

Denizli ve Gerze Yerli Tavuk Irkları TVB Lokusundaki Yeni Polimorfizmlerin
Araştırılması

Dilan Deniz İlhan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2019

Investigation of the New Polymorphisms at the TVB Locus in Denizli and Gerze Native
Chicken Breeds

Dilan Deniz İlhan

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

May 2019

Denizli ve Gerze Yerli Tavuk Irkları TVB Lokusundaki Yeni Polimorfizmlerin
Araştırılması

Dilan Deniz İlhan

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Kaya

Bu tez ESOGÜ BAP “2018-1766” no’lu proje kapsamında desteklenmiştir

Mayıs 2019

ONAY

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Dilan Deniz İLHAN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırlandığı 'Denizli ve Gerze Yerli Tavuk Irkları TVB Lokusundaki Yeni Polimorfizmlerin Araştırılması' başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Kaya

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ece TURHAN

Üye: Doç. Dr. Özden ÇOBANOĞLU

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Kaya

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu 'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım klavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KAYA danışmanlığında hazırlamış olduğum ‘Denizli ve Gerze Yerli Tavuk Irkları TVB Lokusundaki Yeni Polimorfizmlerin Araştırılması’ başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığıma; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğime; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 13/05/2019

Dilan Deniz İLHAN

İmza

ÖZET

Avian leukosis virusleri (ALV), tavuklarda tümör oluşturan retrovirüslerdir ve bu virüslere karşı henüz bir aşı geliştirilememiştir. Tümör viral B (TVB) lokusu ALV üç alt grubunun viral girişine ortam sağlayan, engelleyen veya aracı olan gruplara özgü yüzey reseptörlerini kodlar. Bu lokusun 172. ve 184. bazlarında iki adet tek nükleotit polimorfizmleri TVB*S1, TVB*S3 ve TVB*R allellerinin ayırt edilmesine imkân sağlar. TVB*S1 üç alt viral girişini destekleyen ALVB, ALVD ve ALVE reseptörlerini kodlar. TVB*S3, ALVB ve ALVD alt gruplarının hücreye viral girişini sağlayan reseptörleri kodlar. TVB*R'nin kodladığı reseptör herhangi bir ALV alt grubunun hücreye viral girişini engeller.

Yapılan bu çalışma ile Türkiye yerli tavuk ırkları olan Denizli ve Gerze tavuklarında TVB*S' ve TVB*R' genotiplerinin varlığı araştırılmıştır. Tarım ve Orman Bakanlığı (TOB) Denizli İli Denizli Horozu Üretme İstasyonu'nda yetiştirilen Denizli ırkına ait dört varyete ve Gerze İlçe Müdürlüğü'ne ait kümeste yetiştirilen Gerze tavuklarına ait toplam 175 tavuğa ait kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. gDNA izolasyonu tavuklardan alınan kan örneklerinden yapılmıştır. TVB*S' ve TVB*R' genotiplerinin varlığı ve mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. 175 örnek içinden iki örneğin TVB*S1/R, üç örneğin TVB*S1/S3, dört örneğin ise TVB*S1/S' genotipte olduğu, diğerlerinin TVB*S1/S1 genotipinde olduğu tespit edilmiştir. Türkiye yerli tavuk ırkları Denizli ve Gerze popülasyonlarında tespit edilen allelerin frekansları sırasıyla TVB*S1 için 0.9730, 0.9815; TVB*S3 için 0.0101, 0.0000; TVB*S' için 0.0135, 0.0000 ve TVB*R için 0.0034, 0.0185 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Denizli horozu, DNA Sekanslama, Gerze tavuğu, Tümör viral B lokus

SUMMARY

Avian leukosis viruses (ALV) are tumor-forming retroviruses in chickens and no vaccine has yet been developed against these viruses. The Tumor viral B (TVB) locus encodes the surface receptors specific to groups that inhibit or mediate the viral input of the three subgroups of ALV. Two single nucleotide polymorphisms on bases 172 and 184 of this locus allow the differentiation of TVB*S1, TVB*S3 and TVB*R alleles. TVB*S1 encodes the ALVB, ALVD and ALVE receptors that support three sub-viral inputs. TVB*S3 encodes receptors that provide the viral input of the ALVB and ALVD subgroups into the cell. The receptor encoded by TVB*R inhibits the viral introduction of any ALV subgroup into the cell.

In this study, TVB*S' and TVB*R' alleles were investigated using the DNA sequence analysis method in indigenous chicken breeds that Denizli and Gerze chicken in Turkey. A total of 175 Denizli and Gerze chicken samples reared in Gerze District Agriculture Directorate and Denizli Rooster Production Station of Denizli Provincial Directorate of Agriculture and Forest Ministry. gDNA was isolated from blood samples taken from chickens. Among the 175 chickens, only two hens were typed as TVB*S1/R genotype, three chickens were typed as TVB*S1/S3, four chicken were typed as TVB*S1/S' and others were homozygous for TVB*S1/*S1. Allele frequencies of TVB*S1, TVB*S3, TVB*S' and TVB*R in Denizli and Gerze chicken breeds were estimated as 0.9730, 0.9815; 0.0101, 0.0000; 0.0135, 0.0000 and 0.0034, 0.0185, respectively.

Keywords: Denizli cocks, DNA sequencing, Gerze fowls, Tumor virus B locus

TEŞEKKÜR

Bu projenin yürütülmesinde, bilgilerini ve sabrını benden esirgemeyen sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Muhammet KAYA'ya ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü öğretim üye ve elemanlarına teşekkürü bir borç bilir ve şükranlarımı sunarım. Lisans ve Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını, bilgilerini, tecrübelerini, güler yüzünü ve samimiyetini bir an olsun esirgemeyen, ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm değerli Tarımsal Biyoteknoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ece TURHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımda aldığım her kararda yanımda olan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hayatımın her evresinde tüm zorlukları benimle göğüsleyen aileme ve özellikle fedakarlık kelimesini hayatımın her aşamasında bana hissettiren canım annem Gülizar İLHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu (Proje No: 2018-1766) tarafından desteklendiği için teşekkürlerimi sunarım.

Dilan Deniz İLHAN

İmza

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	8
2.1. Türkiye Yerli Tavuk Irkları	8
2.2. Avian Leukosis-Sarcoma Virus (ALV)	10
2.3. TVB Lokusu	17
2.4. Dizi Analizi	18
2.5. TVB Lokusu hakkında yapılan çalışmalar	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Hayvan materyali	22
3.1.2. Araç ve gereçler	22
3.1.3. Tampon çözeltiler	23
3.2. Yöntem:	24
3.2.1. Kan örneklerinin alınması	24
3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu	25
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.4. Dizi Analizi	29
3.2.5. Genotiplerin Belirlenmesi ve Gen Frekanslarının Tahmin Edilmesi	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Genomik DNA İzolasyonu	31
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	33
4.3. DNA Dizi Analizi	34
4.4 Genotiplerin Belirlenmesi ve Gen Frekanslarının Tahmin Edilmesi.....	37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	43
EK AÇIKLAMALAR.....	52
Ek Açıklama- A: Araç ve Gereç Listesi.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Tavukçulukta özellikle son 50-60 yıldır sürdürülen genetik ve çevresel ıslah çalışmalarının sonucunda, kanatlı sektöründeki gelişme.....	3
1.2. Tavuk karyotip analizinin görüntülenmesi.....	4
1.3. Kanatlı hayvanlardaki hastalıkların sınıflandırılması.....	5
2.1. Denizli horozu ve tavuğu.....	9
2.2. Gerze horozu ve tavuğu.....	9
2.3. ALV'nin neden olduğu bazı klinik belirtiler ve lezyonlar. (A) Karaciğerdeki lenfoid lökosit lezyonları. (B) Bursa Fabricusta lenfoid lökosit tümörleri. (C) Tavuk kafatası yüzeyindeki myeloid lökosit tümörleri.....	11
2.4. ALV'in Yapısı.....	12
2.5. ALV'nin bulaşma şekilleri 3 şekilde gösterilir. Tavuklarda görülen yatay ve dikey bulaşma, eksojen ALV enfeksiyonunun olası sonuçları. Genetik bulaşma endojen retrovirüslerde sınırlı şekilde bulaşma gösterir.....	15
4.1. İzole edilen genomik DNA'ların %2'lik agaroz jellerindeki görünümü (NK: Negatif kontrol).....	31
4.2. PCR uygulaması sonrasında elde edilen 385 bp'lik PCR ürünlerinin %2'lik Agaroz jellerindeki görünümü (M, 100 bp Fermentas® GeneRuler SMO241 DNA Marker.....	33
4.3. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/ S' genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (C/C) ve 184. (G/T) bazlarının görüntüsü.....	38
4.4. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/ S3 genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (C/C) ve 184. (A/T) bazlarının görüntüsü.....	38
4.5. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/R genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (T/C) ve 184. (T/T) bazlarının görüntüsü.....	39
4.6. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/S1 genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (C/C) ve 184. (T/T) bazların görüntüsü.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Yerli tavuk ırklarının bazı verim değerleri	10
3.1. Çalışmada kullanılan ırklar, varyete, örnek sayısı ve örneklerin alındığı işletmeler ...	23
3.2. Çalışmada kullanılan tampon çözeltilerin molaritesi/miktarı ve içerikleri	24
3.3. Kullanılan primer çifti	27
3.4. PCR programı.....	27
3.5. PCR Reaksiyon Çözeltisinin İçeriği.....	27
4.1. Tavuk materyallerinden saflaştırılan DNA'ların miktar ve kaliteleri (G: Gerze; D: Demirkırı; PK: Pekmezkefi; P: Pamukkırı; A: Al; T: Denizli tavuğu)	32
4.2. Dizi analizi sonuçlarına göre örneklerin sahip olduğu 172. ve 184. nükleotitler	37
4.3. Farklı TVB genotiplerinin dizileri	40
4.4. Türkiye yerli tavuk ırkları TVB lokusundaki allel frekansları	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C

Kg

G

Ph

L

%

Açıklama

Derece

Kilogram

Gram

Asitlik Derecesi

Litre

Yüzde

Kısaltmalar

A

ALV

ART-CH

bç

bd

BrdU

C

CR1

ddNTP

DNA

dNTP

EAV

EV lokusları

G

Kb

L

LL

LTR

mg

MgCl₂

ml

NaCl

ng

Açıklama

Adenin

Avian Lökosit Virüs

Tavuk genomunda Avian Retrotranspozon

Baz çifti

Bidestile su

Bromo Deoksiüridin

Sitozin

Chicken Repeat 1- Tavuk Tekrar 1

Dideoksinükleotitler

Deoksiribonükleikasit

Deoksiribonükleotit

Endojen Avian Virüsü

Endojen Düzenleyici Virüs Genleri

Guanin

Kilobaz

Litre

Lenfoid Lökosit

DNA'da Uzun Terminal Tekrarlar

Miligram

Magnezyum klorür

Mililitre

Sodyum Klorür

Nanogram

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

PCR

rpm

T

TE

TNFR

TOB

UV

V

 μ l**Açıklama**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Dakikada döngü sayısı

