

## Hormonal Cinsiyet Dönüşüm Metodu Kullanarak Monoseks Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Üretimi

Tülin ARSLAN \*  Erdogan GÜVEN \*\* Muhammed Ali BALTACI \*\*

\* Muğla Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, TR-48000 Muğla - TÜRKİYE

\*\* İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi, TR-54600 Sakarya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-2678

### Özet

Bu çalışmada, dolaylı hormonal cinsiyet dönüşüm metoduyla tamamı dişi gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştirmekte kullanılan erkekleştirilmiş dişi anaçların oluşturulması için uygun hormon protokolü araştırılmıştır. Bu amaçla anaç olarak kullanılacak larvalar ilk yem alma aşamasından itibaren 600 gün-derece süresince kilogramında 1, 2 ve 3 mg  $17\alpha$ -metilttestosteron (MT) içeren yemlerle beslenmişlerdir. Ya da, değişik yaşlardaki keseli larvalar tek ve 48 saat aralıklarla 2 ile 6 adet ikişer saatlik 0.5 mg l<sup>-1</sup> MT banyosuna tabi tutulmuşlardır. Kontrol grubuna ise hormon verilmemiştir. Oral MT uygulamalarının her üç dozu da tamamı erkek veya tamamına yakını erkek gökkuşığı alabalığı üretmekte etkili bulunurken, yapılan banyo uygulamalarının tamamı benzer başarıyı yakalayamamış ve çoğu sadece az sayıda interseks bireyin oluşmasına sebep olmuştur. Deneme balıkları 16 aylıkken yapılan kontroller oral yolla yüksek dozda MT verilen balıkların düşük dozda MT verilen balıklara göre daha düşük oranda kanallı fonksiyonel erkeklerden oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca yüksek MT dozunun gonad büyüklüğünü olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışma, gökkuşığı alabalığında erkekleştirilmiş dişi anaçların elde edilmesinde oral MT uygulamalarının daha başarılı ve istikrarlı sonuçlar ürettiğini göstermiştir. Yüksek MT dozlarının hem sperm kanalı gelişimini hem de gonad gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca farklı su sıcaklıklarında larvaların maruz kaldığı gerçek MT dozunun değişen metabolik hız dolayısıyla farklı olabileceğini işaret etmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Gökkuşığı alabalığı, Oncorhynchus mykiss, Hormonal cinsiyet dönüşüm metodu, 17 $\alpha$ -metilttestosteron*

## Monosex Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Production by Means of Hormonal Sex Reversal Method

### Summary

In this study, efficient hormone protocol for establishment of masculinized female brood stock, which was used in monosex female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production, was investigated. Starting from first feeding, larva that was going to be used as brooders fed formula diets containing 1, 2 and 3 mg  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) for 600 degree-days. Otherwise, sac fry at various ages were immersed once and 2 to 6 times into 0.5 mg l<sup>-1</sup> MT baths for 2 h with 48 h intervals. While oral MT treatments were effective to produce all or almost all male populations at all 3 dosages, none of the bath treatments achieved a similar success and most yielded only a few intersex individuals. Control of oral administration fish at 16 months of age showed that fish masculinized by giving the highest MT dosage contained lower ratio of functional males with complete sperm ducts than fish masculinized by giving the lowest MT dosage. Additionally, high MT dosage was determined to have adverse effect on gonad size. In conclusion, the results of the study showed that oral MT administrations produce more successful and consistent results for the production of masculinized female brooders. They demonstrated that high MT dosages can adversely affect both sperm duct development and gonad size in sex reversed fish. Furthermore, it was discussed that the actual dosages of MT that larva were exposed could vary at different water temperatures depending on variable metabolic rates.

**Keywords:** *Rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, Hormonal sex reversal, 17 $\alpha$ -methyltestosterone*



İletişim (Correspondence)



+90 252 2111893



atul@mu.edu.tr, arslatu@yahoo.com

## GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak, var olan sınırlı kaynakların sürdürülebilir kullanımını gerektirmektedir. Bu sebeple dünyanın pek çok gelişmiş ülkesi tarımda, hayvancılıkta ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kaynak kullanımını artırmadan üretim verimini artırmak amacıyla biyoteknolojik metotlar kullanılmaktadır. Örneğin ülkemizde entegre üretimi yapılan tek tatlısu balığı olan gökkuşağı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792, yetiştiriciliğinde çoğu gelişmiş ülke üretimin tamamını monoseks dişi popülasyonlar kullanarak yapmaktadır <sup>1,2</sup>. Çünkü gökkuşağı alabalığı erkekleri birinci yaş içerisinde seksüel olgunluğa erişmeye başlarlar. Erginleşmeyle birlikte besinlerle alınan enerjinin büyük kısmı büyüme yerine gonad gelişimine yönlendirildiğinden, erkeklerde büyüme yavaşlar, kaslarda depolanan glikojen miktarının azalmasına paralel olarak et kalitesi düşer <sup>1</sup>. Monoseks dişi alabalık yumurtasını yurt dışından getirebilen büyük üreticiler, Kayseri, Sivas ve Fethiye-Muğla civarındaki bazı işletmeler dışında, ülkemizde çoğu üretici monoseks kültür yapmaktadır <sup>3</sup>. Zira ülkemizde gökkuşağı alabalığı ortalama 250 gr ağırlıkta pazarlanmakta ve bu ağırlığa 8-12 aylık sürede ulaşabilmektedir. Fakat özellikle üreme sezonuna yakın dönem olan Sonbahar başlarında yapılan satışlarda, gonadların gelişmesine paralel olarak ikincil cinsiyet karakterleri belirginleşen (renkleri koyulaşmaya ve çeneleri uzamaya başlayan) erkekler kolaylıkla ayırt edilebilmekte ve bu durum üreticilerin bu dönemde pazarlama sorunları yaşamasına sebep olmaktadır. Bunun yanında, son yıllarda Karadeniz’de ve içsularda ağ kafeslerde yetiştirilen ve Salmon olarak pazarlanan kiloluk ve üzeri gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği giderek artmaktadır. Kiloluk veya daha büyük gökkuşağı alabalığı üretiminin ekonomik olabilmesi ise biraz önce belirtilen sebepten dolayı ancak monoseks kültür teknolojisinin uygulanması ile mümkündür.

