

İpekböceği (*Bombyx mori*) Ovaryumundan Alınan Yumurtalarda Çeşitli Yöntemlerle Partenogenetik Gelişmenin Uyarılması

Ümran ŞAHAN*

Tahsin KESİCİ**

Serdar DURU***

ÖZET

Bu çalışma ipekböceğinde döllenmemiş (ovaryum özellikli) yumurtalarda partenogenetik gelişmenin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada M, N saf ve M x N, S x Shunrei hibrit hatlarından elde edilen döllenmemiş yumurtalar kullanılmıştır. Bu yumurtalar sıcak su muamelesiyle (46 C, 18 dak.) uyarılmış olup araştırmada üç farklı yöntem denenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir. 1) Döllenmemiş yumurtalar muameleden önce 12 saat süre ile 25°C sıcaklıkta ve muameleden sonra 3 gün 20°C de tutuldukları zaman % 81 oranında partenogenetik yumurta ortaya çıkmıştır. 2) 46 C lik sıcak su ile muamele edilen yumurtalar 20°C de 4 gün tutulduktan sonra HCl (1.075 özgül ağırlık, 46 C, 5 dak.) ile muamele edildikleri zaman % 72 oranında partenogenetik yumurta elde edilmiştir. 3) Yumurtalar 5°C de 5 gün tutulduktan sonra 30° C 4 saat bekletilmişler ve sıcak suyla muamele edildiklerinde % 80 oranında partenogenetik yumurta gelişimi sağlanmıştır. 4) Yöntemlerde elde edilen partenogenetik yumurta yüzdesi hatlara göre farklılık göstermiş ve bu oranın hibritlerde daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: İpekböceği, döllenmemiş yumurta, partenogenetik gelişme, sıcak su muamelesi.

* Yrd. Doç. Dr.; U. Ü. Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü.

** Prof. Dr.; A. Ü. Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü.

*** Araş. Gör.; U. Ü. Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü.

ABSTRACT

Induction of The Eggs By Various Methods Removed From Ovarium of Silkworm (Bombyx Mori)

This research was conducted to determine the parthenogenetic development of silkworm unfertilized eggs (ovarian eggs). Unfertilized eggs obtained from female moths belong to the M, N pure, and M x N, S x Shunrei hybrid lines were used. Unfertilized eggs were induced by the hot water treatment (46 C, 18 min) and three different methods tested in this research. The results were summarized as follows: 1) Rate of parthenogenetic eggs were 81%, when the eggs were kept at 25°C for 12 hours before the treatment and 20°C for 3 days after the treatment. 2) 70% parthenogenetic eggs were obtained when the hot water treated eggs kept at 20°C for 4 days following HCl treatment (S.G. 1.075, 46 C, 5 min).

3) 80% parthenogenetic eggs were obtained when the eggs were kept at 30°C for 4 hours following keeping at 5°C for 5 days before the hot water treatment. 4) The rate of appearance of parthenogenetic eggs varied widely according to the lines and it was determined that rate was higher in hybrids than the pure lines.

Key words: Silkworm, unfertilized eggs, parthenogenetic development, hot water treatment.

GİRİŞ

Tarım ve uygulamalı biyolojide hayvanların genetik kopyalarının üretimi ilginç ve karmaşıktır. Bu yolla uygulanan birinci yöntem, organizmaların somatik hücrelerinin diploid nükleuslarından alınan gelişmiş ovasitleri içerir¹. İkinci yöntem ise, döllere ebeveynlerinden birinin genotipinin tam transferi olan çoğalmadır. İpekböceği bu yüzden yaklaşık elli yıldan beri araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Ameiotik ve meiotik partenogenesis ve androgenesis gibi yapay yöntemlerle ipekböceğinde, ebeveynlerin genotipleri tekrarlanmadan ana ve babanın genetik kopyaları elde edilebilmiştir².