Timin

Tris-EDTA

Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü

Tarım ve Orman Bakanlığı

Ultra Violet

Volt

Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

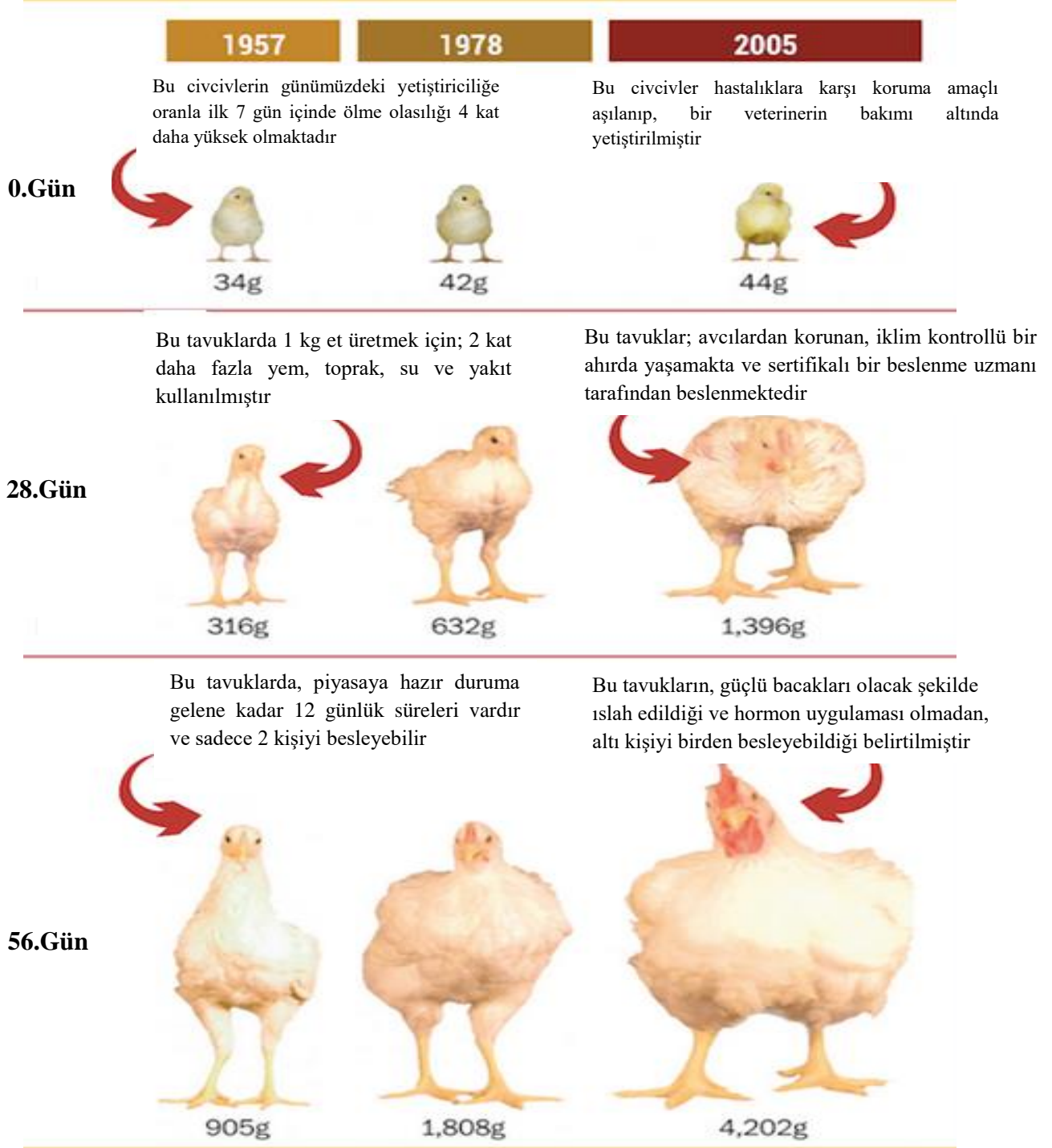
Türkiye’de artan nüfus ve gelirle birlikte kırmızı et üretiminde yaşanan istikrarsızlık ve kırmızı et fiyatlarında süregelen artışlardan dolayı tavuk eti tercih edilmektedir. Bunun birlikte tavuk ürünlerinin ucuz olması, insanların sağlıklı beslenmeye olan ilgisinin artması, İslamiyette yasak olmaması, beyaz et üretiminin iş gücü gereksiniminin az olması, yılın her döneminde üretimin sürdürülebilir olması son yıllarda beyaz et üretiminde büyük bir artışa sebep olmuştur. Türkiye’de 1990 yılında 217.259 ton olan beyaz et üretiminin 2018 yılında 2.156.671 tona yükseldiği görülmektedir (TÜİK, 2018). Tavukçulukta özellikle son 50-60 yıldır sürdürülen genetik ve çevresel ıslah çalışmalarının sonucunda, kanatlı sektöründe çok önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Şekil 1.1). Genetik, ıslah, biyoteknoloji, yem ve yem katkı maddelerinin üretimi, kesimhane ve ileri işleme endüstrisi, ekipman sanayi, yumurta ve yumurta ürünleri endüstrisi, kuluçkacılık, sağlık koruma, ilaç ve aşı endüstrisi, pazarlama, muhafaza ile yetiştirme sistemlerindeki hızlı gelişmeler sayesinde tavukçuluk sektörü üretimden tüketime kadar ilgili olduğu alanların da etkisiyle bir endüstri kolu durumundadır. Türkiye’de yumurta tavukçuluğunda %98.5-99.0 ve et tavukçuluğunda ise %100 oranında yurtdışından damızlık materyal temin edilmektedir. Türkiye’nin yıllık yaklaşık 5 milyon adet etlik damızlık tavuk ihtiyacı bulunmaktadır. Yumurtacı damızlık ihtiyacı ise 500 bin civarındadır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar dışa bağımlılığı azaltmayı hedeflemiştir. Türkiye’de yerli gen kaynağı olarak koruma altına alınan Denizli ve Gerze olmak üzere iki tavuk ırkı vardır. Türkiye’nin yerli ırklarından biri olan Gerze ırkı Karadeniz Bölgesinde Sinop ili çevresinde, Gerze ilçesinde yetiştirilen yerli bir yumurta-et ırkıdır. Yetiştirilen diğer yerli ırk ise Denizli ırkı olup Denizli ve Muğla illeri çevresinde yetiştirilen yerli bir yumurtacı-et ırkı olup horozlarının uzun ötmesi ile tanınmaktadırlar. Ticari açıdan bir değer taşımasa da bu yerli ırklar TOB Lalahan Merkez Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Denizli Tarım İl Müdürlüğü ve Gerze İlçe Tarım Müdürlükleri’nde koruma altında tutulmaktadır (Kaya, 2018). Bununla birlikte TOB Ankara Tavukçuluk Araştırma

Enstitüsünün (TAE) Atabey, Atak ve Atak-S olmak üzere üç tane yumurtacı tavuk hattı bulunmaktadır.

Türkiye’de damızlık etçi tavuk ıslahında yapılan araştırmalar az sayıda olmasına rağmen, damızlık yumurta tavuk ıslahında (Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü) ulusal düzeyde araştırmalar yapılmaktadır. Uzun yıllar yürütölen ıslah çalışmaları sonucunda araştırma ve üretime konu olan ticari ırk ve hatlarda genetik çeşitlilik aşamalı olarak azalmaktadır. Tavukçulukta yeni ticari hatların geliştirilmelerinde daha etkin bir şekilde yerli ırklardan yararlanılması ve yerli ırkların gen kaynağı olarak koruma altına alınabilmesi için bu ırkların morfolojik ve genotipik karakterler bakımından tanımlanması gerekmektedir.

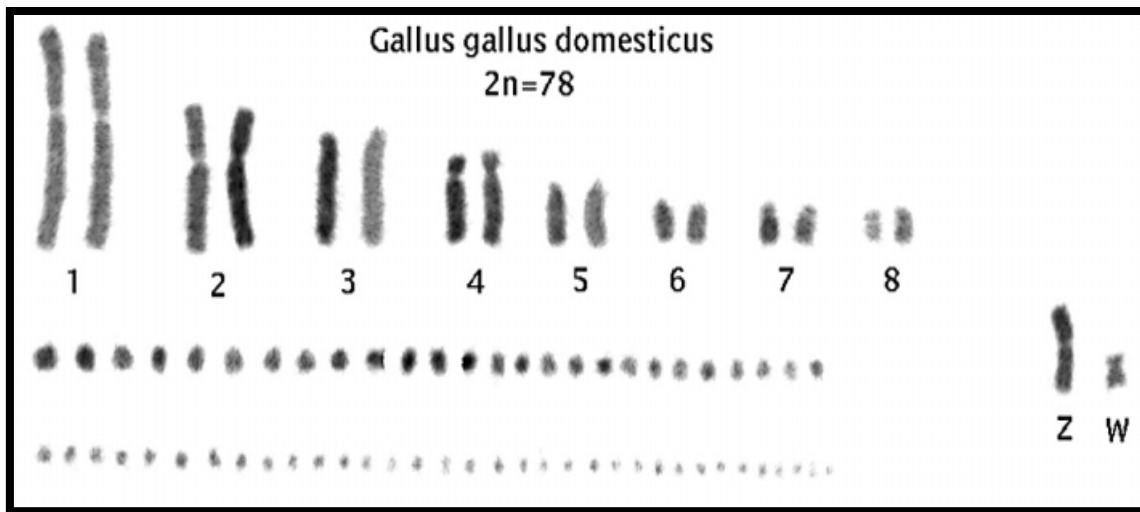
Tavuk karyotipi ($2n=78$), 38 otozomdan ve bir çift cinsiyet kromozomundan oluşmaktadır ve dişi heterogametik cinsiyet (ZW dişi, ZZ erkek) olarak bulunur (şekil 1.2.). Tavuk karyotipini oluşturan kromozomlardan 10 tanesi makro, diğerleri mikro kromozom olarak ayrılmaktadır (Schmid vd., 2005). Tavuk mikro kromozomları dişi genomunun %23’ünü oluşturur ve makro kromozomlara göre daha fazla GC’ce zengindir. Tavuk genomunda ortalama G+C içeriğinin %52 olduğu (bazı bölgelerde % 60’ı aşar) belirlenmiştir (Kretschmer vd., 2018).



Şekil 1.1. Tavukçulukta özellikle son 50-60 yıldır sürdürülen genetik ve çevresel ıslah çalışmalarının sonucunda, kanatlı sektöründeki gelişme (Zuidhof vd., 2014)

DNA dizisi belirlenen ilk kanatlı olan tavuk genomunun ilk taslağı kamuoyuna Mart 2004'te açıklanmış ve dizilerin yaklaşık %88'i, 1-24, 26-28 ve 32 otozom ile W ve Z cinsiyet kromozomlarını içeren kromozomlarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Chicken

Sequencing Consortium, 2004). Takip edilen yıllarda yapılan uluslar arası konsorsiyum çalışmalarında yeni nesil dizileme yöntemleri de kullanılarak tavuk genomu verileri zenginleştirilmiştir (Schmid vd., 2015). Çoğu kuş türü gibi tavuk genomu da insan genomunun 1/3'ü kadar nispeten küçük bir büyüklüğe sahiptir ve genomunun ~%15'inde tekrarlayan DNA'ları içerdiği belirtilmiştir (Wicker vd., 2005). Tavuk genomunda en çok bulunan tekrar elementlerinden olan CR1 (Chicken Repeat 1- Tavuk Tekrar elementi 1), genomun %16'sından fazla alanı kaplamaktadır ve CR1 kopya sayısının 30.496 kopya olduğu belirtilmiştir. Son yapılan çalışmalarda tavuk genomunun 1,136 milyon bç büyüklüğünde olduğu bildirilmiştir (Warren vd., 2017). Tavuk genomu referans konsorsiyomun yaptığı çalışmada belirlenen tavuk genomunun 16.878 kodlanan genler, 7.166 kodlanmayan genler ve 312 pseudo genler içerdiği ifade edilmiştir (Anonim, 2018).

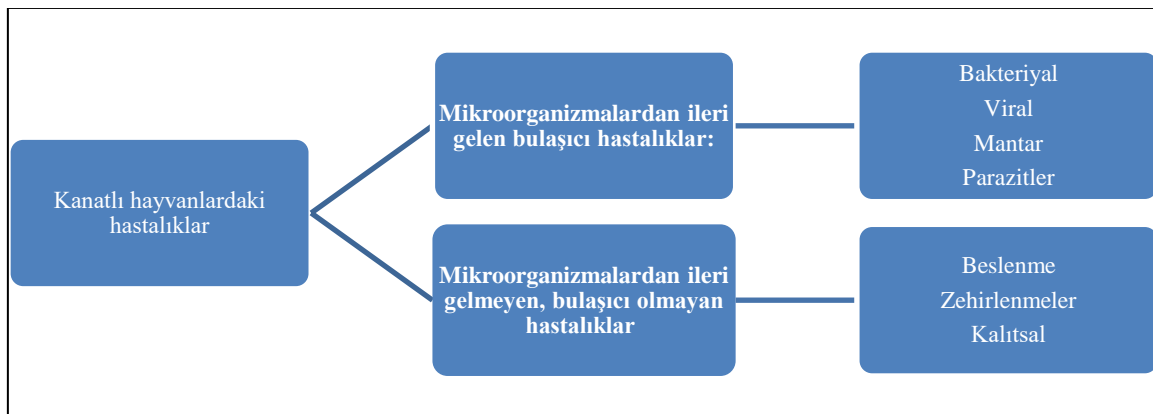


Şekil 1.2. Tavuk karyotip analizinin görüntülenmesi (Schmid vd., 2005)

Tavukçuluk işletmelerinde biyogüvenliği korumak için hastalıkların çıkışını önlemek ve yayılmasını engellemek gerekmektedir. İşletmedeki hayvanların sağlığının korunması için kanatlı sağlığını tehdit eden bakteri, virüs, mantar, protozoa ve parazitlerin sebep olduğu enfeksiyöz hastalıklarla (Şekil 1.3.), bu hastalıkların bulaşmasında rol oynayan etkenlerin işletmeye girişini önlemek gerekmektedir. Bakteriyel hastalıklar da antibiyotiklerle tedavi edilebilmelerine rağmen, Salmonella enfeksiyonlarında olduğu gibi

bazı durumlarda hastalık etkenini tamamen yok etmek mümkün olamamaktadır. Tavukçulukta önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların birçoğu viral kökenli ve bulaşıcı olup, tedavileri mümkün değildir. Tavukçuluk işletmelerinde görülen bazı önemli viral etkenli hastalıklar şunlardır: Avian İnfluenza (Tavuk Vebası, Kuş Gribi); Tavuk Çiçeği, Gumboro (İnfeksiyöz Bursal Hastalık), New Castle Disease (Yalancı Tavuk Vebası), ALV ve Marek hastalığıdır.