Androenez, ginogenez, hibritleştirme, elle seçim gibi çeşitli monoseks üretim tekniklerine göre ekonomik olması, yüksek teknoloji ve uzmanlık gerektirmemesi veya kendileşme gibi istenmeyen genetik yan etkilerinin olmaması nedeniyle balık yetiştiriciliğinde en çok tercih edilen monoseks popülasyon üretim tekniği hormonal cinsiyet dönüşüm (hormonal sex reversal) metodu olmuştur <sup>2,4-7</sup>. Balıkların esnek (çevresel ve hormonal faktörlerin etkisine açık) cinsiyet değişim mekanizmalarından <sup>8</sup> faydalanan bu teknik, direkt ve dolaylı olmak üzere iki farklı şekilde uygulanır. Direkt uygulamada, embriyonik veya larval gelişimin erken evrelerinde, gonadların somatik büyümesi sırasında, sitolojik değişiminden (primordial üreme hücrelerinin oogonia veya spermatogonia’ya dönüşümünden) önce, banyo veya ağız

yoluyla verilen cinsiyet hormonları vasıtasıyla gonadal cinsiyetin yönü, genetik cinsiyet belirleme mekanizmasının aksi yönünde değiştirilir. Ekonomik balık türlerinin yetiştiriciliğinde ise hormonal cinsiyet dönüşüm metodu genelde dolaylı olarak uygulanır <sup>2,7</sup>. Çünkü dolaylı uygulamada her yeni jenerasyonun üretimi için hormon kullanılması gerektirmediğinden direkt uygulamaya göre daha az çevresel etki oluşmakta ve pazara sunulan ürün üzerinde hiç hormon kullanılmamış olması dolayısıyla olası tüketici tepkilerinden kaçınılabilmektedir. Dolaylı hormonal cinsiyet dönüşüm uygulamasında, hormonlarla cinsiyeti değiştirilmiş bireyler (genotipik ve fenotipik cinsiyeti farklı bireyler) anaç olarak kullanılarak monoseks popülasyonlar üretilir <sup>2,7</sup>. Örneğin insandaki gibi dişi homogametik (XX dişi/XY erkek) cinsiyet belirleme mekanizmasına sahip olan gökkuşağı alabalığında tamamı dişi popülasyonlar üretmek için keseli larvalara banyo yoluyla <sup>9</sup> veya keseyi tüketip serbest yüzmeye başlayan larvalara ağız yoluyla <sup>1</sup> arzu edilen cinsiyete değil, karşı cinsiyete ait hormonlar verilerek önce gonadal (fenotipik) cinsiyeti değiştirilmiş bireyler (XX erkekleri ya da erkekleştirilmiş dişiler) oluşturulur. Normal dişilerden (XX dişileri) elde edilen yumurtaların, bu erkekleştirilmiş dişilerden elde edilen ve yalnızca dişilik kromozomu (X) taşıyan spermle döllenmesi yoluyla da tamamı dişi popülasyonlar üretilir <sup>2</sup>.

Ülkemiz alabalık üreticilerinin tamamı dişi üretim teknolojisini uygulaması, sonbahar aylarında porsiyonluk satışlarında yaşanan pazarlama sıkıntılarının önlenmesi yanında kiloluk veya daha büyük alabalık üretiminde verimin artırılmasına yardımcı olacaktır. Ayrıca, yetiştiricilerimizin tamamı dişi alabalık yumurtası için yurt dışı kaynaklara bağımlılığının, bu yolla yurt dışına döviz akışının ve yurt dışından getirilen yumurtalardan kaynaklanabilecek hastalık tehlikesinin ortadan kaldırılmasına da olanak sağlayacaktır. İşte bu öngörüler doğrultusunda, tamamı dişi gökkuşağı alabalığı üretim teknolojisini ülkemiz üreticilerinin yaygın bir şekilde kullanımlarına yardımcı olmak amacıyla İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi’nde, Muğla Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi işbirliğiyle 2007-2008 üretim döneminden itibaren çalışmalara başlanılmıştır. Bu çalışmalarda dolaylı hormonal cinsiyet dönüşüm metoduyla tamamı dişi gökkuşağı alabalığı üretmek için gerekli olan erkekleştirilmiş dişi anaçların oluşturulması için uygun hormon protokolü araştırılmıştır. Bu raporla, birimizde gerçekleştirilen bu ön çalışmaların sonuçları paylaşılmaktadır.

