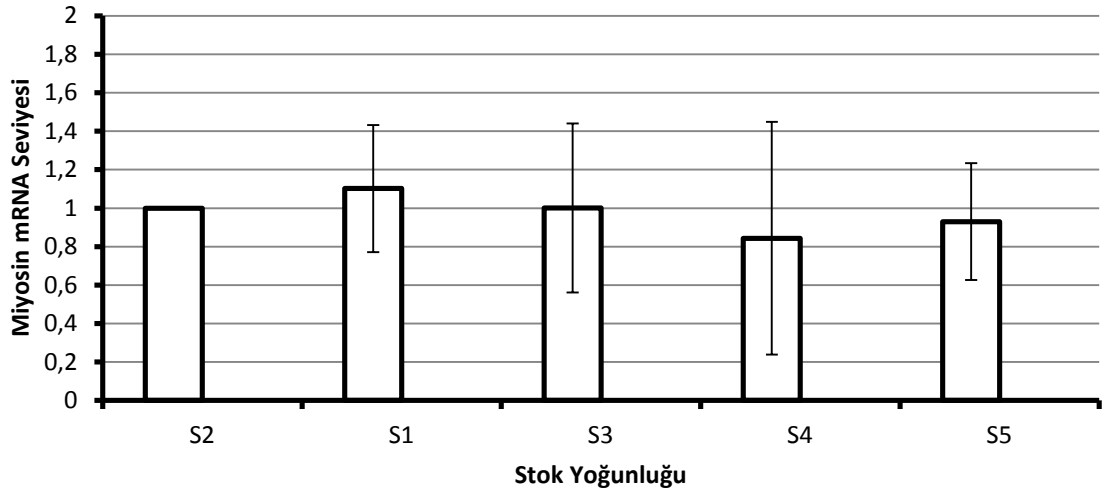


Şekil 4.8. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) aktin mRNA seviyesi

S2 kontrol grubu olarak seçildiği için S2 stoğunun mRNA ekspresyonu seviyesine göre en yüksek ve en düşük değerler seçilmiştir. Diğer yandan S1, S2, S3, S4, ve S5 stok yoğunluklarının aktin mRNA seviyesi bakımından farklılıkları istatistiki olarak önem arz etmediği belirlenmiştir ($p > 0,05$).

4.10. Balıkların Kas Dokusundan Elde Edilen Miyosin mRNA Seviyesi

Çalışma sonunda ulaşılan verilere göre aktin mRNA seviyesi en yüksek değer $1,102 \pm 0,33$ ile S1 stoğunda görülmüştür. Diğer yandan aktin mRNA seviyesi en düşük $0,843 \pm 0,60$ ile S4 stoğunda bulunmuştur (Şekil 4.9), (Çizelge 4.3).



Şekil 4.9. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) miyosin mRNA seviyesi

Kontrol grubu olarak seçilen S2 stoğu mRNA ekspresyonu seviyesi dışındaki en yüksek ve en düşük değerler seçilmiştir. S1, S2, S3, S4, ve S5 stok yoğunluklarının miyosin mRNA seviyesi bakımından farklılıkları istatistiki olarak önem arz etmediği belirlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.3. Farklı stok yoğunluklarında yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) aktin ve MYC değerleri

	S2	S1	S3	S4	S5
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
Aktin	1,000±0,00	1,045±0,381	1,210±0,22	1,087±0,15	1,173±0,26
MYC	1,000±0,00	1,102±0,33	1,001±0,45	0,843±0,61	0,930±0,30

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Balık Ağırlıkları, Bazı Büyüme Parametreleri

Balık yetiştiriciliğinde ana hedef canlı ağırlık artışının yani et veriminin arttırılmasıdır (Aras 2000; Sirkecioğlu 2011). Birim alandan en yüksek verimi almak için farklı stok yoğunluğu uygulama çalışmaları birçok kültür balığı türünde yapılmaktadır. Çalışma materyali olarak kullanılan gökkuşağı alabalığı için tarama sonuçlarına göre stok yoğunluğu çalışmaları 1977 yılında Kilambi *et al.* (1977) tarafından başlanmıştır. Yeni bir yetiştiricilik sistemi olan ve ülkemizde gün geçtikçe yaygınlaşan kanal balığı yetiştiriciliğinde stok yoğunluğunun belirlenmesi ve stok yoğunluğunun bu sistemde büyüme performansları üzerine etkisi bu çalışma ile yeni bir araştırma alanı oluşturmaktadır.