Tavukçulukta görülen Kuş gribi, Newcastle, Salmonella ve Marek Hastalığı gibi hastalıklar hayvan ölümü ile sonuçlanan ve insanların sağlığını direkt veya dolaylı yoldan tehdit eden bulaşıcı hastalıklara örneklerdir. Moleküler genetik ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sayesinde tavukçuluk sektöründe büyük tehdit görülen hastalıkların çözümüne yönelik alternatif önerilerin sunulması daha kolay hale gelmiştir. Bu teknikler sayesinde hastalıklara karşı dirençli olan veya dirençli olmayan genotipler belirlenebilmektedir.



Şekil 1.3. Kanatlı hayvanlardaki hastalıkların sınıflandırılması (TOB., 2013)

Kanatlı hayvanlarda belirlenmiş en eski lökotik hastalıkların raporları, 1868'de Roloff'un tanımladığı "lenfosarkomatozis" (Ono vd., 1996) ve 1896'da Caparinin tanımladığı "kuşlarda lösemi" vakaları ABD'de "aleukemik lenfadozoz" tanısı olarak belirlenmiştir (Burnside vd., 2006). Lökosiz ve sarkomlarla ilgili yapılan eski araştırmalar, temel bilimsel ve tıbbi bilgi ve birikimlerin kullanılmasıyla belirlenmiştir. Ancak 1920–1940 tarihleri arasında, kümes hayvanı endüstrisinin ABD ve diğer yerlerde ilerlemesi sonucunda, "kuş lökozu kompleksi" denilen hastalık büyük kayıplara neden olmuştur. Araştırma, özellikle ABD'deki devlet tarım istasyonlarında araştırılmıştır. Amaç bu hastalıkların pratik bir şekilde kontrol edilmesidir (Buckmaster vd., 1988).

Kuş lökozu/sarkom grubunun virüsleri, Retroviridae familyasının Alpharetrovirus cinsi içinde yer alır. Bu ailenin üyeleri, virüs replikasyonu sırasında konakçı genomuna entegre edilmiş bir DNA provirus oluşumu için gerekli olan ters transkriptaz enzimine sahip olma özelliği ile karakterize edilen RNA virüsleridir. Taksonomide, kuş lökozu virüsü (Avian Leukosis Virus-ALV), Alpharetrovirus cinsinin türüdür. Cinsteki diğer türler arasında Rous sarkom virüsü (RSV) ve çeşitli onkogen taşıyan bir dizi replikasyon kusurlu virüs bulunur. Lökos Miyeloid Lösoz da yaygın hale gelmesine rağmen, Lenfoid Löloz (LL), açık alanda yetiştirilen sürülerde en sık görülen L/S hastalık grubudur.

ALV kaynaklı hastalıklar önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıklardan kaynaklanan ekonomik kayıplar iki nedene bağlanır. Bunlardan ilki, tümör mortalitesinden kaynaklı tavuklarda ölüm oranının yaklaşık %1-2, sık görülmesi de %20'ye kadar çıkabilmesidir. İkinci olarak da, ALV hastalığından kaynaklı çoğu sürünün maruz kaldığı subklinik enfeksiyon, yumurta üretimi ve kalitesi de dahil olmak üzere bir dizi önemli performans özelliği üzerinde olumsuz bir etki yaratmaktadır (Gilka ve Spencer, 1995; Geerligs ve Hoogendam, 2007; Gimeno, 2008). ALV tümör mortalitesi ve azalan verim nedeniyle ekonomik kayıpların her yıl milyonlarca ABD doları olduğu tahmin edilmektedir. Halen virüs; Çin, ABD, Kanada gibi ülkelerde kanatlı hayvan endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Morgan vd., 2001; Garcia-Camacho vd., 2003).

Yapılan son çalışmalar tavuk tümörü virüsleri, özellikle ALV ve insan sağlığı arasındaki ilişki incelenmiştir. İnsanlarda ALV hastalığına karşı antikorların varlığına ilişkin kanıtlar genellikle yetersiz veya varsayımsaldır (Imai vd., 1991). Ticari yumurtalarda, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Morrow ve Fehler, 2004; Murata vd., 2007) kullanılarak endojen ve eksojen ALV'ler tespit edilmiş, ancak halk sağlığı açısından önemi belirlenmemiştir. ALV'ler verim kaybına neden olmakla kalmayıp, bulaşıcı olma özelliğiyle de nesilden nesile aktarılıp yayılım göstermektedir. Tavuklarda ALV kaynaklı hastalıkların ölüm oranı %5-40 arasındadır. Ölüm oranlarındaki artışlar, yalnızca yeterli olmayan ortam koşullarına bağlı olmayıp, aynı zamanda hayvanların genetik yapısından da kaynaklanabilmektedir. Buna karşılık bazı yumurtacı soy veya hatların ALV hastalığına karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. ALV

enfeksiyonlarından kaynaklı tavuklarda yaşama oranı, canlı ağırlık, yumurta sayısı ve ağırlığı, kuluçka verimi, döllülük ve cinsi olgunluk yaşını etkilediğinden önemli ölçüde ekonomik kayıplara ve bulaşmayı engellemek için sürülerde ALV'ye dirençli genotiplerin belirlenmesi önemlidir (Yu vd., 2012).

Farklı alt grupların viral girişini sağlayan çeşitli reseptörlerin kodlandığı allellerin bulunduğu lokus olmasından dolayı TVB kompleks bir lokustur (Klucking vd., 2002; Zhang vd., 2005) ve tavuğun 22. kromozomu üzerinde bulunur (Smith ve Cheng, 1998). TVB lokusu üç farklı alleli (TVB*S1, TVB*S3 ve TVB*R) transkribe eder. TVB*S1 ALVB, ALVD ve ALVE'de viral girişini destekleyen reseptörlerini kodlar. TVB*S3, ALVB ve ALVD alt gruplarının hücreye viral girişini sağlayan reseptörleri kodlar. TVB*R alleli ise DNA dizilimi içindeki erken bir stop kodunu nedeniyle eksik bir reseptörü kodlar. Bununla birlikte TVB*R'nin kodladığı reseptör herhangi bir ALV alt grubunun hücreye viral girişini engellemektedir (Barnard ve Young, 2003). Literatürde TVB lokusu 184. bazında tespit edilen (T→A) mutasyonu TVB*R' (Yang vd., 2011) olarak adlandırılan ve Çin yerli tavuk ırkları, TVB lokuslarının belirlenmesi için yapılan çalışmada yeni bir mutasyon tespit edilmiştir (G→T), bu da TVB*S' olarak adlandırılmıştır (Yu vd., 2012).

Bu çalışmada devlet tarafından uzun zamandır koruma altında yetiştirilen Denizli horozu ve Gerze tavuk popülasyonlarının TVB lokusundaki TVB*R' ve TVB*S' (Çin yerli ırklarında tespit edilen) mutasyonu araştırılmıştır ve TVB lokusundaki polimorfizmler incelenmiştir. Yeni belirlenen bu mutasyon araştırılarak Denizli ve Gerze tavuklarının TVB lokusundaki polimorfizmleri belirlenmiştir. Bu sayede Türkiye yerli tavuk gen kaynaklarının moleküler karakterizasyonuna katkı sağlanmış ve yerli tavuk ırklarının korunması çalışmalarına yol göstermesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Türkiye Yerli Tavuk Irkları

Beyaz et, insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan ve yumurta üreten tavukçuluk sektörünün hızla gelişmeye devam eden bir hayvancılık koludur. Yerli tavuk ırklarının yaşama gücünün yüksek olması, çevre koşullarına daha iyi adapte olma ve hastalık etmenlerine karşı dayanıklı olması gibi özellikler göz önünde bulundurulursa diğer ırklara oranla önemli üstün özelliklere sahiptir. Ancak elde edilen verim ve kaliteye bağlı olarak bu popülasyonların ticari anlamda sürdürülebilirlikleri gittikçe zorlaşmaktadır. Ülkemizde Denizli ve Gerze tavuk ırkları olmak üzere iki adet yerli ırk mevcuttur (Şekil 2.1; Şekil 2.2.). Bu ırkların dışında fazla tanınmamakla beraber İngiliz ve Amerikan standartlarında yer alan Sultan isimli tavuk ırkı da yer almaktadır (Türkoğlu ve Sarıca, 2004).

Denizli horozunu yerinde korumak amacıyla TOB Denizli İl Müdürlüğü Denizli Horozu Üretim Çiftliğinde yetiştirilmekte ve korunmaktadır. Bu çiftlikte Denizli horozunun mevcut dört farklı hattı olan Pamuk Kır, Pekmez Kefi, Demir Kır, Al horoz ve tavuk yetiştiriciliği yapılmaktadır. Gerze tavuğu, TOB Gerze İlçe Müdürlüğü Gerze Tavuğu Üretim Çiftliğinde yetiştirilmekte ve korunmaktadır. Ayrıca Denizli ve Gerze ırkları TOB Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğünde koruma altına alınmıştır. Denizli ve Gerze tavuklarına ait bazı verim değerleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Denizli Tavuk Irkı (Kaya, 2008)



Şekil 2.2. Gerze horozu ve tavuğu (Kaya, 2008)

Çizelge 2.1. Yerli tavuk ırklarının bazı verim değerleri (Türkoğlu ve Sarıca, 2004)

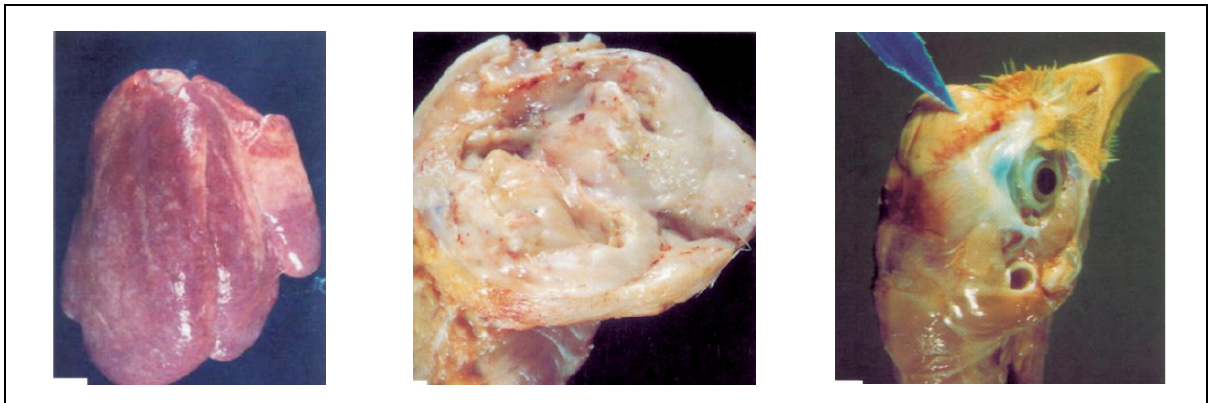
	Denizli	Gerze
Yumurta Rengi	İri beyaz	İri beyaz
Canlı Ağırlık Horoz (42. gün)	3.5- 4.0 kg	2.3 kg
Canlı Ağırlık Tavuk (42. gün)	2.7-3.2 kg	1.7 kg
Yumurta Verimi (Yıllık ort.)	80-100	105.5
Tüy rengi	Horozlar; demir kırığı, pamuk kırığı, pekmez kefi, şarabi ve tavuklar siyah	Parlak siyah tüylü
Kulakçık rengi	Beyaz kulakçıklı	Uzunca beyaz kulakçıklı
İbik	Balta ibikli	Çatal ibikli

2.2. Avian Leukosis-Sarcoma Virus (ALV)

1920-1940 yıllarında ABD'de, ALV'nin kanatlı hayvan endüstrisindeki kayıplara neden olduğu ve evcil hayvan ölümlerinin ana nedeni olduğu ortaya çıkmıştır. Özellikle ABD'de lökozu kontrol etmek amacıyla tarım kolejlerinde ve istasyonlarında birçok araştırma yapılmış, ancak sonuçlarda nörolymphomatozis (kümes felci) ve buna bağlı olarak visceral lenfoma hastalığıyla karıştırılmıştır. Bununla birlikte, Marek hastalığı olarak adlandırılan 1960'lar da bir herpes virüsünün neden olduğu ve bu lökozların retrovirüslerin neden olduğu tümörlerden farklı olduğu vurgulanmıştır. Çeşitli neoplastik hastalıklardan kaynaklanan ciddi ticari kayıplara neden olan bu hastalıkları araştırmak için ABD Tarım Bakanlığı tarafından, 1939'da Michigan'daki East Lansing Bölgesinde Bölgesel Tavukçuluk Araştırma Laboratuvarı kurulmuştur (daha sonra bu Avian Hastalığı ve Onkoloji Laboratuvarı adını almıştır). 1959'da, İngiltere'de Houghton Poultry Research Station'da Peter Biggs tarafından yönetilen bir Lökoz Deney Birimi kurulmuştur (daha sonra Hayvan Sağlığı Enstitüsü'ne katılmıştır). Bu laboratuvarların her ikisinde, temel ve uygulanmış Avian Tümör Virüsü araştırmalarının merkezi haline gelmiş ve birçok önemli başarı elde etmiştir. Dünya genelinde çok sayıda araştırma grubunun kuş lökozu araştırmalarına büyük katkı sağladığı vurgulanmıştır (Payne ve Nair, 2012).