## MATERYAL ve METOT

İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi’nde

gerçekleştirilen bu çalışmada, birimde üretilen yumurtadan yeni çıkmış, besin kesesini tüketmek üzere veya tüketmiş gökkuşağı alabalığı larvaları kullanılmıştır. Larvalara sentetik erkeklik hormonu olan 17 $\alpha$ -metiltestosteron (MT, Sigma M 7252) oral yolla ve banyo yolu ile verilmiştir (Tablo 1). Oral uygulamalarda, larvalar ilk yem alma aşamasından itibaren 600 gün-derece süresince kilogramında 1, 2 ve 3 mg MT içeren yemlerle beslenilmiştir. Banyo uygulamalarında, değişik yaşlardaki keseli larvalara tek ve 48 saat aralıklarla 2 ile 6 adet ikişer saatlik 0.5 mg l<sup>-1</sup> MT banyosu verilmiştir. Kontrol grubuna banyo veya oral yol ile hormon verilmemiştir.

daki hormonlar uzaklaştırılmıştır. Hormon uygulamaları sonrası yavrular gonad gelişiminin tespit edilebileceği büyüklüklere (100 g üzeri) ulaşmaya kadar 16 m<sup>2</sup>'lik açık alan beton havuzlarda bakılmışlardır.

Hormon uygulamalarından bir sonraki üreme sezonunda, gonad gelişiminin tamamlandığı bilinen 10. ay sonrasında yeterli büyüklüklere ulaşan deneme balıkları, hormon uygulamalarının gonad gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere örneklenmiştir. Örneklemelerde, uygulamaların her tekrarından rasgele olarak 50-120 adet balık alınmıştır. Örneklenen balıkların önce

**Tablo 1.** 2007 ve 2008 yıllarında gökkuşağı alabalığında fenotipik cinsiyeti yönlendirmede kullanılan 17 $\alpha$ -metiltestosteron (MT) uygulamaları (N=1000)

**Table 1.** 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments given in 2007 and 2008 in order to change the direction of sex differentiation in rainbow trout (N=1000)

Uygulama Yılı ve Şekli	Uygulama	Uygulama Başlangıcındaki Larval Gelişim Aşaması
2007 Kontrol	-	-
2007 Oral	600 gün-derece boyunca 1 mg MT kg <sup>-1</sup> yem 600 gün-derece boyunca 2 mg MT kg <sup>-1</sup> yem	Yeme yeni kalkan Yeme yeni kalkan
2007 Banyo	48 saat aralı, 2 saatlik 3 periyodik 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu 48 saat aralı, 2 saatlik 6 periyodik 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu	410 gün-derece 410 gün-derece
2008 Kontrol	-	-
2008 Oral	600 gün-derece boyunca 3 mg MT kg <sup>-1</sup> yem	Yeme yeni kalkan
2008 Banyo	2 saatlik tek 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu 2 saatlik tek 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu 2 saatlik tek 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu 48 saat aralı, 2 saatlik 2 periyodik 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu 48 saat aralı, 2 saatlik 2 periyodik 0.5 mg l <sup>-1</sup> MT banyosu	480 gün-derece 550 gün-derece 620 gün-derece 550 gün-derece 620 gün-derece

Çalışmada kullanılan MT hassas teraziyle tartıldıktan sonra, %96'lık etil alkol içerisinde çözündürülerek stok solüsyonları (1 mg/ml) hazırlanmıştır. Stok solüsyonlar uygulamalar boyunca koyu renkli örnek şişelerinde +4°C de saklanmıştır. Oral uygulamalarda, stok solüsyondan alınan hormonun yeme homojen bir şekilde karışmasını sağlamak için her kilogram yeme katılması gereken miktar, 250 ml, %96'lık etil alkol içerisinde seyreltildikten sonra sürekli karıştırarak küçük hacimlerde yeme eklenmiştir. Bu işlem sonrasında nemlenen 300, 500, 700, 1000, 1200  $\mu$ m alabalık yavru yemleri (sırasıyla %57-50 ham protein, Trouw Nutrition TR) havadar ve direkt güneş ışığı almayan, loş bir yerde 24 saat havalandırılarak içerisindeki alkolden ve nemden arındırılmıştır. İçerisindeki alkol uçurulan ve iyice kuruyan yemler kapaklı yem kovaları içerisinde serin ve loş bir alanda korunmuştur.

Banyo uygulamaları larvalara Kaliforniya tipi kuluçka kanallarında verilmiştir. Kanallardaki su hacmi litrede 20 larva olacak şekilde ayarlanmış ve banyo süresince su giriş vanaları kapatılmıştır. İki saatlik banyo süresi sonunda ise, vanalar açılarak su değişimi yoluyla kanal suyun-

abdominal masaj (sağım) yoluyla sperm verip vermediği kontrol edildikten sonra, balıklar yüksek dozda anestetik (2-phenoxyethanol) ile öldürülerek, ağırlıkları 0.1 g ve toplam boyları 1 mm hassasiyetle ölçülmüştür. Daha sonra, bir bistüri yardımıyla abdomenleri açılarak, gonadları bir bütün halde çıkarılmış ve %10'luk nötrale edilmiş formalin içerisinde fikse edilmiştir.

Fikse edilen gonad örneklerinden fast green boyası ve gonadal-ezme metodu kullanılarak yaş preparatlar hazırlanmıştır<sup>10</sup>. Yaş preparatların mikroskopik incelemesiyle gonadlar gözlemlenen hücre tiplerine ve iç morfolojik özelliklerine göre dişi, erkek veya interseks olarak sınıflandırılmıştır.