Doğal partenogenesis özellikle bazı omurgalılarla, tohumlu ve sporlu bitkilerde rastlanılan seksüel bir üreme biçimidir. Partenogenesisin sık rastlandığı türlerde ise bazen embriyonik gelişmenin ilk dönemleri ile sınırlı partenogenesis oluşur. İpekböceğinde gözlenen durum budur^{2,3}.

Pratikte ovariyollardan çıkarılan yumurtalar pigmentasyon göstermezler. Verson, incelediği beş milyon yumurtada partenogenetik gelişme gözlememiş ve ipekböceğinde doğal partenogenesis olmadığı sonucuna varmıştır³. Bununla birlikte, ovaryum özellikli (döllenenmemiş) yumurtalardan çok az sayıda da olsa larva elde edilebildiği, ancak bu larvaların yaşama gücünün çok düşük olduğu bildirilmiştir^{4,5}.

Ameiotik partenogenesis, ipekböceği yumurtalarının aktivasyonu için ilk uygulanabilir yöntem olup Astaurov⁴ tarafından geliştirilmiş ve ovaryum tüplerinden alınan döllenmemiş yumurtaların sıcak su ile uyarımını içermektedir. En iyi sonucun 18 dakika süre ile 46°C'lik sıcak su ile muameleden alındığı bildirilmiştir. İşlem sonucunda yumurtalarda % 82'nin üzerinde parthenogenetik gelişme gözlenmiş ve elde edilen az sayıda larva analarının kopyaları dişiler olmuştur⁵. Bunun yanısıra, birçok araştırmacı sıcak su muamelesi ile partenogenetik gelişme elde ettiklerini bildirmişlerdir^{6,7,8}.

Sıcak su muamelesinin yanısıra, HCl ile uygulama sonucu ipekböceği yumurtalarında partenogenetik gelişmenin olduğu ve homozigot bireylerin elde edilebildiği açıklanmıştır^{8,9}.

Ancak, bu araştırmalarda uygulanan yöntemler sonucu elde edilen partenogenetik yumurta yüzdesi farklılık göstermektedir.

Sugai ve ark.¹⁰, tarafından yürütülen bir araştırmada dişi kelebekten alınan döllenmemiş yumurtalar beşinci yaş döneminin başındaki erkek ve dişi ipekböceklerinin gonatlarının içine yerleştirilmiş ve ergin (kelebek) dönemlerinde ovaryumdan alınan bu yumurtalara sıcak su muamelesi uygulandığında, partenogenetik gelişmenin yalnızca dişi kelebekten elde edilen yumurtalarda görüldüğü belirlenmiştir. Saf hatlar ve hibritlerdeki uygulamalarda ise, hibrit yumurtalarda partenogenetik gelişmenin daha yüksek olduğu bildirilmektedir^{8,11}. Bu araştırmalarda elde edilen sonuçlar partenogenesisin oluşumunda bazı maternal faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca partenogenesisin ortaya çıkmasında sabitleştirilemeyen genetik faktörlerin en yüksek etkiye sahip olduğu, bunu sabitleştirilen faktörlerin ve çevresel faktörlerin izlediği görülmektedir¹¹.

Bu çalışmada saf ve hibrit ipekböceği hatlarından elde edilen ovaryum özellikli (döllenmemiş) yumurtalara farklı yöntemler uygulanarak bu yumurtalarda partenogenetik gelişmenin izlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırmanın materyalini, İpekböcekçiliği Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen M, N saf ipekböceği hatları ile M x N ve S x Shunrei hibritlerinin dişi kelebeklerinden elde edilen ovaryum özellikli (döllenmemiş) yumurtalar oluşturmıştır.