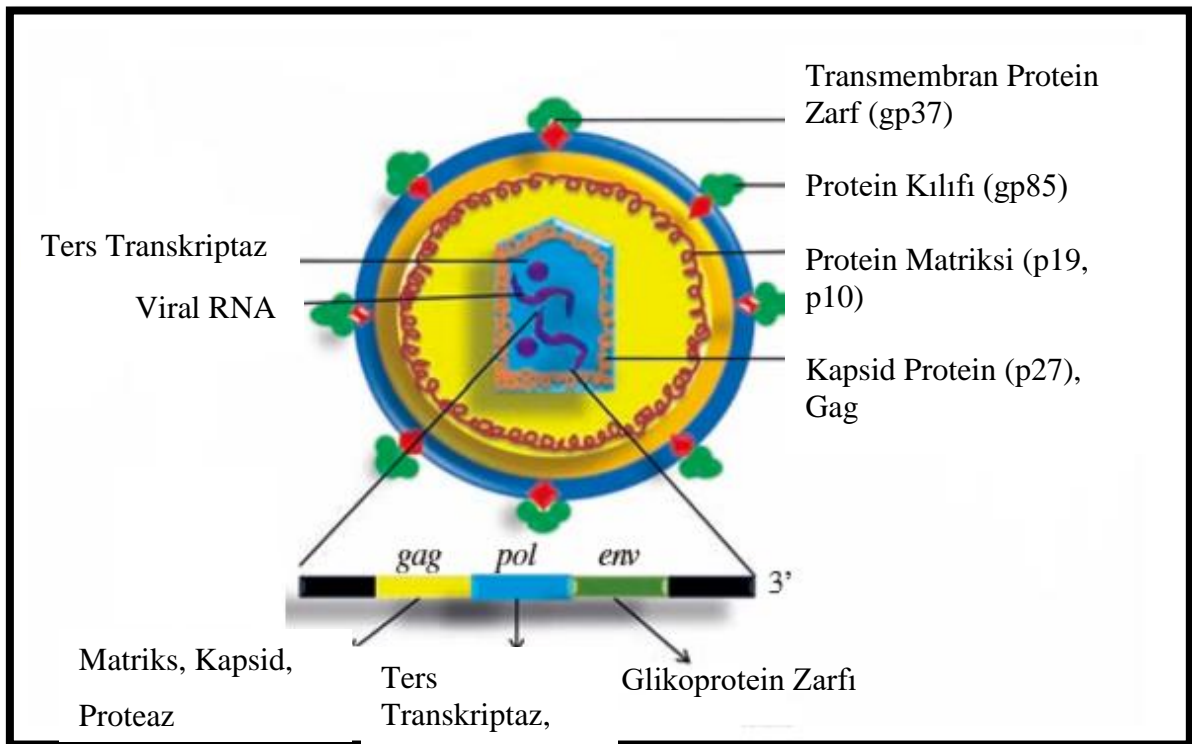
Kanatlı hayvan endüstrisinde ALV'nin neden olduğu kayıplar; çeşitli tümörleri indükleyerek mortaliteyi arttırma, büyüme geriliği, yumurta ve et üretiminde azalmalar, düşük kaliteli yumurta üretimi, bağışıklık sisteminin baskılanması ve ekonomik kayıpların önemli nedenlerine birkaç örnektir. Enfekte olmuş kuş sürülerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur (Fadly ve Nair, 2008; Mohamed vd., 2010). Artan ekonomik kayıpların yanında, ALV enfeksiyonları nedeniyle halk sağlığı ile ilgili endişelerden kaynaklı az sayıda da olsa rapor yayımlanmıştır. Kümes çiftliğinde çalışan işçilerde ve kuşlarla temas etmeyen kişilerde ALV'ye karşı antikor varlığı tespit edilmiştir (Jonhson vd., 1995; Johnson, 2005). Spesifik patojen içermeyen kanatlı hücrelerinde insanlar üzerinde kullanılan canlı aşılarında (kızamık, kabakulak ve sarı humma) düşük seviyelerde ters transkriptaz aktivitesi araştırılmış, ancak aşılarında ALV veya EAV sekanslarının enfeksiyöz virüsünün varlığına dair kanıt bulunamamıştır (Robertson vd. 1997; Tsang vd., 1999).

AL/SV, Orthoretrovirinae ve Retroviridae familyalarında Alpharetrovirus cinsinde sınıflandırılmaktadır (King vd., 2012; Elamurugan vd., 2015). ALV, Alpharetrovirus cinsinin bir türüdür, çeşitli neoplastik ve neoplastik olmayan koşullarda morbidite ve subklinik üretim kayıpları nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktan sorumlu, evcil tavuklar dahil olmak üzere birçok kuş türünde lenfoid lökoza (LL) neden olur (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. ALV'nin neden olduğu bazı klinik belirtiler ve lezyonlar. (A) Karaciğerdeki lenfoid lökosiz lezyonları. (B) Bursa Fabricusta lenfoid lökosiz tümörleri. (C) Tavuk kafatası yüzeyindeki myeloid lökoz tümörleri (Fadly ve Nair, 2008).

AL/SV, dış kısımda virus kılıfı ve iki adet lineer tek iplikli RNA molekülü ile ters transkriptaz (reverse transcriptase) enziminden oluşur (Şekil 2.4.). Genomun büyüklüğü yaklaşık 7.3 kb'dir. RNA molekülü 5'-3' ucundan itibaren ALV yapısal genleri olan gag/pro-pol-env sekansı ile proviral DNA'da uzun terminal tekrarları (LTR) bölgesini oluşturmaktadır. Virion, gag/pro geni tarafından kodlanan glikosillenmemiş protein içerir, bunlar; matriks proteinleri (p19, p10), kapsid proteini (p27) (Gag), nükleokapsit (p12) ve proteaz'dır (p15). Pol geni ters transkriptaz (RT) ve integraz (p32) enzimlerini kodlar. Env geni iki viral zarf glikoproteinini kodlar, bunlar; surface-yüzey (gp85) ve transmembranı (gp37)'dir. Bu iki zarf proteini, virion glikoproteinleri adı verilen bir dimer oluşturmak üzere birbirine bağlanmaktadır (Fadly ve Nair 2008; Wang vd., 2012; Elamurugan vd., 2015).



Şekil 2.4. ALV'in Yapısı (Fadly ve Nair, 2008)

Uzun zaman alan kapsamlı çalışmalar sonucunda Avian Leukosis Virus reseptör kullanımına, konakçı durumuna ve enfeksiyon ile etkileşim durumuna göre tanımlanmış altı ana gruba ayrılmıştır (Zhang vd., 2005). Bu alt gruplardan beşi eksojen (ALVA'dan ALVD' ya kadar ve ALVJ), diğer alt grup olan ALVE ise endojen kuş virüsüdür. Enfeksiyöz virüs partikülleri olarak bulaşma gösteren ALV'lere eksojen virüsler adı verilir.

Bu virüsler içerisinde eksojen virüsler, enfeksiyöz virüs partikülleri olarak bulaşma gösterirken endojen virüsler ise genetik materyal olarak tavuğun kendi genomunda bulunarak bulaşma gösterir. Endojen ve eksojen retrovirüsler arasındaki fark ise, enfekte edebilecekleri konakçı hücre tiplerine göre değişmektedir. Eksojen virüsler sadece somatik hücrelerde yayılırken, endojen retrovirüsler ise bir noktada konağın germ hattı hücrelerini enfekte edebilmekte ayrıca stabil bir şekilde entegre edildiklerinde, konakçı genomunun geri kalanıyla birlikte Mendel tarzında kalıtım gösterdiği belirlenmiştir (Nair ve Fadly, 2013).

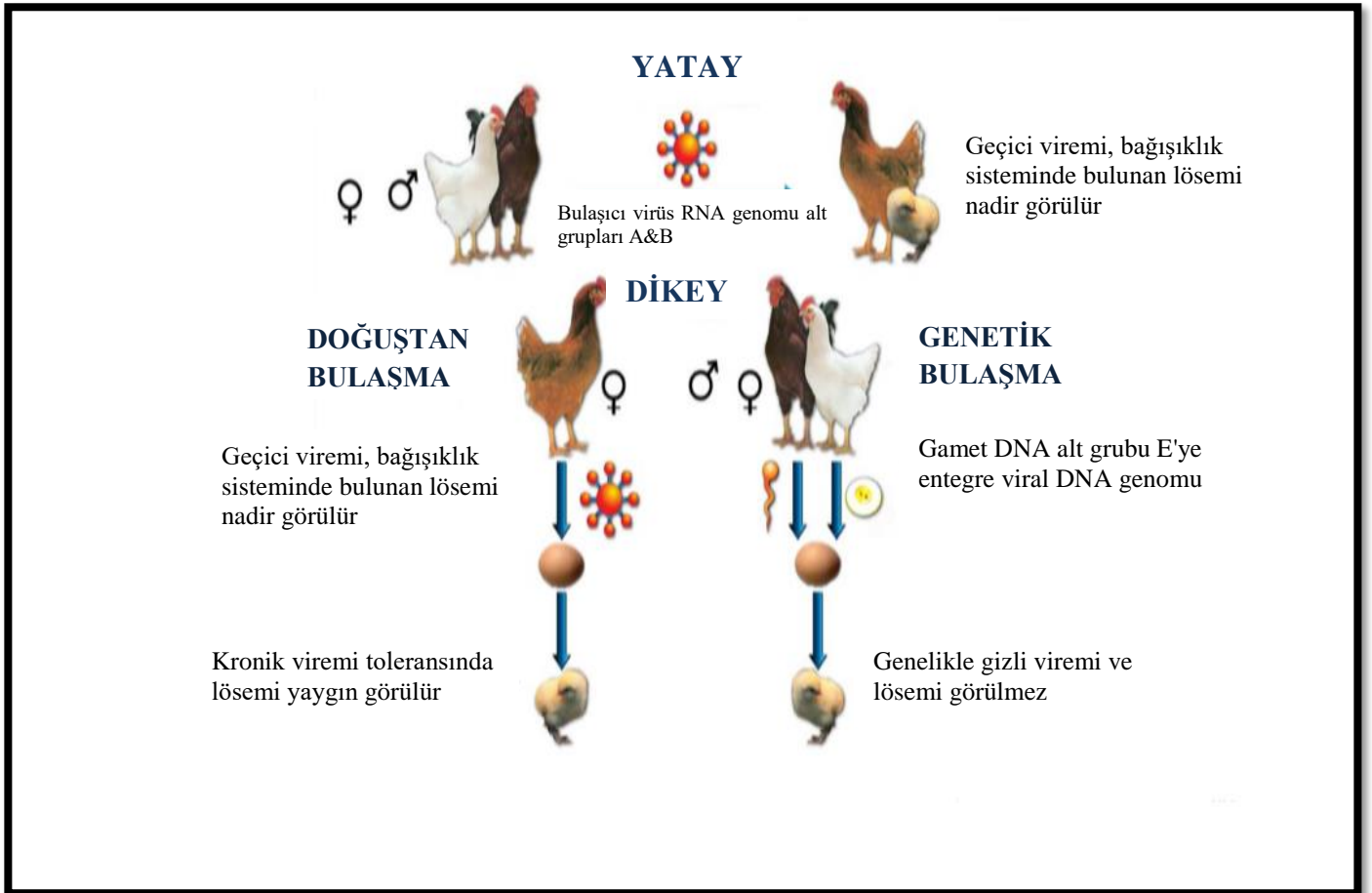
Yaklaşık 30 yıl önce bulunan endojen viral lokusları ve daha yakın zamanda keşfedilen orta derecede tekrarlayan EAV elementleri (Endojen Avian Virüsü) (Cui vd., 2004), ART-CH (tavuk genomundan Avian Retrotranspozon) (Li ve Schat, 2004) ile yüksek oranda tekrarlayan CR1 (tavuk tekrarı 1) elementlerini (Reinke vd., 2010) içerir. Tavuklardaki endojen retrovirüsler, ökaryotlarda bulunan sayısız retroelemente örneklerdir. Bazı geri dönüşümlerde, hücresel olarak hareket edebilen genetik elemanlardan (transpozonlar) retrovirüslerin evrimindeki evreleri temsil ettiği düşünülmektedir ve bazılarının ise dejenere olduğu düşünülürken, mutasyonlar nedeniyle enfeksiyöz virüs üretme yeteneğini yitiren eksojen retrovirüslerin proviral formlarını bulundurlar (Nair ve Fadly, 2013).