İki bin yedi yılı oral MT ve kontrol uygulamalarında, örneklemelerden arta kalan balıklar sperm kanalı gelişimi ve cinsiyet dönüşümünün işlevselliğinin değerlendirilebilmesi için büyütülmeye devam edilmişlerdir. Bu balıklardan birinci yaşlarındaki üreme sezonu sonunda (16. ayda), sağım yoluyla sperm elde edilmeye çalışılarak, kanallı (fonksiyonel) erkek bireylerin oranları tes-

pit edilmiştir. Sağımla süt veren ve vermeyen erkeklerden onar adedi yüksek dozda anestetik (2-phenoxyethanol) ile öldürülerek, ağırlıkları 0.1 g ve toplam boyları 1 mm hassasiyetle ölçülmüştür. Daha sonra, bir bistüri yardımıyla abdomenleri açılarak, gonadları bir bütün halde çıkarılıp, 0.1 g hassasiyetle tartılmış ve gonadosomatik indeksleri ( $GSİ = (\text{Gonad ağırlığı} \times 100 / \text{Toplam vücut ağırlığı})$ ) hesaplanmıştır.

Veriler SAS (Statistical Analysis System, Carry, NC, USA) yazılımının 8.2 versiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Deneme gruplarının boy, ağırlık ve GSİ ortalamaları arasında fark olup olmadığı çift yönlü ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir. ANOVA testinin deneme gruplarının ortalamaları arasında istatistiki belirgin ( $P < 0.05$ ) farklar işaret ettiği durumlarda, ortalamalar Duncan çoğul aralık testi kullanılarak gruplara ayrılmıştır. Deneme gruplarının cinsiyet oranlarının dengeli %50 dışı: %50 erkek oranına uyum gösterip göstermediği veya kontrol gruplarının cinsiyet oranlarına benzerliği G testi (log likelihood ratio test) kullanılarak belirlenmiştir <sup>11</sup>.

## BULGULAR

Kullanılan hormonlar, uygulanan dozda gökkuşağı alabalığında toksisiteye sebep olmamıştır. Hormon uygulanan tüm deneme gruplarının yaşam oranları kontrol grubununkine benzer değerler (%70) göstermiştir. On ikinci ayda yapılan tetkikler, 2007 yılı deneme grupla-

rının boy ve ağırlık artışlarında istatistiki olarak belirgin ( $P < 0.05$ ) farklar olduğunu göstermiştir (Tablo 2). Oral yolla düşük dozda ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  yem) MT verilen grubun büyümesi kontrol grubuna benzer kalırken, oral yolla yüksek dozda ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$  yem) MT verilen grubun kontrol grubundan daha yavaş büyüdüğü tespit edilmiştir. Periyodik MT banyolarının ise büyümeyi olumsuz etkilediği ve bu iki gruptaki balıkların hem kontrol hem de oral MT gruplarındaki balıklardan küçük olduğu görülmüştür (Tablo 2).

On beşinci ayda yapılan tetkikler, 2008 yılı deneme gruplarının da boy ve ağırlık artışlarında istatistiki olarak belirgin ( $P < 0.05$ ) farklar olduğunu göstermiştir (Tablo 3). Bir grup hariç, yine tüm tek veya çift MT banyosu verilen balıkların ağırlıklarının, kontrol ve oral MT gruplarındaki balıklardan daha düşük olduğu görülmüştür. Kontrol, oral MT ve 620 gün-dereceden itibaren çift MT banyosu gruplarındaki balıkların ağırlıkları benzer bulunurken, 620 gün-dereceden itibaren tek veya çift MT banyosu verilen gruplardaki balıkların kontrol ve oral MT grubundan daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3).

Oral MT uygulamalarının her üç dozu ( $1, 2$  ve  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  yem) tamamı erkek veya tamamına yakını erkek gökkuşağı alabalığı üretmekte etkili olmuştur (Tablo 4). MT banyo uygulamaları ise %2.4-6.8 oranında interseks bireyin oluşmasına sebep olmuş, ama erkek oranlarında %50'yi aşan belirgin bir artış yaratmamıştır (Tablo 4). Diğer yandan 2008 yılı kontrol grubunun cinsiyet oranı

**Tablo 2.** 2007 yılında gerçekleştirilen  $17\alpha$ -metilttestosteron (MT) uygulamalarının 12 aylık gökkuşağı alabalığının büyümesi üzerine etkileri. Aynı sütunda farklı küçük harflerle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistiki belirgin farklar göstermektedir ( $P < 0.05$ )

**Table 2.** Effects of  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments administered in 2007 on the growth of 12 month old rainbow trout. Means in the same column followed by different lower case letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

Uygulama	N	Ort. Ağırlık (g)	Ort. Boy (cm)
Kontrol	117	193.2±32.1 <sup>a</sup>	25.2±1.6 <sup>a</sup>
1 mg MT kg <sup>-1</sup> yem	102	197.0±44.6 <sup>a</sup>	25.3±2.4 <sup>a</sup>
3 mg MT kg <sup>-1</sup> yem	98	166.0±38.9 <sup>b</sup>	24.5±2.3 <sup>b</sup>
410 gün-dereceden itibaren 48 saat aralı, 3 periyodik MT banyosu	106	149.5±29.9 <sup>c</sup>	24.0±1.9 <sup>b</sup>
410 gün-dereceden itibaren 48 saat aralı, 6 periyodik MT banyosu	107	145.2±22.7 <sup>c</sup>	22.7±2.2 <sup>c</sup>

**Tablo 3.** 2008 yılında gerçekleştirilen  $17\alpha$ -metilttestosteron (MT) uygulamalarının 15 aylık gökkuşağı alabalığının gonad gelişimi ve büyümesi üzerine etkileri (N=100). Aynı sütunda farklı küçük harflerle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistiki belirgin farklar göstermektedir ( $P < 0.05$ )

**Table 3.** Effects of  $17\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments administered in 2008 on the growth of 15 month old rainbow trout. Means in the same column followed by different lower case letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