Yumurtaların Elde Edilmesi

Larva döneminin sonunda askıya alınan saf ve hibrit ipekböceklerinin kozaları 8. günde askıdan sökülerek koza pamukları alınmış ve kozalar kesilerek cinsiyet ayrımı yapılmıştır. Aynı askı tarihli olmasına dikkat edilerek, her hat için 30 dişi krizalit çıkım tablalarına yerleştirilerek uygun

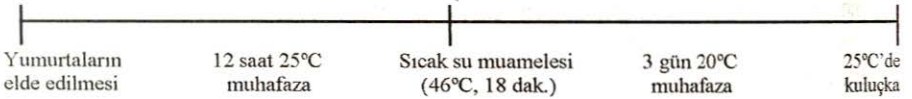
koşullarda bekletilmiştir. Çıkım günü, çıkan kelebekler toplanmış ve labaratuvarında kelebekler sıkılarak döllenmemiş (ovaryum özellikli) yumurtalar alınmıştır. Bol su içinde yıkanan yumurtalar, yumurta tüplerinden ayrılmışlardır. Tanelenen yumurtalar kurutularak yöntemlerin uygulanması için oniki saat süre ile 25°C'de muhafazaya alınmışlardır.

Uygulanan Yöntemler

Döllenmemiş yumurtaların uyarılmasında temel olarak Astaurov⁴, tarafından geliştirilen sıcak su muamelesi uygulanmış ancak araştırmada sıcak su uygulamasının yanısıra başka muamelelerinde uygulandığı farklı 3 yöntem denenmiştir. Yöntemlerin uygulamasıyla ilgili bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

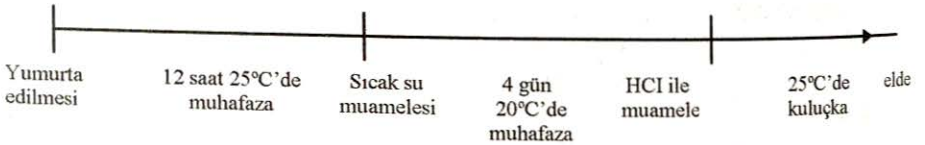
Yöntem 1

Dişi kelebkten elde edilen ovaryum özellikli yumurtalar on iki saat süre ile 25°C'de muhafaza edildikten sonra sıcak su ile (46°C, 18 dakika) muamele edilmişlerdir. Kurutulan yumurtalar 20°C'de üç gün muhafaza edilerek, 25°C'de kuluçkaya alınmışlardır.



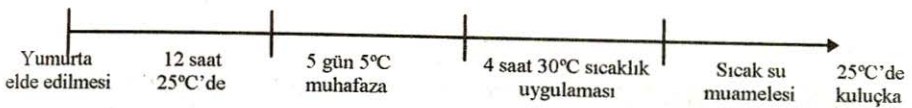
Yöntem 2

Birinci yöntemde açıklandığı üzere, sıcak su muamelesinin ardından yumurtalar dört gün 20°C'de muhafaza edilmişler ve sürenin sonunda 46°C'ye kadar ısıtılmış HCl (% 15 konsantrasyon, 1.075 özgül ağırlık) ile beş dakika süre ile muamele edilmişlerdir. Uygulamaların ardından bol su ile 20 dakika yıkanan yumurtalar, 25°C'de kuluçkaya alınmışlardır.



Yöntem 3

Yumurtalar beş gün 5°C'de muhafaza edildikten sonra 4 saat 30°C sıcaklıkta tutulmuş, ardından sıcak su muamelesi uygulandıktan sonra 25°C'de kuluçkaya alınmışlardır.



Yumurtalar 5°C'de muhafazadan önce ve sonra 2 saat 15°C'de tutulmuş, oda sıcaklığına erişildikten sonra 30°C'ye alınmıştır. Her muamelelerin ardından hazırlanan % 2'lik formalin çözeltisi yumurtalara püskürtülmüştür. Ayrıca partenogenetik gelişmede, yumurtaların embriyonik ve postembriyonik dönemdeki gelişme oranlarının gözlenebilmesi için, her hattan yöntemlere göre alınan yumurta örnekleri KOH eriyiğinde kabukları kırılarak mikroskopta incelenmiştir.

Araştırmalarda, partenogenetik yumurta yüzdesi, hat ve yöntemlere göre ayrılan toplam yumurta içinde koyu renk pigmentasyon gösterenlerin oranlamasıyla hesaplanmıştır. Elde edilen değerler partenogenetik yumurta yüzdesi olarak açıklanmıştır.