ALVE'nin, provirüslerde konakçı kuşların fizyolojik süreçlerini modüle ettiği, çoğu tavuk genomunda bulunan ve normal hücresel genler olarak kalıtsal olabildiği düşünülmektedir (Smith ve Benkel, 2009). Ayrıca farklı ALVE öğeleri, eksiksiz, prototip viral genomunun değişken kısımlarını korumakla beraber her bir provirüs için, konakçı genom içerisinde konumunu, kendine özgü duruma getirir. Böylece ALVE entegrasyon bölgesinin doğasına, proviral genomun tamlığına ve lokusun ekspresyon seviyesine bağlı olarak konakçı fizyolojisini modüle etme potansiyeline sahiptir. ALVE provirüslerinin önemi, taşıyıcı tavukların fizyolojisi üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bazı araştırmalar, ALVE gruplarının hastalık direnci üzerindeki etkilerini, özellikle de ALVE taşıyıcılarının eksojen ALV ile enfeksiyona verdiği yanıtı belgelemiştir (Gavora vd., 1995). Yıllar öncesinde tavuk embriyosundan enfekte olmamış hücrelerde ALV gruplarına özgü (GS) antijeni bulunduğu tavuk hücrelerinin endojen bir virüs varlığı tespit edilmiş ve bu tespit edilmiş virüsün kalıtımı bir gene dayandırılmıştır. Gallus soyundaki toplam

ALVE sayısı henüz belirlenememiş ancak mevcut kanıtlar 50'den fazla farklı ALV tip endojen lokusları olduğu bildirilmektedir. White Leghorn'larda ALVE genlerinin, DNA'da 22 eklenme bölgeleri tanımlanmış ve tavukların bir veya birkaç ALVE genlerine sahip olabildikleri görülmüştür (Crittenden ve Salter, 1992). Bazı ALVE genleri, kalıtsal kromozomal lokasyonlarından aktif olarak kopyalanırken, bazıları (örneğin, ALVE1) kopyalanamamıştır (Ka, 2009). Bu çalışmada belirlenen ALVE'ler; ALVE1, ALVE2 ve ALVE3 olmuştur. ALVE1, 1. kromozom üzerinde, ALVE2, 2. kromozom üzerinde, ALVE3 ise birçok mikrokromozom üzerinde bulunur. ALVE'ler LTR (Uzun Terminal Tekrarı) retrotranspozonlar olarak tanımlanır. Bu endojenler onkogeniktir. Ancak genel olarak hem yumurtacı hem de piliç tavuklarından izole edilirler (Anderson vd., 1998). Endojen viral genomun tamamı mevcut olduğunda, hücre spontan olarak veya Bromo Deoksiüridin (BrdU) gibi kimyasallar tarafından indüklendikten sonra ALVE alt grubu üretebilirler. Bununla birlikte, ALVE lokus çevresinde genetik bir delesyona sahip olup, bulaşıcı viryonlar oluşturmaz. Bu virüsler eksik veya kusurlu olduğunda, mevcut genler hücrelerde fenotipik olarak eksprese edilebilir, ancak bulaşıcı virüs üretilmez. Bunun nedeni, enfeksiyöz virion üretimi için ihtiyaç duyulan tam gen setinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır (örneğin, kusurlu EV3 lokusu ALVE alt grubu GAG ve ENV genlerine sahiptir ve bu lokusu taşıyan hücreler GS antijeni ve alt grup olan E viral zarf glikoproteinleri içerir). Ayrıca endojen virüslerde bulunan EV lokuslarının (endojen düzenleyici virüs genleri) genetik sekansları, hemen hemen bütün normal tavuklarda tam veya hatalı genomlar halinde bulunur. Çok sayıda EV lokusunun kromozomal lokasyonları belirlenmiş (Matsuo vd., 1997) ve tavuk genom sekansının mevcudiyeti genomik lokasyonlarının tanımlanmasını sağlamıştır. Bu belirlenmiş EV lokusları'nın somatik ve germ hattı hücrelerinde bulunup genetik olarak her iki cinsiyet tarafından soy ve hatlarına aktarıldığı tespit edilmiştir. Tek başına ALVE endojen virüs grubu olup tavuktan civcive dikey olarak bulaşır (Fadly ve Nair, 2008).

ALV enfeksiyonuna karşı aşı mevcut değildir (Feng ve Zhang, 2016). Aşı geliştirme konusunda nispeten az araştırma yapılmıştır, çünkü aşılama işleminin immünolojik toleransı indükleyen dikey olarak bulaşan bir virüse karşı etkili olması muhtemel değildir (Şekil 2.5.). Bununla birlikte, erken temas enfeksiyonunu takiben immün enfeksiyonlarından ziyade, ALVJ'nin tolerans gösterme eğilimi civcivlerin erken maruz kalmaya karşı korunması için ALVJ'ye karşı aşuların geliştirilmesine olan ilgiyi

arttırmıştır (Payne ve Venugopal, 2000; Elamurugan vd., 2015). Yatay bulaşmaya karşı korunmak için aşı olarak kullanılabilir ALVA ve ALVJ için zarf glikoproteinlerini ifade edebilen bir rekombinant AL/SV üretilmiştir (Lee vd., 2014; Elamurugan vd., 2015). ALVJ için bir reseptör tanımlanmış ve Na^+/H^+ değiştirici 1 (NHE1) olduğu belirlenmiş olmasına rağmen, virüs bağlanımına izin vermeyen varyantların hücresel dirençleri hakkında henüz bir bilgi bulunamamıştır (Zimber vd., 1983; Elamurugan vd., 2015). ALV hastalığına karşı etkili bir aşı geliştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmış, inaktif ALVB aşısı hazırlanmıştır. Bu durum iyi koşullarda antikor titresinin üretilmesini sağlamıştır (Li vd., 2013; Elamurugan vd., 2015).



şekil 2.5. ALV'nin bulaşma şekilleri 3 şekilde gösterilir. Tavuklarda görülen yatay ve dikey bulaşma, eksojen ALV enfeksiyonunun olası sonuçları. Genetik bulaşma endojen retrovirüslerde sınırlı şekilde bulaşma gösterir (Fadly ve Nair, 2008).

ALV'ye karşı iki ana genetik direnç türü, yani ALV enfeksiyonuna karşı genetik direnç ve lökotik tümörlerin gelişimine yönelik genetik direnç tanımlanmıştır. Üç otozomal lokus olan; TVA, TVB ve TVC bağımsız olarak, virüs reseptörlerinin varlığını kodlayan baskın, duyarlılık genleri ve bu reseptörlerin yokluğunu kodlayan resesif direnç genleri ile sırasıyla ALVA, ALVB, ALVD ve ALVC alt gruplarının enfeksiyona karşı duyarlılığını kontrol eder. Bu hipotezi kullanan moleküler çalışmalar, sadece kodlayan gen üzerinde çalışmakla kalmamış aynı zamanda dirençli ve hassas farkların temelini de ortaya koymuştur. Virüs girişi için tek bir işlevsel reseptör allelin yeterli olduğu kanıtlanmıştır. Çünkü duyarlılık ve baskınlık genetik bir lokusun mevcut durumunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, ALV alt gruplarının ortak bir atadan geldiği ve ilişkili olduğu düşünülse de, hiçbir hücrel reseptör belirgin sekans veya yapısal benzerlik göstermez (Rubin, 2011; Elamurugan vd., 2015).

ALV enfeksiyonlarının tavuklarda yaşama oranı, canlı ağırlığı, yumurta sayısı ve ağırlığı, kuluçka verimi, döllülük ve cinsi olgunluk yaşını etkilediğinden ekonomik kayıpları ve bulaşmayı engellemek için sürülerde ALV dirençli genotiplerin belirlenmesi önemlidir (Yu vd., 2012). Bir tek otozomal resesif gen olan ALVA virüsleri, *in vitro* ve *in vivo* büyümesinde spesifik olarak hücrel direnci kontrol eder (Abdul-Careem vd., 2009). Benzer şekilde, ikinci bir tek otozomal resesif gen olan ALVB virüsleri, karşı direnci kontrol eder (Abujoub ve Coussens, 1997). Bu viral alt gruplara karşı direnç, fenotipik seviyede bağımsız olduğu belirlenmiştir, çünkü dört direnç veya duyarlılık kombinasyonunun her ikisini de bulundurulur. Ancak yapılan çalışmaların hiçbirinde bu genlerin bağlı veya bağımsız olduğu durumu belirlenmemiştir (Nair ve Fadly, 2013).

Konakçı hücrelerde ALVA'dan ALVE'ye kadar ki alt grupların viral girişini engelleyen veya aracı olan gruplara özgü yüzey reseptörlerini kodlamadan sorumlu üç tane otozomal tümör viral (TV) lokusu belirlenmiştir. TVA ve TVC sırasıyla, ALVA ve ALVC virüsleri için hücrel reseptörleri kodlar. TVC lokusunun tavuğun 28. kromozomu üzerinde olduğu belirlenmiştir (Schmid vd., 2000; Elleder vd., 2004). ALVA alt grubu için reseptör 28. kromozom üzerinde bulunan TVA lokusu tarafından determine edilir ve fonksiyonu bilinmeyen (Gimeno, 2008; Barrow vd., 2001), düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) ailesinin bir protein elemanını kodlamaktadır. Direnç sağlayan iki allel tespit edilmiştir. Bu allellerden ilki TVA*R, ALVA zarfına çok düşük bağlanma

afinitesine sahip bir protein ile sonuçlanan bir tek nükleotid mutasyonunu içerir. Diğer direnç alleli olan TVA*R2, değiştirilmiş bir protein ile kodlama dizilimiyle sonuçlanan, başlangıca yakın 4 nükleotid ekleme özelliğine sahiptir. ALVD ve ALVC nadiren açık alanda yetiştirilen sürülerde görülür. ALVC'ye direnç kazandıran TVC lokusu, immünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan butirofilinlerle homolojik özelliğe sahiptir. Dirençli allel, erken bir durdurma kodonu içerir ve bu nedenle tam ve işlevsel bir reseptör üretemez (Gimeno, 2008).

Otozomal TVB lokusunun daha kompleks bir lokus olduğu; ALVB, ALVD ve ALVE için reseptörleri kodladığı tespit edilmiştir (Weiss 1993; Barnard ve Young, 2003). TVB lokusunun fonksiyonel olarak farklı allelleri tespit edilmiştir: TVB*S1; bu üç virüs alt grupları ile enfeksiyona izin verir; TVB*S3; ALVB ve ALVD'nin enfeksiyonuna izin verir ve resesif TVB*R alleli; bu virüslerin herhangi birinin hücreye girmesine izin vermez (Weiss 1993). ALVB ve ALVD'ye özgü bir hücrel reseptör olan tümör nekroz faktörü reseptörüyle ilişkili bir proteini şifreleyen bir tavuk geni olan CAR1'i tanımlanmıştır (Abdul-Careem vd., 2006). Ayrıca, hindilerde homologue tarafından kodlanan bir protein olan SEAR da tanımlanmıştır. CAR1'in özelliklerine dayanarak, bunun TVB*S3 alleli olduğu belirlenmiştir (Brojatsch vd., 1996).

Bazı White Leghorn hatlarında, TVA reseptör geninde 4 farklı genetik dirençli lokus (TVA*R1, TVA*R2, TVA*R3 ve TVA*R4) bulunurken, TVB reseptör geninde tek bir genetik dirençli lokus olan TVB*R bulunur.

2.3. TVB Lokusu

TVB lokusu üç farklı alleli (TVB*S1, TVB*S3 ve TVB*R) transkribe eder. TVB*S1 veya yabancı tip allel, her üç alt gruba da duyarlıdır; aksine TVB*S3 alleli ise, farklı bir tek nükleotit mutasyonu sonucunda ALVE grubuna direnç sağlar. TVB*S1, üç alt viral girişini destekleyen ALVB, ALVD ve ALVE reseptörlerini kodlar. TVB*S3, ALVB ve ALVD alt gruplarının hücreye viral girişini sağlayan reseptörleri kodlar. TVB*R alleli ise DNA dizilimi içindeki erken bir stop kodonu nedeniyle eksik bir reseptörü kodlar. Bununla birlikte TVB*R'nin kodladığı reseptör ALVB, ALVD ve ALVE alt gruplarının hücreye

viral girişini engeller. TVB proteinleri, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ailesi içerisinde yer alır. TVB, memelilerde TNF ile ilgili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri DR4 ve DR5 (Adkins vd., 2001)'e benzeyen bir tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkili ölüm reseptörüdür. Tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) familyası ile ilgili olan bu reseptör için bildirilen birkaç allel vardır. Erken bir durdurma kodonu üreten tek bir nükleotid değişikliğiyle, işlev göstermeyen bir reseptörle beraber üç alt gruba da direnç ile sonuçlanır (Zhang vd., 2005).