Uygulama	Ort. Ağırlık (g)	Ort. Boy (cm)
Kontrol	306.1±45.9 <sup>a</sup>	27.8±1.4 <sup>cd</sup>
2 mg MT kg <sup>-1</sup> yem	300.9±60.0 <sup>a</sup>	27.9±1.6 <sup>cd</sup>
480 gün-derecede tek MT banyosu	263.5±38.9 <sup>bc</sup>	27.7±1.4 <sup>d</sup>
550 gün-derecede tek MT banyosu	260.8±33.8 <sup>bc</sup>	28.1±1.3 <sup>bcd</sup>
620 gün-derecede tek MT banyosu	270.7±66.9 <sup>b</sup>	28.4±1.9 <sup>ab</sup>
550 gün-dereceden itibaren 48 saat aralı, 2 periyodik MT banyosu	253.1±38.1 <sup>c</sup>	28.1±1.4 <sup>bc</sup>
620 gün-dereceden itibaren 48 saat aralı, 2 periyodik MT banyosu	307.7±50.4 <sup>a</sup>	28.6±1.4 <sup>a</sup>

dengeli %50 dişi: %50 erkek cinsiyet oranından hafifçe sapma göstermiştir (%39.8 erkek, *Tablo 4*). Kontrol grubunun dişi ağırlıklı cinsiyet oranı ile karşılaştırıldığında, 550 gün-derecede verilen tek ve 550 gün-dereceden itibaren verilen 48 saat aralığı çift MT banyolarının dişi birey oranında istatistiki olarak belirgin ( $P < 0.05$ ) düşüşe (%60.2'den sırasıyla %45.9 ( $G_p/G_T = 8.202/8.584$ ) ve %36.6'ya ( $G_p/G_T = 10.396/10.554$ )) sebep olduğu tespit edilmiştir.

Hormon uygulamalarından sonraki üreme sezonunun başında (12. ayda) yapılan kontrollerde, kontrol grubunun %45.7'si abdomene yapılan yumuşak masajla sperm verirken, oral veya banyo yoluyla hormon verilen balıkların sadece %3-7.5'inden sağımla sperm elde edilebilmiştir. Üreme sezonu sonunda (16. ayda) yapılan kontrollerde ise, 600 gün-derece boyunca 1 mg MT  $kg^{-1}$  yemle beslenen tamamı erkek grubun %54.7'sinin sağımla süt verdiği gözlenmiştir. Aynı süre yüksek dozda (3 mg  $kg^{-1}$ ) MT içeren yemle beslenen grubun ise, sadece %26.4'ünden sağımla süt elde edilebilmiştir (*Tablo 5*). Ayrıca sağımla süt vermeyen bireylerin büyümesinin

sağımla süt verenlere göre daha iyi olduğu ve kullanılan MT dozu arttıkça hem büyümenin yavaşladığı hem de GSİ'nin düştüğü tespit edilmiştir (*Tablo 5*).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Erkeklik hormonları anabolik etkiye sahip olduğundan yasal izin verilen ülkelerin hayvan yetiştiricileri tarafından büyümeyi destekleyici olarak kullanılabilir. Balık yetiştiriciliğinde bu amaçla kullanılmamakla birlikte, hormonal cinsiyet dönüşüm çalışmaları androjenlerin düşük dozlarının balıklarda da büyümeyi destekleyici etkiye sahip olduğunu, ama yüksek dozlarının aksine büyümeyi yavaşlattığını göstermiştir <sup>4,6</sup>. Bizim çalışmamızda sentetik erkeklik hormonu MT oral yolla verildiğinde 1 mg  $kg^{-1}$  yem dozunda büyüme üzerinde herhangi bir etki oluşturmazken, 3 mg  $kg^{-1}$  yem dozunda büyümeyi yavaşlatmış görünmektedir. Daha ilginç banyo yoluyla verildiğinde, düşük dozda (0.5 mg  $l^{-1}$ ) bile büyüme üzerinde olumsuz etki göstermiş görünmesidir. Kuzey Amerika kıtasına özgü güneş balıklarıyla yapılan

**Tablo 4.** 17 $\alpha$ -metiltestosteron (MT) uygulamalarının gökkuşuğu alabalığının cinsiyet oranları üzerine etkileri. Yüzde oranlarını takip eden değerler 2 tekrara ait  $\pm$ SS'yi göstermektedir, \*  $P < 0.05$  ve \*\*  $P < 0.001$

**Table 4.** Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments on sex ratios of rainbow trout. Values following the percentages show  $\pm$ SD belonging to 2 replicates, \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.001$