Araştırma, 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş, elde edilen değerler önce açığa çıkarılmış ve gruplar arasındaki farklılığın saptanmasında, varyans analizi, farklılığı yaratan grupların belirlenmesinde ise Duncan testi uygulanmıştır¹².

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

M, N saf ve M x N, S x Shunrei hibrit ipekböceği hatlarına ait yumurtalarda parthenogenetik gelişmeye ait varyans analiz sonucu çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge: 1

M, N Saf ve M x N, S x Shunrei Hibrit İpekböceği Yumurtalarında Partenogenetik Gelişmeye Ait Varyans Analizi Sonucu

Varyasyon Kaynağı	SD	Kareler Ortalaması
Hat	3	58.429 **
Yöntem	2	78.900 **
İrk x Yöntem	6	3.306
Hata	24	3927

** P < 0.01

Sonuçların incelenmesinden görüleceği üzere; yumurtalarda elde edilen partenogenetik gelişme üzerine hat ve yöntemin etkisi önemli bulunmuştur (P < 0.01). Saf ve hibrit ipekböceği hatlarına ait yumurtalarda partenogenetik yumurta değerleri ortalamaları çizelge 2'de sunulmuştur.

Çizelge: 2

M, N Saf ve M x N, S x Shunrei Hibrit İpekböceği Yumurtalarında
Partenogenetik Gelişmeye Ait Ortalama Değerler ($\bar{X} \pm S_x$)

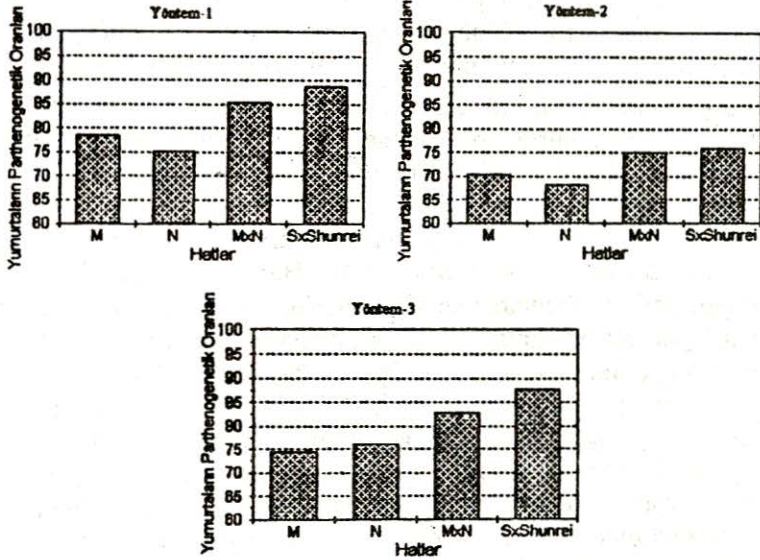
Faktörler	Partenogenetik Gelişme (%)
Hat	
M	74.432 \pm 0.660 c
N	73.193 \pm 0.660 c
M x N	81.039 \pm 0.660 b
S x SHUNREİ	84.089 \pm 0.660 a
Yöntem	
1	81.993 \pm 0.570 a
2	72.302 \pm 0.570 b
3	80.271 \pm 0.570 a
Hat x Yöntem	
M x 1	78.583 \pm 1.140
M x 2	70.363 \pm 1.140
M x 3	74.350 \pm 1.140
N x 1	75.253 \pm 1.140
N x 2	68.077 \pm 1.140
N x 3	76.250 \pm 1.140
(M x N) x 1	85.400 \pm 1.140
(M x N) x 2	74.933 \pm 1.140
(M x N) x 3	82.783 \pm 1.140
(S x SHUNREİ) x 1	88.733 \pm 1.140
(S x SHUNREİ) x 2	75.833 \pm 1.140
(S x SHUNREİ) x 3	87.700 \pm 1.140