TVB reseptörünün ayrıca endojen alt grubu olan ALVE ile enfeksiyonu kontrol ettiği belirlenmiştir. ALV'ye karşı direnç göstermesi, resesif genetik bir özellik ve polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri gibi dirençli tavuk hatlarının seçimine yönelik yaklaşımlar ortaya konulmuştur (Pruková vd., 2007). TVA ve TVB genlerinde tek nükleotid polimorfizmi, ALV'ye dirençli tavuk hatları oluşturmak için çeşitli tavuk hatlarında çalışılmıştır (Liao vd., 2014).

Farklı reseptörleri kodlayan TVB allellerin cDNA dizileri klonlanarak dizi analizleri yapılmıştır. Genbank'ın AF161713, AF161712 ve AF507016.1 katılım numaralarına dayanarak 172. (C/T) ve 184. (T/A) bazlarında iki adet SNP (tek nükleotid polimorfizmi) tespit edilmiş ve buna göre TVB*S1, TVB*S3 ve TVB*R allelerini moleküler olarak ayırt etmek mümkün olmuştur. (Brojatsch vd., 1996; Adkins vd., 2001; Klucking vd., 2002). Bu dizilim verilerine dayanarak (Zhang vd., 2005) yaptıkları çalışma ile tavuklardaki bütün TVB genotiplerini ayırt edebilmek için her iki SNP'i kullanarak bir polimeraz zincir reaksiyonu-kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi geliştirerek valide etmişlerdir. Daha sonra TVB genotiplerini ayırt etmek için DNA sekanslama ve pyrosekanslama analizlerini geliştirmişlerdir (Zhang vd., 2007).

2.4. Dizi Analizi

DNA sekanslama, belirli bir DNA veya RNA molekülünde bulunan nükleotidlerin dizilimini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Polinükleotid zincirlerindeki nükleik asitlerin dizilimleri canlıların kalıtsal özelliklerine ilişkin bilgileri içermektedir. Dolayısıyla bu dizileri belirlemek biyolojik araştırmalar için büyük önem taşımaktadır.

DNA dizilerini belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. İlk dizileme çabaları tek iplikli RNA bakteriyofajlarının genomları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu genomların tamamlayıcı bir ipliğe sahip olmaması ve ökaryotik genomlara göre çok daha kısa olmaları nedeniyle dizilemek için oldukça elverişli olduğu düşünülmüştür (Rajabzadeh vd., 2010). 1976 yılında tek iplikli bir RNA virüsü olan bakteriyofaj MS2'nin tüm genomu dizilenmiştir (Gao vd., 2012). 1977 yılında dizileme yöntemleri ile moleküler biyoloji biliminde dönüm noktası oluşturan iki makale yayımlanmıştır. Bunlardan birincisi Maxam-Gilbert yöntemi olarak bilinen DNA dizilerinin çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile bölünmesi ve reaksiyon ürünlerinin jel elektroforezi ile ayrıldığı bir yöntemdir (Maxam ve Gilbert, 1977). Daha yaygın kullanım alanı bulan ve otomasyona uygun olan diğer yöntem ise Sanger yöntemidir. Sanger dizileme, DNA dizisinin polimerizasyonunu spesifik bir şekilde sonlandırılmasına neden olan ddNTP'lerin kullanıldığı bir yöntemdir (Sanger vd., 1977).

Sanger'in zincir sonlandırma tekniği, DNA iplikçiklerinin monomerleri olan deoksiribonükleotitlerin (dNTP'ler) kimyasal analoglarını kullanır. Dideoksinükleotitler (ddNTP'ler), DNA zincirlerinin uzatılması için gereken 3' hidroksil grubundan yoksundur ve bu nedenle, bir sonraki dNTP'nin 5' fosfat ile bir bağ kuramazlar (Avakian vd., 2007). Radyo-etiketli ddNTP'lerin, standart dNTP'lerin konsantrasyonundan daha az yoğunlukta bir DNA uzatma reaksiyonuna karıştırılması sonucunda, ddNTP'lerin iplikçik uzadıkça rastgele dahil edildiklerinde, ddNTP'leri daha fazla ilerlemeyi durdurarak üretebilecek her uzunluktaki DNA ipliğiyle sonuçlanır. Her bir ddNTP bazını içeren dört paralel reaksiyon gerçekleştirerek ve sonuçların bir poliakrilamid jelde koşturulmasıyla, ilgili şablonda bir radyoaktif bant oluşacağından, orijinal şablondaki nükleotit dizisinin ne olduğunu ortaya çıkarmak için otoradyografi kullanılır (Artuso vd., 2012; Darcan ve Türkyılmaz, 2017).

2.5. TVB Lokusu hakkında yapılan çalışmalar

Marmara bölgesinde bulunan damızlık etlik piliç ve etlik piliç ALVJ spesifik antikorların varlığı ticari ELISA (IDEXX) kiti kullanılarak yapılan araştırmada damızlık etlik piliçlerin %76'sında ALVJ spesifik antikorlar olarak belirlenmiştir (Turan ve Yılmaz, 2005).

Tavuklardaki bütün TVB genotiplerini ayırt edebilmek için bu lokusta tespit edilen her iki SNP'i kullanarak bir PCR-RFLP yöntemi geliştirilerek valide edilmiştir (Zhang vd., 2005). Dizi analizine dayalı olarak geliştirilen Pyrosequencing yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada 36 etçi ve 16 yumurtacı tavuk hatlarından farklı sayılarda toplam 3035 tavuktan alınan DNA örnekleri ile yapılan araştırmada (Zhang vd., 2007) çeşitli popülasyonlarda TVB*R allelinin varlığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmadaki etçi hatların %83'ü TVB*S1/S1, %3'ü TVB*R/R ve %14'ü TVB*S1/R allellerini taşıdıkları belirlenmiştir. Yumurtacı hatların %44'ünün TVB*S1/S1, %15'inin TVB*R/R allellere sahip oldukları gözlemlenmiştir.

Çin'in iki yerli tavuk ırkı ve 2 White Leghorn popülasyonunda 258 tavuk arasında pyrosekans yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada WL popülasyonunun birinde TVB*R/R genotipinin frekansı 0.529 olarak tespit edilmiştir. Yerli Çin ırklarından birinin TVB*S1/S1 bakımından homozigot olduğu görülmüştür. Yerli ırklar arasında sadece bir tavukta TVB*S1/R genotipi tespit edilmiştir (Yang vd., 2011).

Çin'de dokuz yerli tavuk ırkı ve White Leghorn ırkında toplam 459 tavuk üzerinden yapılan başka bir çalışmada TVB lokusunun genetik varyasyonu dizileme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Araştırma sonucunda 9 ırk arasında sadece iki ırkta TVB*R alleli tespit edilmiş, frekansı ise White Leghorn'da 0.44 ve Tibet tavuk ırkında 0.11 hesaplanmıştır. Çalışmada yaygın görülen allelin TVB*S1 alleli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan sekans analizi sonucunda yeni bir mutasyon tespit edilmiş (G→T), buna TVB*S' denilmiş ve Tibet tavuk ırkı hariç diğer Çin yerli ırklarında TVB*S1/S' allelleri görüldüğü rapor edilmiştir (Yu vd., 2012).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada White Leghorn hattında TVB*S1 ve TVB*S3 allelleri, yerli Kadaknath tavukları TVB*S1 alleleline sahip olduğu belirlenirken TVB*R alleli tespit edilmemiştir. Kadaknath tavuklarının TVB*S1 alleli bakımından homozigot olduğu tanımlanmıştır (Project Directorate on Poultry in India, 2013).

On yerli Çin ırkı ile 15 ticari etçi tavuk ırkından toplam 1428 tavuk ile yürütülen başka bir çalışma pyrosekans yöntemi kullanılarak TVB*S1, TVB*S3 ve TVB*R allellerinin frekansları sırasıyla 0.71 ile 0.91; 0.00 ile 0.09; 0.04 ile 0.29 arasında tespit

edilmiştir. Yirmi beş ırk arasında 11 ırkın TVB*S1 alleli bakımından homozigot olduğu, on ırkta direnç alleli olan TVB*R alleli görülmüştür (Liao vd., 2014).

Türkiye yerli tavuk ırkları olan Denizli ve Gerze tavuklarındaki TVB genotiplerini belirlemek için PCR-RFLP yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada hem Gerze hem de Denizli ırkında, TVB*S1 alleli yaygın ve TVB*S3 alleli nadir olarak görülmüştür. TVB*R alleli, Gerze popülasyonunda seyrek olarak görülürken Denizli horozu popülasyonlarında tespit edilememiştir. TVB*S1, TVB*S3 ve TVB*R'nin allel frekansları sırasıyla Gerze tavuklarında 0.96, 0.02 ve 0.02, Denizli horozlarında sırasıyla 0.98, 0.02 ve 0.00 olarak hesaplanmıştır (Kaya, 2018).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür.

Yapılan çalışmada Türkiye yerli tavuk ırkları olan Denizli ve Gerze popülasyonlarında 175 tavuktan alınan kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Bu çalışma, alınan kan örneklerinden genomik DNA molekülünün izole edilmesi, TVB lokusunun PCR ile çoğaltılması ve PCR ürünlerinin dizi analizi yapılarak mutasyonların belirlenmesi aşamalarını içermektedir.

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan materyali

Yapılan bu çalışmada hayvan materyali olarak, Çizelge 3.1.'de verilen TOB Denizli İl Müdürlüğü Denizli Horozu Üretim İstasyonu (Denizli) ve Gerze İlçe Müdürlüğü Gerze Tavuğu Üretim İstasyonu'nda (Sinop) bulunan Denizli ve Gerze ırklarına ait popülasyonlardan kan örnekleri alınmıştır. Denizli ırkının mevcut dört farklı tipinin horoz ve tavuklarından 148 ve Gerze ırkının farklı tipi olmadığı için 27 horoz ve tavuklarından (popülasyonun tüm mevcudundan) kan örneği alınmıştır (Çizelge 3.1.).

3.1.2. Araç ve gereçler

Araştırmanın yürütülmesinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarında mevcut bulunan ve Ek A'da açıklanan araç ve gereçler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan ırklar, varyete, örnek sayısı ve örneklerin alındığı işletmeler

İrk	Varyete	Örnek Sayısı	Örneklerin Alındığı İşletmeler
Denizli Horozu	Pamukkırı	30	TOB Denizli İl Müdürlüğü Denizli Horozu Üretim İstasyonu (Denizli)
Denizli Horozu	Demirkırı	30	
Denizli Horozu	Al	22	
Denizli Horozu	Pekmezkefi	28	
Denizli Tavukları	–	38	
Gerze Horozları	–	4	TOB Gerze İlçe Müdürlüğü Gerze Tavuğu Üretim İstasyonu (Sinop)
Gerze Tavukları	–	23	
Toplam		175	

3.1.3. Tampon çözeltiler

DNA moleküllerinin izolasyonu, PCR optimizasyonlarının yapılması, agaroz jellerin hazırlanması ve elektroforez işlemlerinin yapılmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan tampon çözeltilerin molaritesi/miktarı ve içerikleri

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
Eritrosit Lisis	0.32 M/10.95 g 10 mM EDTA / 2ml 5 mM MgCl ₂ /0.0476 g	Sükroz EDTA MgCl ₂
Fizyolojik	75 mM NaCl / 0.4383 g 25 mM EDTA / 5 ml	NaCl EDTA
Lisis TE	500 mM Tris-HCl / 7.882 g 10 mM NaCl / 0.058g 20 mM EDTA / 4 ml	Tris-HCl EDTA NaCl
TE (Tris-EDTA)	10 mM Tris 1 Mm EDTA	Tris EDTA
6M NaCl	5.64 gr NACL 10 ml'ye tamamlanır	NaCl Deiyonizebd H ₂ O
DNA Loading Dye 10x 100 ml	Gliserol 60 ml 250 mg Bromfenol mavisi Tris 150 mM / 33 ml (ph7.6) bdH ₂ O 7 ml	Gliserol Bromfenol mavisi EDTA Deiyonizebd H ₂ O
10x TBE Elektroforez/Jel Tampon çözeltisi 100 ml	90 ml Saf Su 10 ml 10x TBE	Deiyonizebd H ₂ O Tris Borik asit 0.5 M EDTA (pH 8,0)
1x TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi 100 ml	10 ml 1x TBE 90 ml Saf Su	10x TBE Deiyonizebd H ₂ O

3.2. Yöntem:

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

DNA izolasyonu için tavuk ve horozlardan tek kullanımlık ve steril enjektörler kullanılarak tavukların kanat altı toplardamarından antikoagülanlı (EDTA içeren) tüplere 2-5 ml kan örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan kanlar laboratuvara getirilip, genomik DNA izolasyon işlemine kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA molekülünün izole edilmesinde Miller vd., (1988) tarafından belirtilen DNA izolasyon protokolü laboratuvar ortamında aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. -20 °C’de muhafaza edilen kan örnekleri çözülene kadar oda sıcaklığında (23- 25 °C) bekletilmiştir.
2. Her bir kan örneğinden 500 µl alınarak 1.5 ml’lik ependorf tüp içine konulmuştur.
3. Örneklerin üzerine 1.000 µl Eritrosit Lisis Tampon Çözültisi ilave edilmiş ve kısa bir süre vorteksle iyice karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Bekletme süresinin sonunda örnekler 5.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Ependorf tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım (süpernatant) dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan peletlerin (hücre kısmı) rengi gözlenerek peletlerin rengi beyaz olana kadar Eritrosit Lisis Tampon Çözültisi ile tekrar (en fazla 3 defa) muamele edilmiştir.
6. Peletlerin üzerine 1.000 µl Fizyolojik Tampon Çözültisi eklenmiş ve kısa bir süre karıştırılmıştır.
7. Örnekler 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.
8. Peletlerin üzerine 600 µl Lisis TE Tampon Çözültisi eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.
9. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl SDS (%10’luk) solüsyonu ve 7.5 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılarak ve 37 °C’de 12 saat su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince örnekler her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılmıştır.
10. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 200 µl 6M NaCl Çözültisi eklenmiş ve 15 dakika vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra örnekler, 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine koyulmuştur.
12. Örnekler 14.000 rpm’de 10 dakika tekrar santrifüj edilerek tuzun tamamen uzaklaştırılması sağlanmış üstte kalan sıvı kısım, yeni bir ependorf tüp içine konulmuştur.