Uygulama Yılı	Uygulama	N	% Erkek	% İnterseks	% Dişi	G
2007	Kontrol	102	45.1	0.0	54.9	0.982
	1 mg MT $kg^{-1}$ yem	85	100.0	0.0	0.0	113.4 **
	3 mg MT $kg^{-1}$ yem	98	98.0	2.0	0.0	116.3 **
	410 gün-dereceden itibaren 3 periyodik MT banyosu	93	51.6	4.0	44.4	0.097
	410 gün-dereceden itibaren 6 periyodik MT banyosu	98	53.1	4.0	42.9	0.368
<b>G<sub>p</sub>/G<sub>T</sub></b>						
2008	Kontrol	47 $\pm$ 5	39.8 $\pm$ 0.3	0.0	60.2 $\pm$ 0.5	3.909 */3.911
	2 mg MT $kg^{-1}$ yem	32 $\pm$ 1	98.4 $\pm$ 2.3	1.6 $\pm$ 2.3	0.0	78.42 **/78.42 **
	480 gün-derecede tek MT banyosu	50 $\pm$ 0	44.0 $\pm$ 11.3	0.0	56.0 $\pm$ 11.3	1.443/4.053
	550 gün-derecede tek MT banyosu	50 $\pm$ 1	51.1 $\pm$ 4.4	3.0 $\pm$ 4.2	45.9 $\pm$ 4.4	0.641/1.023
	620 gün-derecede tek MT banyosu	43 $\pm$ 6	49.5 $\pm$ 0.8	0.0	50.5 $\pm$ 0.8	0.012/0.021
	550 gün-dereceden itibaren 2 periyodik MT banyosu	45 $\pm$ 1	56.6 $\pm$ 3.6	6.8 $\pm$ 6.5	36.6 $\pm$ 3.6	1.605/1.763
620 gün-dereceden itibaren 2 periyodik MT banyosu	42 $\pm$ 4	45.3 $\pm$ 1.5	2.4 $\pm$ 0.2	52.3 $\pm$ 1.5	0.191/0.226	

**Tablo 5.** 2007 yılında gerçekleştirilen oral 17 $\alpha$ -metiltestosteron (MT) uygulamalarının 16 aylık gökkuşuğu alabalığında gonad gelişimi ve büyüme üzerine etkileri. Aynı sütunda farklı küçük harflerle işaretlenmiş olan ortalamalar istatistiki belirgin farklar göstermektedir ( $P < 0.05$ )

**Table 5.** Effects of oral 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) treatments administered in 2007 on the gonad development and growth of 16 month old rainbow trout. Means in the same column followed by different lower case letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

Uygulama	N	Grup	Grup % Oranı	GSİ (N=10)	Ort. Ağırlık (g)	Ort. Boy (cm)
1 mg MT $kg^{-1}$ yem	190	Sağımla sperm veren erkek	54.7	1.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	274.2 $\pm$ 58.5 <sup>bc</sup>	27.4 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>
		Sağımla sperm vermeyen erkek	45.3	2.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	375.2 $\pm$ 58.7 <sup>a</sup>	30.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
3 mg MT $kg^{-1}$ yem	144	Sağımla sperm veren erkek	26.4	2.8 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	210.0 $\pm$ 32.8 <sup>d</sup>	24.7 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>
		Sağımla sperm vermeyen erkek	73.6	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	292.0 $\pm$ 26.1 <sup>b</sup>	29.4 $\pm$ 1.0 <sup>ab</sup>

hormonal cinsiyet dönüşüm çalışmalarında da, uygulamalar sonrasında yapılan değerlendirmelerde periyodik banyolar şeklinde düşük dozda MT verilen balıkların oral yolla yüksek dozda MT verilen balıklardan ve kontrol grubundan daha küçük kaldığı görülmüştür<sup>13,14</sup>. Ama uygulamaların bitiminden birkaç ay sonra yapılan değerlendirmeler, telafi büyümesinin gerçekleştiğini ve bu durumun MT dozuyla değil banyo uygulamaları sırasında balıkların yoğun stoklanması ve hareket ettirilmesi sebebiyle oluşan stres kaynaklı olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada deneme balıklarının büyümesi uygulamaların bitiminden çok sonra (12 ve 15. aylarda) değerlendirilmiştir. Fakat ne banyo yoluyla nede oral yolla yüksek dozda MT verilen balıkların daha küçük kalması direkt olarak MT dozu veya uygulama şekliyle ilgili olmayabilir. Çünkü MT uygulamaları sonrası, deneme gruplarının stok yoğunlukları ve besleme oranları sıkı bir şekilde denetim altında tutulmamıştır.

Hormonlarla fenotipik cinsiyetin başarılı bir şekilde yönlendirilmesi ve fonksiyonel olarak fenotipik cinsiyeti değiştirilmiş bireylerin elde edilmesi hormon uygulamasının gonadal gelişime bağlı zamanlamasına, uygulamanın süresine, kullanılan hormonun türüne ve dozuna bağlıdır<sup>4</sup>. Gonadların sitolojik değişimi larvaların serbest yüzme aşamasına denk gelen<sup>15</sup> Pasifik salmonlarında (*O. kisutch* ve *O. tshawytscha*), larvalara ilk yemlemeden itibaren oral yolla verilen hormonlar çok çeşitli sonuçlar üretmiş ve genelde fenotipik cinsiyeti yönlendirmede başarısız olmuştur<sup>4</sup>. Gonadların somatik büyüme (mitotik bölünmeler) aşamasına denk gelen yumurtaların medyan açılması (aynı zamanda döllenmiş yumurtaların yarısının açılmasını tamamladığı evre) sırasında verilen kısa (2 saatlik) ve düşük dozlardaki androjen veya östrojen banyoları ise fonksiyonel olarak tamamı erkek veya tamamı dişi populasyonlar üretmekte başarılı olmuştur<sup>15-17</sup>. Bu düşük dozda, kısa süreli hormon uygulamalarından elde edilen yüksek başarı, uygulamaların gonadların fizyolojik olarak hormonların etkisine en duyarlı olduğu dönemde verilmiş olmasına ve verilen steroidlerin salmon larvalarının nispeten büyük besin kesesi tarafından absorbe edilerek, banyo uygulamalarından çok sonra bile larvalara aktarılabilmesine bağlanmıştır<sup>18</sup>.