Çalışma sonucunda balık ağırlık artışlarının farklı stok yoğunluklarında değişiklik arz ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Stok yoğunluğunun stres eşiği derecesini aştığı zamanlarda her bir balığın yem alım derecesini etkilemiş ve bu nedenle de stoklar arasında ve aynı stok yoğunluğundaki balıklar arasında ağırlık farklılıklarının oluşmasına neden olmuştur. İlk ağırlık ortalamaları 15 gr civarında olan stokların son ağırlık ortalamaları 34-44 gr arasında değişim göstermiştir. Diğer yandan optimum şartlara en yakın değerler 44,48 gr ile S2 (100 adet/m³) stoğunda görülmüştür. Kontrol grubu olarak belirlenen S2 grubundan itibaren stok yoğunluğu artttıkça S4 ve S5 stoklarında deneme sonu bireysel büyüme miktarında düşüş tespit edilmiştir (p<0,05). Bu veriler (North *et al.* 2006; Mckenzie *et al.* 2012) yaptıkları stok yoğunluğu çalışmalarında yüksek stok yoğunluğunun gökkuşağı alabalığında büyüme oranlarını olumsuz etkilediği sonuçları ile paralellik göstermiştir. Ancak Bircan 1997 ve Sırakov and Ivancheva 2008, farklı stok yoğunluğunun gökkuşağı alabalıklarının büyüme oranlarını etkilemediğini bildirmişlerdir. Bu iki çalışmada stok yoğunlukları 10 kg/m³, 15 kg/m³ ve 18 kg/m³ olarak dar bir aralıkta belirlenmesi sonucu olduğu düşünülmektedir ve bu sonuçlara göre mevcut çalışmada yakın stok aralıklarında olan S2 (100 adet/m³) ve S3 (120 adet/m³) stokları arasında araştırma verileri bakımından

benzerlik görülmektedir. Aynı şekilde benzer stok miktarları olarak belirlenen S4 ve S5 gruplarında da $p>0,05$ 'e göre farklılık bulunmamıştır. Stok yoğunluğunun en az olduğu S1 (66 adet/m³) grubunun kontrol grubundan daha düşük oranda büyüme göstermesi ise yetiştiricilik sisteminde yüksek su akış hızının var oluşu nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir ($p<0,05$).

Spesifik büyüme oranı bakımından araştırma sonuçları incelendiğinde deneme sonu bireysel büyüme miktarları ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda bu iki parametrenin birbirini desteklemesi beklenmektedir.

Sonuç olarak kanal sistemlerinde ideal stok miktarının kontrol grubu ile istatistiki olarak benzerlik gösteren S3 (120 adet/m³) olduğu çalışma verileri ile ortaya konulmuştur. Stok yoğunluğunun stres eşiğini geçmeyecek şekilde artırılıp balıklardaki aşırı hareketliliğin önüne geçilmesi ve diğer yandan da her balığın aynı oranda yem alma değerlerinin korunması için aşırı yoğunluğun önüne geçilmesiyle ideal stok şartlarının oluştuğu kanaatine varılmıştır.