13. Örnekler üzerine örnek hacminin iki katı hacimde (yaklaşık 1.000 µl) %99.9'luk saf etil alkol (-20 °C'de muhafaza edilen) ilave edilmiştir.
14. Etil alkol ilave edildikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 4-5 kez hafifçe karıştırılmıştır.
15. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 3.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
16. Santrifüj sonunda etil alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletlerinin üzerine 1.000 µl %70'lik etil alkol ilave edilerek 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
17. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde yer alan alkol uzaklaştırılmıştır.
18. Tüp içindeki alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler, çeker ocak içinde kurumaya bırakılmıştır.
19. Tamamen kuruyan örnekler üzerine 500 µl deiyonize bdH_2O ilave edilerek DNA peletlerinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 °C'de bekletilmiştir.
21. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının (kırılıp kırılmadıklarının) kontrolleri %2'lik agaroz jellerde yapılmıştır.
22. Genomik DNA izolasyonunun miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında Nano Drop Spektrofotometre (ND 1000)'den yararlanılmış ve elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hücrede normal şartlar altında gerçekleşen doğal DNA çoğaltımının laboratuvar şartlarında (*in vitro*) özel aletler (termal cycler) yardımı ile gerçekleşmesi olayına Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction) denilmektedir. Burada nükleik asit dizilerinin kalıp DNA'ya göre çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Bu süreçte komplementerlik temelinde eksenlerin (kalıp DNA/primer) eşlenmesi ve hızlı bir şekilde yeni eksen sentezi yapıldığından, çok az miktardaki DNA molekülünden kısa bir süre içinde çok sayıda hedef DNA molekülünün sentezlenmesi gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmada, TVB gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla içeriği Çizelge 3.3'de verilmiş olan primerden (Laboratuvarımızda M. Kaya tarafından dizayn edilmiştir) yararlanılarak Çizelge 3.4'de verilen PCR döngüsü kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Kullanılan primer çifti.

TVB 385	F: 5' ATG AAC TCA TAC TTC TTT CCA TTC C 3'
	R: 5' ATG CAC CCA AAC CCT CCC AGT CC 3'

Çizelge 3.4. PCR Programı.

94 °C → 5 dk	35 Döngü	Ön Denatürasyon
94 °C → 1 dk		Denatürasyon
60 °C → 1 dk		Annealing
72 °C → 1 dk		Extension
72 °C → 10 dk		Son Extension

Araştırmada, bir örnek için toplam hacim 50 ul olacak şekilde içeriği Çizelge 3.5’de verilen PCR reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. PCR işleminin tamamlanmasından sonra TVB lokusunun 385 bç genetik kusurun meydana geldiği gen bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığının kontrolü için %2’lik agaroz jeller kullanılmıştır. PCR ürünlerinin kontrolünden sonra hizmet alımı yoluyla yapılan DNA dizi analizi işlemine geçilmiştir.

Çizelge 3.5. PCR Reaksiyon Çözeltisinin İçeriği

1x’lik PCR Reaksiyon Karışımı		Miktar (µl)
DNA		3
10x PCR Tamponu		5
2,5 mM MgCl ₂		5
dNTPs (2 mM her birinden)		5
Primerler	Forward	1
	Reverse	1
bdH ₂ O		29.75
Taq Polimeraz Enzimi		0.25
Toplam		50

Reaksiyonlar toplam 3 µl DNA (50-100 ng) + 47 µl PCR karışımı (mix) olacak şekilde 50 µl hacimde 200 µl'lik PCR tüplerinde yapılmıştır. PCR uygulamaları Thermofisher Scientific Thermal Cycler marka cihazda yürütülmüştür. Cihazın kapak sıcaklığı 105° C olacak şekilde PCR programı ayarlanmıştır. Bu uygulamanın amacı PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemektir. Amplifikasyonlarda kullanılan reaksiyon koşulları ve döngüsü Çizelge 3.5'e göre yapılmıştır.

Jel elektroforezi, makromolekülleri büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özellikler temelinde ayıran bir yöntemdir. Elektroforez terimi, elektrik akımı etkisi altında yüklü partiküllerin hareketini açıklamaktadır (Aşcıoğlu vd., 2002). Bundan dolayı TVB genotiplerin PCR ürünlerinde elektroforez işlemi için %2'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi olarak Çizelge 3.3'de içeriği verilen 1x Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi önce 10x Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi olarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Hazırlanan bu stok solüsyonu deiyonize su ile 10 katı kadar sulandırılarak (1x TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi) hem jelin hazırlanmasında hem de elektroforez tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 100 ml, elektrolit çözeltisi olarak da 1000 ml 1x TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi kullanılmıştır.

PCR işlemleri tamamlandıktan sonra, PCR ürünlerinin elektroforetik ayrımı için %2'lik agaroz jel (Sigma Agarose Basica LE) kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlığı için; 4 gr agaroz tartılıp, 500 ml'lik erlenmayerin içine konmuş ve üzerine 200 ml 1x TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi (Çizelge 3.3.) eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti içerisinde agaroz karıştırıldıktan sonra jel tampon çözeltisi mikrodalga fırının da 250– 300 °C'de 3- 5 dakika kaynatılarak eritilmiştir. Jel kaynatıldıktan sonra 60° C'ye kadar soğutulup üzerine 7.5 µl Safeview (ABM, Kanada) çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan jel 8x20x0,8 cm ebatlarında olan jel tablasına dökülmüş ve tablaya 20 kuyucuklu tarak yerleştirilerek oda sıcaklığında soğuması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra tarak kuyulara zarar vermeden ve jeli yırtmayacak bir şekilde dikkatlice çıkartılmıştır. Hazırlanan jel 1x TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi ile dolu olan yatay

elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra üzerini kaplayacak şekilde 1x TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi ilave edilmiştir.

PCR ürünlerinden 15 µl alınarak parafilm üzerine konulmuş ve üzerine 3 µl DNA Yükleme Tampon Çözeltisi (Çizelge 2.3.) eklenmiştir. Örneklerin jele yüklenmesinden önce PCR ürünlerinin tüplerin kenarlarına yapışma ihtimalini azaltmak için bu karışım 3-5 sn mikrosantrifüjde 3.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Hazırlanan karışımlar kuyucuklardan taşmayacak şekilde dikkatle yüklenmiştir. PCR ürünlerinin büyüklüklerinin ayırımı için 100 bç’lik (Fermentas® GeneRuler SMO241) standart DNA markeri (DNA Ladder) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi, 125 V’de 45 dakika yürütülmüştür.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için jel elektroforez tankından çıkarılmış ve Jel Görüntüleme Analiz Sisteminde (Kodak Gel Logic 200) fotoğrafları çekilerek elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.2.4. Dizi Analizi

PCR örneklerinin temizliği ve DNA sekanslama uygulamaları Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Bu işlemler yürütülürken PCR ürünü temizleme PCR clean-up (Macherey-Nagel, Almanya) adlı kit ve DNA dizi analiz BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit adlı ticari kitle ABI 3500 cihazında yapılmıştır.

3.2.5. Genotiplerin Belirlenmesi ve Gen Frekanslarının Tahmin Edilmesi

Araştırmada elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi yapılarak TVB lokusunun 172. ve 184. nükleotidindeki mutasyon araştırılmıştır. Yapılan PCR sonucunda hayvanların çoğaltılan DNA bölgesindeki mutasyon dizi analizi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. DNA dizi analizi sonucunda hayvanların genotipleri belirlenmiş ve gen frekansları hesaplanmıştır.

Tavuklarda TVB genotiplerinin frekansı ve standart hataların hesaplanmasında gen sayma (counting the number of genes) yönteminden yararlanılmıştır (Nei, 1987). Çünkü muhtemel olan tüm genotipler belirlenmiş olup, gen frekanslarının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılarak bu genotiplerden yararlanılmıştır. Gen frekansları hesaplanırken PopGene programından faydalanılmıştır.

$$P_i = \frac{(2f_1 + f_2)}{2N}$$
$$S_{P_i} = \sqrt{\frac{P_i(1-P_i)}{2N}}$$

P_i : i'inci allelin frekansı

f_1 : i'inci allel bakımından homozigot genotipli bireylerin sayısı

f_2 : i'inci allel bakımından heterozigot genotipli bireylerin sayısı

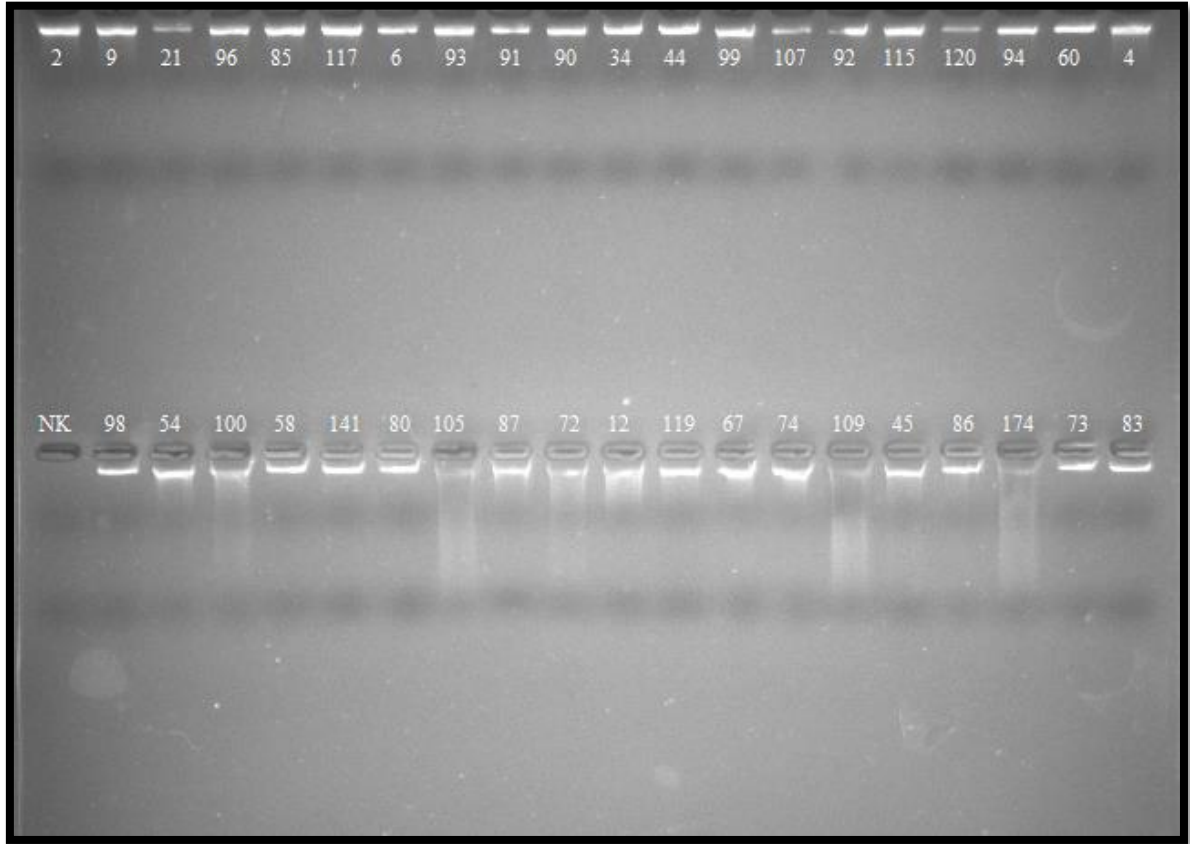
N : i'inci lokus bakımından toplam birey sayısı