Buna karşılık gonadların sitolojik değişimi (mayoz bölünmeler) larvaların serbest yüzmeye başladığı ay içerisinde gerçekleşen Atlantik salmonu, *Salmo salar*<sup>4,19</sup>, ve gökkuşuğu alabalığında<sup>19,20</sup>, ilk yemlemeden itibaren oral yolla verilen erkeklik ve dişilik hormonları fenotipik cinsiyeti yönlendirmede başarılı sonuçlar üretmiştir<sup>4,21</sup>. Fakat bu yolla erkekleştirilen bireylerde sperm kanalı oluşmadığı rapor edilmiştir<sup>1,21</sup>. Bu durum uygulamaların zamanlamasıyla da ilişkilendirildiğinden, gonadal değişimin hem somatik hem de sitolojik elementlerini etkile-

yebilmek için her iki türde de keseli larval dönemde banyo yoluyla steroid uygulamaları yapılmıştır. Atlantik salmonu ile yapılan çalışmada<sup>22</sup>, yumurtaların medyan açılmasından sonraki 2 ve 3. veya 3 ve 4. haftalarda (döllenmeden 570-690 gün-derece sonra) verilen üçer saatlik 2 adet 0.4 mg l<sup>-1</sup> 17 $\alpha$ -metildihidrotestosteron banyolarının %100 erkek populasyonlar üretmekte etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu yolla üretilen erkekleştirilmiş dişilerin %84-92 oranında fonksiyonel, kanallı bireylerden oluştuğu rapor edilmiştir<sup>22</sup>. Gökkuşuğu alabalığı yumurtalarına (açılmadan 1 hafta önce) ve larvalarına (medyan açılmada, açılmadan 1 veya 2 hafta sonra) verilen tek veya birer hafta aralı 2 ila 4 adet, 2 saatlik 0.4 mg l<sup>-1</sup> MT banyoları ise %16-76 oranında erkekleşmeye sebep olmuştur ve bu yolla erkekleştirilen dişilerin %60-100 oranında kanallı fonksiyonel bireylerden oluştuğu rapor edilmiştir<sup>9</sup>. Ayrıca banyo uygulamaları için en uygun zamanın medyan açılmadan 1 hafta (döllenmeden yaklaşık 425 gün-derece) sonra olduğu bildirilmiştir<sup>9</sup>. Aynı hormonun 410 ile 620 gün-derece arasında biraz (%25) yüksek dozda verildiği bu çalışmada ise, tek veya periyodik MT banyolarının hiçbirisi erkek oranlarında %50'yi aşan istatistiki olarak belirgin bir artış yaratamamıştır. Çalışmada keseli larval dönemde verilen MT banyolarının etkisiz kalması, işletmenin nispeten yüksek su sıcaklıkları (12-14°C) dolayısıyla deneme balıklarının artan gelişim hızına bağlı olabilir. Çünkü balıklar soğukkanlı canlılar olduklarından, balıklarda gelişim hızı, dolayısıyla gelişimin zamanlaması ve süresi su sıcaklıklarına bağlı farklılıklar gösterebilir<sup>4</sup>. Banyo uygulamalarının daha başarılı sonuçlar verdiği önceki çalışmada<sup>9</sup>, yumurta ve larvalar 11.5°C'de bakılmışlardır. Oysa yapılan çalışmada su sıcaklıkları 12-14°C arasında değişim göstermiştir. Yüksek gelişim hızlarında, primordial gonadların fizyolojik olarak hormonların etkisine en duyarlı olduğu kısa dönem banyo uygulamalarına başladığımız 410 gün-derece öncesinde gerçekleşmiş olabilir. Bununla birlikte, yüksek gelişim hızı nedeniyle besin kesesinin hızla tüketilmesi, ayrıca periyodik banyolarında daha sık aralıklarla (1 hafta yerine 48 saat) verilmesi çalışmamızda larvaların maruz kaldığı gerçek MT dozunun daha önceki çalışmada<sup>9</sup> kullanılan dozdan sadece %25 değil, çok daha yüksek olmasına da sebep olabilir. MT östrojene aromatize olabilen bir androjen olduğundan<sup>23</sup>, yüksek dozlarda MT'nin kısa süreli uygulamalarda erkekleşme oranlarında düşüş ve hatta dişi oranlarında artışa (paradoksal dişileşme) sebep olduğu görülmüştür<sup>17,24</sup>. Nitekim daha önceki çalışmada<sup>9</sup> banyo sayısı arttıkça erkekleşme oranlarında azalma olduğunu gözlenmiş ve bu durumu banyo uygulamalarının etkisinin artan banyo sayısı ile azalması şeklinde yorumlanmıştır. Fakat çalışmamızda hem tek hem de periyodik banyoların başarısız olması, bu durumun ban-

yo sayısından çok larvaların maruz kaldığı gerçek MT dozu ile bağlantılı olduğunu işaret etmektedir.

Öte yandan, kesenin tüketilmesine doğru (550 günden itibaren) verilen tek veya çift MT banyoları dişi oranını %60.2'den sırasıyla %45.9 ve %36.6'ya düşürmüştür. Fakat tamamı erkek popülasyonlar oluşturamamıştır. Kesenin tüketiminden itibaren oral yolla verilen uzun süreli (600 gün-derece boyunca) MT uygulamaları ise tamamı veya tamamına yakını erkek popülasyonlar üretmekte etkili olmuştur. Bu sonuçlar, gelişmekte olan gonadların keseli larval dönem sonrasında hormonların etkisine açık kaldığını, ama başarı sonuçlar için uygulamaların daha uzun süreli olması gerektiğini işaret etmektedir.