5.2. Yem Değerlendirme Oranı

Balıklarda büyümenin en önemli göstergelerinden biri de yem değerlendirme oranıdır. Kültür balıkçılığında başarının sağlanması için minimum seviyede yem kullanılarak maksimum seviyede büyüme elde edilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı yem değerlendirme oranının birden küçük ($YDO<1$) olması arzulanmaktadır (North *et al.* 2006; Person *et al.* 2008; McKenzie *et al.* 2012). Yem değerlendirme oranlarının farklı stok yoğunlukları uygulamalarından etkilenmediğini gösteren çalışmalar olmasına rağmen bu parametre bakımından m³ başına farklı miktarlarda stoklanan balıkların stok yoğunluğuna bağlı farklılıklar gösterdiğini belirten araştırmalarda bulunmaktadır (Bircan 1997; Sırakov 2008; Şahin vd 2013). Bu iki farklı görüşün meydana çıkmasının ana sebebi çalışmalarda kullanılan stok yoğunluk oranlarıdır. Çünkü bazı çalışmalarda denemede kullanılan stok yoğunlukları birbirine çok yakın belirlenirken, diğerlerinde aşırı yoğun stoklar ile optimum ve düşük stok yoğunlukları belirlenmiştir. Ayrıca

günümüze kadar yapılan çalışmalarda yetiştiricilik sistemi olarak deniz, göl ve karasal havuz sistemleri kullanılırken bizim çalışmamızda sulama kanallarında kafes sistemi uygulaması yapılmıştır.

Yapılan ölçümler sonucunda bireysel büyüme miktarı (gr), oransal ve spesifik büyüme oranı ile sonuçların benzerlik gösterdiği Çizelge 4.1'de görülmektedir. Besleme çalışmalarında balıkların büyüme oranları ile yem değerlendirme oranları arasında paralel bir ilişkinin olduğu sonuçları ile mevcut araştırma bulguları örtüşmektedir (Çelikkale 1994; Aras 2000).

5.2. Balıkların Kas Dokusundan Elde Edilen Aktin ve Ağır Zincir Miyosin mRNA Seviyesi

Kasın proteinel yapısını oluşturan ve kontraktıl fonksiyonlarını yerine getirmek için organize olan aktin ve ağır zincir miyosin, hareket sisteminin yanında büyüme ile de yakın ilişki içerisinde dir.

Aksakal *et al.* (2011), stok yoğunluğu artışı ile stres geninin (HSP 70) mRNA ekspresyonu artışı arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Diğer yandan Hevroy *et al.* (2006), yaptıkları çalışmaya göre diyet içeriğine farklı oranlarda karışımı sağlanan yüksek protein konsantrasyonunun miktarı arttıkça büyümeye bağlı olarak MyHC'nin ekspresyonu artış değerliğe sahip pozitif korelasyon gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlar bizim yaptığımız çalışmanın sonuçlarıyla çelişmektedir.

Balıklarda büyüme sisteminin düzenlenmesinde kas kütlesi arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Kütlesel artış kas yapısının oluşması ile meydana gelirken buna paralel olarak kasın yapısında bulunan aktin ve ağır zincir miyosin proteinleri miktarında da artış meydana gelmektedir (Johnston *et al.* 2011). Bu iki proteinin mRNA ekspresyon miktarları belirlenmiştir. Farklı stok yoğunluklarının balıkların kas aktin proteininin mRNA ekspresyon seviyesi üzerine $p>0,05$ 'e göre farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bu sonuçlara benzer olarak ağır zincir miyosin proteini bakımından da stoklar arasında

istatistiki olarak farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Kas proteinleri balıkların erken gelişim döneminde büyümeye bağlı olarak hızlı bir şekilde artarken yaşın ilerlemesi ile bu hız düşüş göstermektedir (Poompuang and Panprommin 2010). Embriyonik dönemde gelişimin hızlı olması nedeniyle kuluçka evresinde kas gelişimine paralel olarak kas proteinlerinde artış olmasına rağmen balıkların yumurtadan çıkmasından itibaren ileri dönemelerde yeni doku oluşumundan ziyade mevcut dokularda gelişim ve kütleli artış meydana gelmektedir. Balıklarda büyüme kaslarda yeni miyofibrillerin teşekkülü, mevcut miyofibrillerin çaplarının artması ve hem yeni myofibril üretimi hem de çap genişlemesinin aynı anda artmasıyla meydana gelmektedir (Johnston *et al.* 2011). Diğer taraftan iskelet kas proteinlerinin mRNA seviyelerindeki farklılıkların çevresel faktörlerden ve yem alımından kaynaklandığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Liang *et al.* 2013; Dhillon 2009). Bu bulgular çalışma sonuçlarımıza göre elde edilen hem aktin hemde ağır zincir miyosin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerine stok yoğunluğu etkisinin olmadığı sonuçlarını desteklediği düşünülmektedir. Sonuç olarak;