a, b, c: $P < (0.01)$

Çizelge 2'den görüleceği üzere, partenogenetik yumurta yüzdesi bakımından en yüksek değeri S x Shunrei hibrit hattı vermiş, bunu M x N hibriti izlemiştir. M ve N saf hatlarının incelenen özellik bakımından daha düşük değer verdiği saptanmıştır. Sekiz saf ve yedi hibrit hattın yumurtalarında sıcak su muamelesiyle partenogenetik yumurta gelişimini inceleyen Ryuzo ve ark.¹¹ hibritlerde partenogenetik gelişme gösteren yumurtaların ortalamasının saf hatlardan yüksek olduğunu ve incelenen değerlerin saf hatlarda % 25'den % 80'e kadar değiştiğini saptamışlardır. Araştırmacılar inceledikleri saf hatların içinden dört tanesinin hibritlerinde heterosis ortaya çıktığını ve partenogenetik yumurta ortalama değerinin hibritlerde % 85'den fazla olduğunu bildirmektedirler.

Araştırmada, yumurtaların partenogenetik gelişimi üzerine uygulanan yöntemlerin etkisi önemli olmuştur. Yöntem 1 ve Yöntem 3, 2. Yönteme göre partenogenetik yumurta gelişimi bakımından daha yüksek değer göstermişler ve benzer grup oluşturmuşlardır (Çizelge 2).

Araştırmada incelenen özellik bakımından hat x yöntem interaksyonu önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte incelenen dört hat için yöntemlere göre partenogenetik yumurta değerleri ortalamaları çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil: 1

Saf ve hibrit hatların yumurtalarında partenogenetik yumurta değerleri

Çizelge 2 ve Şekil 1'den görüleceği üzere M, M x N ve S x Shunrei hatlarında yöntem 1 en yüksek ortalama partenogenetik değeri vermiştir. Uygulanan üç yöntemde de S x Shunrei hattının en yüksek değer gösterdiği görülmektedir. Hem saf hem de hibrit hatlarda HCI muamelesini içeren 2. yöntemin uygulanmasıyla partenogenetik yumurta değerleri düşmüştür. Sugai ve ark.⁸, altı saf ve yedi hibrit hattın yumurtalarıyla yaptıkları çalışmalarında, hibritlerden daha yüksek değer elde ettiklerini bildirmektedirler. Araştırmacılar, hibritlerin ortalama partenogenetik değerlerini, 1. Yöntem sonucunda % 85, ikinci yöntemde % 70, üçüncü yöntemde ise % 90 olarak saptamışlardır. Araştırmada elde edilen sonuçlar bu bulgularla benzerlik göstermektedir.

Hibritlerden daha yüksek partenogenetik değer eldesinin yanısıra yüksek oranda partenogenetik yumurta veren bir dişi kelebkten elde edilen

hibritlerde, partenogenetik yüzdenin artış eğilimi gösterdiği bildirilmektedir¹¹. Elde edilen bu sonuçlardan partenogenesisin ortaya çıkmasının genetik olarak kontrol edildiği ve analık faktörünün anılan değerin ortaya çıkmasını etkilediği sonucuna varılabilir.

Bunun yanısıra Okhuma⁷, eşeyssel üreme söz konusu olmaksızın F₁ generasyonunda partenogenetik döller yoluyla heterosis elde etmiş ancak partenogenetik generasyonlar arasında, uyarımı sağlamak için uygulanan yöntemlerin etkisi dışında bir farklılık saptamamıştır. Araştırmacı Ryuzo¹¹'den farklı olarak partenogenetik gelişimde, maternal faktörlerin etkisinin gözardı edilebilecek kadar küçük olduğunu ve ayrıca, eşeyssel üreme gerektirmeyen yöntemlerle seleksiyon etkinliğinin arttırılabileceğini bildirmektedir.