Bununla beraber, keseli larval dönem sonrası başlatılan uzun süreli uygulamalarda da kullanılan MT dozunun iyi ayarlanması büyük önem taşımaktadır. Daha önce gökkuşuğu alabalığı veya diğer türlerde yapılan çalışmalar yüksek dozda uzun süreli androjen uygulamalarının kısırılığa varan sonuçlar doğurabileceğini ortaya koymuştur<sup>4,6</sup>. Yapılan çalışma sonuçları da, sperm kanalı gelişiminin kullanılan MT dozuyla ilişkili olabileceğini ve yüksek MT dozlarının sağımla sperm veren, kanallı erkek oranını azaltabileceğini göstermektedir. Ayrıca yüksek MT dozu kullanılarak erkekleştirilmiş dişilerde GSİ'nin de düştüğü görülmüştür. Bütün bunlar göz önüne alındığında, oral uygulamalar için uygun MT dozunun 1 mg kg<sup>-1</sup> yem veya altında olduğu düşünülebilir. Fakat banyo uygulamalarında olduğu gibi oral uygulamalarda da metabolik hızı, dolayısıyla tüketilen yem miktarını ve larvaların maruz kaldığı gerçek androjen dozunu su sıcaklıklarının belirleyeceği ve uygun dozun çalışmadakinden farklı su sıcaklıklarında farklı olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamız gökkuşuğu alabalığında erkekleştirilmiş dişi anaçların üretilmesinde oral MT uygulamalarının daha istikrarlı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ayrıca yüksek MT dozlarının sperm kanalı gelişimi ve GSİ'yi olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymuştur. Dahası çalışma sonuçları farklı su sıcaklıklarında larvaların maruz kaldığı gerçek MT dozunun değişen metabolik hız sebebiyle farklı olabileceğini işaret etmektedir. Bu sebeple, çalışmada en iyi sonucun alındığı protokol olan besin kesesini tüketen larvaları ilk yemlemeden itibaren 600 gün-derece süresince kilogramında 1 mg MT bulunan yemle besleme, çalışmanın yapıldığı su sıcaklıklarına (12-14°C) benzer su sıcaklıklarına sahip işletmelere önerilir. Farklı su sıcaklıklarına sahip işletmelerin kullandıkları MT dozunu kendi koşullarına göre optimize etmeleri gerekebilir.

## KAYNAKLAR

- Bye VJ, Lincoln RF:** Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 57, 299-309, 1986.
- Piferrer F:** Endocrine sex control strategies for feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197, 229-281, 2001.
- Atay D, Bekcan S, Ölmez M, Atar HH:** Ginogenetik teknikler ve hormonun (17 $\alpha$ -metilttestosteron) birlikte uygulanmasıyla dişi gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) üretimi. TÜBİTAK Proje Raporu, Proje No:VHAG-1458, 2002.
- Hunter GA, Donaldson EM:** Hormonal sex control and its application to fish culture. **In**, Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds): *Fish Physiology*, Vol. 9B, pp. 223-291. Academic Press, New York, 1983.
- Dunham RA:** Production and use of monosex and sterile fishes in aquaculture. *Rev Aquat Sci*, 2, 1-17, 1990.
- Pandian TJ, Sheela SG:** Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138, 1-22, 1995.
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI:** Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197, 283-301, 2001.
- Devlin RH, Nagahama Y:** Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191-364, 2002.
- Feist G, Yeoh CH, Fitzpatrick M, Schreck CB:** The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, 131, 145-152, 1995.
- Guerrero RD, Shelton WL:** An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. *Prog Fish-Cult*, 36, 56, 1974.
- Sokal RR, Rohlf FJ:** *Biometry*. 3rd ed., pp. 685-725, WH Freeman and Company, New York, 1995.
- Kolok AS, Sellin MK:** The environmental impact of growth-promoting compounds employed by the United States beef cattle industry: History, current knowledge, and future directions. *Rev Environ Contam Toxicol*, 195, 1-30, 2008.
- Arslan T, Phelps RP, Osbourne JA:** Effects of oestradiol-17 $\beta$  or 17 $\alpha$ -methyltestosterone administration on gonadal differentiation of largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Aquac Res*, 40, 1813-1822, 2009.
- Arslan T, Phelps RP:** Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersions. *Aquaculture*, 234, 561-573, 2004.
- Piferrer F, Donaldson EM:** Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen and estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, 77, 251-262, 1989.
- Piferrer F, Donaldson EM:** The comparative effectiveness of the natural and a synthetic estrogen for the direct feminization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 106, 183-193, 1992.
- Piferrer F, Baker IJ, Donaldson EM:** Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook

salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen Comp Endocrinol*, 91, 59-65, 1993.

**18. Piferrer F, Donaldson E M:** Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 $\beta$  and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. *Fish Physiol Biochem*, 13, 219-232, 1994.

**19. Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, Nagahama Y:** Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J Exp Zool*, 281, 362-372, 1998.

**20. Baron D, Houllatte R, Fostier A, Guiguen Y:** Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol Reprod*, 73, 959-966, 2005.

**21. Geffen AJ, Evans JP:** Sperm traits and fertilization success

of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182, 61-72, 2000.

**22. Lee P, King H, Pankhurst N:** Preliminary assessment of sex inversion of farmed Atlantic salmon by dietary and immersion androgen treatments. *N Am J Aquacult*, 66, 1-7, 2004.

**23. Crim LW, Peter RE, Bilar R:** Onset of gonadotropic hormone accumulation in immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen Comp Endocrinol*, 44, 374-38, 1981.

**24. Solar II, Donaldson EM, Hunter GA:** Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Aquaculture*, 42, 129-133, 1984.