1. Kanal sistemlerinde gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliğinde en uygun stok yoğunluğunun (başlangıç ortalama ağırlıkları 15 gr olanlar için) m^3 'e 100 birey yani satış ağırlığına gelinceye kadar $20 \text{ kg}/m^3$ olduğu belirlenmiştir.
2. Stok yoğunluğunun balıkların yem değerlendirme oranına etki ettiği, tüm uygulama gruplarına vücut ağırlıklarının %3'ü kadar yem verilmesine rağmen kalabalık yetiştiriciliğin yem değerlendirme oranını düşürdüğü sonucuna varılmıştır.
3. Kanal sistemlerinde yapılan farklı stok yoğunluk uygulamalarının, yetiştirilen balıkların ağırlık kazançları ile iskelet kası proteinleri olan aktin ve ağır zincir miyosin mRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde bir etkisi olmadığı bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Akpınar Z., 2010. Stok Yoğunluğunun Minekop (*Umbrina cirrosa*, Lin. 1758) Yavrularının Yaşama Oranları ve Büyüme Performansarı Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Aksakal E., Ceyhun S.B., Erdoğan O., Ekinci D., 2010. Acute and long-term genotoxicity of deltamethrin to insulin-like growth factors and growth hormone in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 152(4):451-5.
- Aksakal E., Ekinci D., Erdoğan O., Beydemir Ş., Alım Z., Ceyhun S.B., 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic–antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Livestock Science*, Volume 141 (1), Pages 69–75.
- Aksakal F.İ., 2013. Yüksek lisans tezi. Farklı yağ kaynağı içeren diyetlerin gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) bazı büyüme (GH-I), (IGF-1), (IGF-2) ve immün sistem (TGF- β) genleri ekspresyonu üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Sayfa 41.
- Altınçekiç Ş. Ö., Koyuncu M., 2012. Derleme. Çiftlik Hayvanları ve Stres. Hayvansal Üretim. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Görükle, Bursa. Sayfa 27, 28, 29.
- Anonymous, 2014a. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/398553/muscle/58918> (01.05.2014).
- Anonymous, 2014b. http://www.nooruse.ee/e-ope/opiobjektid/lihasfysioloogia_alused (01.05.2014).
- Anonymous, 2014c. <http://www.studyblue.com/notes/n/md-2015-study-guide-2011-12-hucm/deck/9730836> (01.05.2014).
- Anonymous, 2014d. <http://quizlet.com/40245813/bsci-201-practical-3-flash-cards/> (04.05.2014).
- Anonymous, 2014e. <http://www.studyblue.com/notes/n/muscle/deck/1053395> (07.05.2014).
- Anonymous, 2014f. <http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/MCB6/ch17/17-33.jpg>. (02.06.2014).
- Aras N., Kocaman E.M., Aras M.S., 2000. Genel Su Ürünleri ve Kültür Balıkçılığı Temel Esasları. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Su Ürünleri Bölümü, Erzurum Yayın No:216.
- Backward movements of cross-bridges by application of stretch and by binding of Mg ADP to skeletal muscle fibers in the rigor state as studied by x-ray diffraction. *Biophysical Journal.* 76(4): 1770–1783.
- Bagni M., Civitareale C., Periori A., Ballerini A., Finioia M., Brambilla G., Marino G., 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Sciencedirect*, Volume 263, Issues 1-4, Pages 52-60.
- Bahuaud D., Morkore T., Qstbye T.-K., Veiseth-Kent E., Thomassen M.S., Ofstad R., 2009. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmedAtlantic salmon (*Salmo salar L.*) pre- and post-rigor fillets exposed to