Araştırmada gerek saf gerekse hibrit hatlarda yöntemlerin uygulanmasının ardından yumurta örneklerinin incelenmesinde, postembriyonik dönemde ölümlerin fazla olduğu gözlenmiştir. Koyu renk pigmentasyon gösteren yumurtaların yarıdan fazlasının gözlerin renklenme devresine kadar (çıkımdan 2 gün öncesi) ulaştığı, ancak ağarma safhasında (çıkımdan 1 gün öncesi) yumurtalarda çökme olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte M x N ve S x Shunrei hibritlerinde Yöntem 1 ve Yöntem 3'ün uygulanması sonucunda çok az sayıda larva inficar etmiş, ancak bu larvaların küçük ve çok zayıf olduğu ve yaşama güçlerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir². İpekböceğinde eşeyli üreyenlerde, embriyonik gelişme döneminde % 97 olan yaşama gücünün, partenogenetik üremede % 20 olduğu bildirilmektedir². Meiotik ve ameiotik partenogenesisle elde edilen hatlar semiletal genlerin baskısı altındadır. Ana ve babanın kopyasının elde edilebildiği uygulamalar, bu genlerin etkisinde kaldığı için ticari üretimde yaygın olarak kullanılamamaktadır. Bunun yanısıra, kombinasyon yeteneği yüksek partenogenetik erkek ve dişilerin kullanımı, heterosis gösteren hatların üretimi için emin bir yoldur. Bu yüzden elde gen kaynağı olarak bulundurulmuş çok sayıda saf ipekböceği hattı ve bunların hibritlerinde, bundan sonraki çalışmalar uygulanan yöntemlerden elde edilen bilgilerin ışığı altında, larva elde etme ve bunların yetiştirilmesi yönünde yoğunlaştırılacaktır.

KAYNAKLAR

1. GURDON, J. B. 1962. Adult frogs derived from nuclei of single somatic cells. *Develop. Biol.* 4, 256-273.
2. STRUNNIKOV, V. A., S. SLEZHENKO and N.L. S' TE PANOVA. 1982. Genetically, identical copies of the mulberry silkworm. *Theor. App. Genet.* 63, 307-315.
3. STRUNNIKOV, V. A. 1983. Control of Silkworm Reproduction, Development and Sex. *Advances in Science and Tecnology*. Moscow, 280.

4. ASTAUROV, B. L. 1967. Artificial parthenogenesis and experimental polyploidy in Silkworm. J. Seric. Sci. Jpn. 36:277 - 288.
5. KWAGUCHI, E. 1934. Cytological and genetical analysis on the parthenogenesis in Silkworm. *Bombyx mori*. L. J. Seric. Sci 5: 1-20.
6. HASHIMOTO, H. 1953. In case of no existence of male and abnormality of sex ratio in *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Jpn. 22, 175-180.
7. OHKUMA, T. 1971. Studies on the mechanism of hybrid vigour by means of artificial parthenogenesis in the silkworm. J. Seric. Sci. 40: 442 - 430 (English summary).
8. SUGAI ETSUJ; A. HITOSHI and K. OTSUKA 1983. Some fundamental studies on parthenogenesis of the silkworm eggs, *Bombyx mori*. L. J. Seric. Sc. Japan 51-57 (English summary).
9. SATO, H. 1934. Cytological and genetical studies on the artificial parthenogenesis in silkworm, *Bombyx mori* L. Appl. Zool. Jpn 6: 178-188.
10. SUGAI, E and K. OTSUKA, 1983. Parthenogenetic development of the ovarion eggs transplanted into male or female silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Jpn 52 (1) 57-60 (English Summary).
11. TAKEI, R. M. NAKAGARI, R. KODAIRA and E. NAGASHIMA, 1990. Factor analysis on the parthenogenetic development of ovarian eggs in the silkworm, *Bombyx mori* L. App. Ent. Zool 25 (1) 43-48.
12. DÜZGÜNEŞ, O. T. KESİCİ, F. GÜRBÜZ, 1983. İstatistik Metodları 1. Ankara Üniv. Zir. Fak. Yayınları 861.