- short and long-term crowding stres. Food Chemistry, Volume 118, Issue 3, Pages 602-615
- Bingöl A. F., Mutluer N., 1992. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji ABD, Ankara, T. Klin. Tıp Bilimleri, Ankara.
- Bircan R., 1997. Effect of different stocking densities on growth and food conversion ratio of *Oncorhynchus mykiss* reared in plastic net cages in the Bafra-Derbent Dam Lake, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, Volume: 21 (3), 431-438.
- Brenner T., 2009. Aggregation behaviour of cod muscle proteins. PhD thesis, Department of Chemistry, Faculty of Physical Sciences, Reykjavik.
- Bryson-Richardson R.J., Daggett D.F., Cortes F., Neyt C., Keenan D.G., Currie P.D., 2005. Myosin heavy chain expression in zebrafish and slow muscle composition. 233: 1018-1022.
- Ceylan Ö., 2009. İmmobilizasyon ve Denervasyon Atrofilerinin Histo-Morfolojik Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2.Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İzmir. Sayfa12,13.
- Costas B., Aragao C., Mancera j. M., Dinis M.T., Conceiçao L., 2007. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in *Senegalese sole Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. The Journal of nutrition 130 (11), 2809-2812.
- Çelikkale M.S., 1994. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Cilt 2, s. 460, Trabzon.
- Demirkazık A., 2005. AC Manyetik Alanların Deneysel Olarak Oluşturulan Diyabetli Sıçanların Diyafram Kaslarının Mekanik Özellikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Sayfa 21,22.
- Dhillon R.S., 2009. Growth and myosin heavy chain expression in the white muscle of juvenile walleye (*Sander vitreus*). Master. A thesis submitted to the Department of Biology in conformity with the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Queen's University Kingston, Ontario, Canada, 130.
- Dorak, M. T., 2006. High-Throughput Primer and Probe Design. Real Time PCR, Elizabeth Owen, Kirsty Liyonsm, Karin Henderson. Taylor-Francis Group, 93-105, Newyork.
- Ebashi S., 1976. Excitation-contraction coupling. Annual Review of Physiology, Vol. 53 (1-17).
- Elmqvist D., Hoffman W. W., Kugelberg J., Quastel M. J., 1964. An Electrophysiological Investigation Of Neuro Muscular Transmission In Myasthenia Gravis. Page 417-434.
- Erik Z., 2009. Dev Trombositli Hastalarda MYH9 Geninde Mutasyon Taraması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C., and Hultin, H.O., 1996. Characteristics of edible muscle tissues, in Food Chemistry, O.R. Fennema, Editor. CRC Press: New York. p. 879-942.
- Guyton and Hall, 2006. Tıbbi Fizyoloji Kitabı, Nobel Tıp Kitapevleri, 11. Basım, 94.
- Hevroy E.M., Jordal A-E.O., Hordvik I., Espe M., Hemre G-I., Olsvik P.A., 2006. Miyosin heavy chain mRNA expression correlates higher with muscle protein accretion than growth in Atlantic saolmon, *Salmo salar*. Aquaculture, Volume 252 (2-4), Pages 453-461.

- Huss, H.H., 1998. Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO, Technological.
- Johnston A., Bower N.I., Macqueen D.J., 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. US National Library of Medicine, 15;214 (Pt 10) :1617-28.
- Kilambi R. V., Adams J. C., Brown A. V., 1977. Effects of stocking density and cage on growth, feed conversion, and production of rainbow trout and channel catfish. The Progressive Fish-Culturist, Volume 39 (2), pages 62-66.
- Küçük E., 2008. Balık Yetiştiriciliğinde Stres. Yunus Araştırma Bülteni, 8:2, Sayfa 4-8
- Liang X., Chu W., Li Y., Wang K., Chen D., Li H., Zhang J., 2013. Expression and functional analyses of two essential myosin light chains from the fast white muscle of the spotted mandarin fish *Siniperca scherzeri*. Research Article, Turk J Biochem, 2013; 38 (3) ; 350-355.
- Livak K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. 25(4), Methods, 402-408.
- McKenzie D.J., Höglund E., Dupont-Prinet A., Larsen V, Skov P.V., Pedersen P.B., Jokumsen A., 2012. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. Aquaculture, Volumes 338-341, Pages 216-222.
- McNeil P. L. And Khake R., 1992. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. US National Library of Medicine, 140(5):1097-109.
- North B.P., Turnbull J.F., Ellis T., Porter M.J., Migaud H., Bron J., Bromage N.R., 2006. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, Volume 255, (1-4), Pages 466-479.
- Öğüt, H. 2005. Balıklarda Stres, Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri, (Editör: M. Karataş), Nobel Yayıncılık, 498 s.
- Person J., Ruyet L., Labbe L., Bayon N. L., Severel A., Roux A. L., Delliou H. L., Quemener L., 2008. Combined effects of water quality and stocking density on welfare and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Living Resour. 21, 185-195.
- Poompuang S., Panprommin D., 2010. Expression of four muscle proteins at different growth stages of Günther's walking catfish *Clarias macrocephalus*. Aquaculture, Fisheries & Fish Science, Volume 41 (9), pages e144-e154.
- Potter J. D., Gergely J., 1974. Troponin, Tropomyosin, and Actin Interactions in the Ca^{++} Regulation of Muscle Contraction. Page 2697-2699.
- Sırakov I., Ivancheva E., 2008. Influence of stocking density on the growth performance of rainbow trout and brown trout grown in recirculation system. Bulg. J. Agric. Sci., 14: 150-154.
- Sirkecioğlu A.N., 2011. Doktora tezi. Sıcaklığın ve farklı yağ kaynaklarının gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansı, lipid metabolizması ve ilgili bazı genlerin ekspresyonu üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliği. Sayfa 16.
- Skjervold P.O., Faera S.O., Qstbya B.P., Einenb O., 2001. Livechilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 192 (2), 265-280.
- Soyer A., 1994. Balıkta Avlanma Sonrası Meydana Gelen Biyokimyasal Değişmeler. Gıda (1909), 24 (1), 33-39.

- Şahin K., Yazlak H., Orhan C., Tuzcuc M., Akdemir F., Şahin N., 2013. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. *Aquaculture*, Volumes 418-419, Pages 132-138.
- Veiseth-Kent E., Grove H., Faergestad E.M., Faera S.O., 2010. Changes in muscle and blood plasma proteomes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) induced by crowding. *Aquaculture*, Vol 309, 272-279.
- Wakabayashi K., Sugimoto Y., Tanaka H., Ueno Y., Takezawa Y., Amemiya Y., 1994. X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophys*, 68 :1196-7.
- Wang K., McCarter R., Wright J., Beverly J., Ramirez-Mitchell R., 1993. Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles the titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring, page 1173.
- Winnebeck E.C., Millar D.C., Warman R.G., 2010. Why does insect RNA look degraded. Department of Anaesthesiology, Faculty of Medical and Health Sciences, The University of Auckland, New Zealand. *Journal of Insect Science*: Vol. 10 | Article 159, Pages 4,5.
- Xu Y., He J., Wang X., Lim M.T., Go Z., 2000. Asynchronous activation of 10 muscle-specific protein (MSP) genes during zebrafish somitogenesis. *Developmental Dynamics*. 219 (2), 201–215.
- Yüzbaşıoğlu A, 2008. Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, sayfa 2,3,4.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Erzurumda doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olduktan sonra aynı üniversitede Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. Ziraat Fakültesi Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda ve Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.