S_p : i'inci allel frekansının standart hatası

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Genomik DNA İzolasyonu

Denizli ırkının horoz ve tavuklarından 148 örnek, Gerze ırkının horoz ve tavuklarından 27 örnekte kan örneği alınmış, genomik DNA salting out yöntemi kullanılarak izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen gDNA'ların miktar ve saflık kontrolleri spektrofotometrede 260/280 nm dalga boyunda kontrol edilmiş ve elde edilen miktar ve kaliteleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA örnekleri agaroz jelde kontrol edilmiştir. Bazı örneklerin jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. İzole edilen genomik DNA'ların %2'lik agaroz jellerindeki görünümü (NK: Negatif Kontrol)

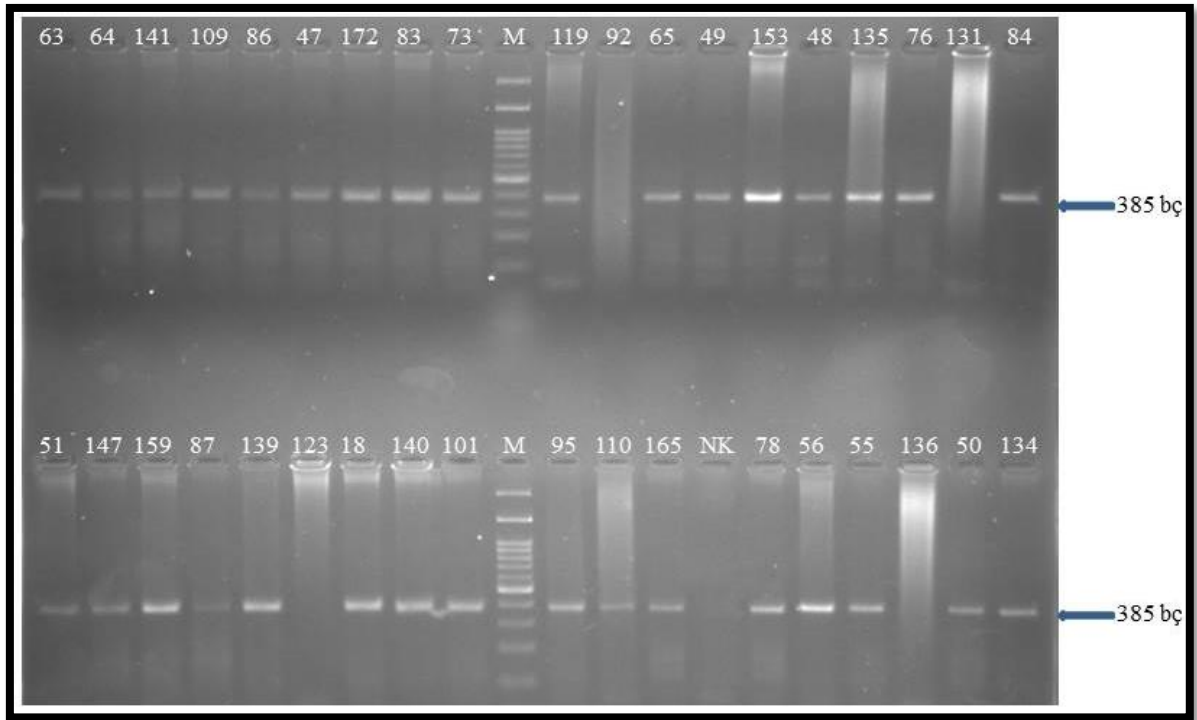
Çizelge 4.1. Tavuk materyallerinden saflaştırılan DNA'ların miktar ve kaliteleri (G: Gerze; D: Demirkırkı; PK: Pekmezkefi; P: Pamukkırı; A: Al; T: Denizli tavuğu)

Kod	ng/ul	260/280	260/230	Kod	ng/ul	260/280	260/230	Kod	ng/ul	260/280	260/230
G1	160	1,91	2,27	PK1	182	1,89	2,39	P1	144	1,91	2,33
G2	253	1,87	2,31	PK2	54	1,73	2,27	P2	75	1,85	2,21
G3	182	1,85	2,22	PK3	248	1,9	2,42	P3	222	1,84	2,34
G4	257	1,81	2,36	PK4	221	1,91	2,41	P4	285	1,88	2,31
G5	204	1,9	2,25	PK5	277	1,89	2,42	P5	285	1,88	2,36
G6	228	1,9	2,23	PK6	156	1,9	2,33	P6	194	1,91	2,39
G7	178	1,88	2,29	PK7	250	1,88	2,43	P7	166	1,91	2,38
G8	161	1,91	2,18	PK8	156	1,88	2,36	P8	129	1,88	2,31
G9	249	1,93	2,09	PK9	185	1,91	2,39	P9	263	1,89	2,41
G10	256	1,86	2,38	PK10	228	1,89	2,4	P10	252	1,89	2,4
G11	284	1,85	2,04	PK11	215	1,89	2,42	P11	176	1,92	2,34
G12	148	1,9	2,05	PK12	225	1,89	2,4	P12	273	1,87	2,2
G13	282	1,88	2,24	PK13	66	1,38	1,25	P13	249	1,91	2,38
G14	147	1,92	2,16	PK14	123	1,88	2,31	P14	108	1,88	2,3
G15	141	1,86	2,35	PK15	123	1,88	2,35	P15	128	1,88	2,29
G16	92	1,86	2,14	PK16	127	1,87	2,38	P16	209	1,92	2,36
G17	223	1,91	2,22	PK17	240	1,9	2,38	P17	142	1,84	1,6
G18	193	1,89	2,19	PK18	266	1,88	2,39	P18	203	1,88	2,34
G19	153	1,86	2,3	PK19	158	1,87	2,36	P19	285	1,94	1,91
G20	141	1,86	2,3	PK20	51	1,76	2,22	P20	137	1,89	2,38
G21	263	1,88	2,34	PK21	21	1,76	2	P21	129	1,88	2,38
G22	246	1,8	1,99	PK22	265	1,88	2,44	P22	195	1,86	2,31
G23	91	1,89	2,12	PK23	180	1,85	2,39	P23	253	1,89	2,37
G24	141	1,88	2,23	PK24	121	1,88	2,31	P24	250	1,92	2,37
G25	150	1,92	2,31	PK25	131	1,88	2,33	P25	212	1,86	2,34
G26	139	1,89	2,28	PK26	138	1,88	2,32	P26	163	1,88	2,31
G27	169	1,85	2,1	PK27	179	1,89	2,35	P27	179	1,89	2,37
D1	137	1,84	2,34	PK28	135	1,8	2,28	P28	245	1,89	2,42
D2	189	1,84	2,22	T138	221	1,9	2,22	P29	170	1,89	2,32
D3	214	1,87	2,36	T139	217	1,91	2,22	P30	218	1,88	2,34
D4	197	1,89	2,42	T140	109	1,89	2,24	A1	84	1,86	2,29
D5	116	1,9	2,34	T141	90	1,88	2,15	A2	243	1,88	2,4
D6	132	1,91	2,4	T142	70	1,86	2,01	A3	262	1,89	2,39
D7	175	1,88	2,38	T143	131	1,91	2,19	A4	153	1,89	2,34
D8	107	1,8	2,18	T144	101	1,87	2,19	A5	189	1,94	2,33
D9	269	1,89	2,38	T145	115	1,91	2,14	A6	257	1,88	2,39
D10	147	1,83	2,38	T146	184	1,74	1,84	A7	107	1,87	2,36
D11	230	1,88	2,32	T147	109	1,91	2,14	A8	97	1,86	2,27
D12	142	1,9	2,32	T148	110	1,9	2,28	A9	265	1,89	2,43
D13	233	1,92	2,38	T149	182	1,9	2,36	A10	197	1,91	2,37
D14	245	1,89	2,35	T150	102	1,88	2,33	A11	215	1,86	2,27
D15	215	1,88	2,35	T151	125	1,82	1,95	A12	271	1,92	2,4
D16	61	1,86	1,93	T152	54	1,85	2,08	A13	196	1,9	2,39
D17	241	1,84	2,12	T153	167	1,92	2,34	A14	247	1,89	2,37
D18	234	1,9	2,41	T154	94	1,89	2,2	A15	99	1,91	2,29
D19	126	1,9	2,35	T155	108	1,9	2,31	A16	175	1,88	2,39
D20	180	1,9	2,38	T156	142	1,88	2,04	A17	192	1,88	2,39
D21	264	1,9	2,38	T157	136	1,89	2,32	A18	165	1,88	2,38
D22	235	1,89	2,39	T158	199	1,87	2,38	A19	121	1,88	2,41
D23	195	1,89	2,33	T159	153	1,92	2,22	A20	216	1,92	2,36
D24	147	1,87	2,32	T160	169	1,88	2,31	A21	118	1,85	2,29
D25	96	1,85	2,3	T161	284	1,9	2,33	A22	214	1,9	2,42
D26	194	1,9	2,31	T162	132	1,88	2,28	T166	129	1,91	
D27	263	1,89	2,35	T163	196	1,9	2,28	T167	115	1,91	2,31
D28	157	1,89	2,36	T164	151	1,91	2,34	T168	52	1,46	0,64
D29	165	1,88	2,33	T165	254	1,9	2,21	D30	179	1,89	2,38

Yapılan bu çalışmada DNA saflaştırılması için DNA salting out yöntemi kullanılırken, TVB lokusununaki polimorfizmleri belirlemek için yapılan bazı çalışmalarda (Yang vd., 2011; Yu vd., 2012; Liao vd., 2014; Kaya, 2018) fenol-kloroform yöntemiyle DNA izole edilmiştir. DNA miktarı spektrofotometre ile ölçülerek PCR çalışmasında 50-100 ng gDNA kullanılmıştır.

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR uygulama sonrası 385 bç (Şekil 4.2.) uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. Tüm örneklerdeki 385 bç PCR ürünü agaroz jelde kontrol edildikten sonra dizi analizi için ilgili firmaya gönderilmiştir.



Şekil 4.2. PCR uygulaması sonrasında elde edilen 385 bç'lik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jellerindeki görünümü (M, 100 bç Fermentas® GeneRuler SMO241 DNA Marker)

TVB lokusunda bulunan iki SNP'i belirleme çalışmalarında kullanılan PCR-RFLP yönteminde (Zhang vd., 2005; Project Directorate on Poultry in India, 2013; Kaya, 2018) 303 ve 202 bç büyüklüğünde PCR ürünü veren iki primer çifti kullanılırken, pyrosekans

çalışmalarında (Zhang vd., 2007; Liao vd., 2014) 303 bç primer çiftinin yanında sekans primeri kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada ise 385 bç büyüklüğünde PCR ürünü veren primer çifti kullanılmıştır.

4.3. DNA Dizi Analizi

PCR örneklerinin sekans analizi için temizliği ve DNA dizi belirleme işlemleri hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. 385 bç büyüklüğündeki PCR ürünlerinin DNA sekans analizi yapılması için öncelikle PCR karışımında bulunan dNTP ve primer artıkları ile istenmeyen moleküller PCR clean-up kiti kullanılarak temizlenmiştir. Örneklerin çift yönlü DNA dizi analiz BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit adlı ticari kit prosedürüne uygun olarak ABI 3500 cihazında yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan örnek DNA'ları, TVB lokusunun ilgili SNP noktalarını içeren primerler ile yükseltgenerek 385 bç uzunluğundaki PCR ürünleri elde edilmiş ve bu ürünlerin dizi analizleri yapılmıştır. Elde edilen dizi analizi sonuçlarından örneklerin sahip olduğu 172. ve 184. nükleotitleri belirlenerek Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çeşitli tavuk popülasyonlarındaki TVB genotiplerini araştırmak için PCR-RFLP (Zhang vd., 2005; Project Directorate on Poultry in India, 2013; Kaya, 2018), pyrosekans (Zhang vd., 2007; Yang vd., 2011; Liao vd., 2014) ve dizi analizi (Yu vd., 2012) yöntemlerinden yararlanılmıştır. Pyrosekans ve dizi analizi yöntemleri çalışmalarında muhtemel mutasyonlar ortaya çıkarılabilmektedir (Yu vd., 2012).

Çizelge 4.2. Dizi analizi sonuçlarına göre örneklerin sahip olduğu 172. ve 184. nükleotitler

Kodu	Irk	172. baz	184. baz	Kodu	Irk	172. baz	184. baz
T1		C/C	T/T	T42		C/C	T/T
T2		C/C	T/T	T43		C/C	T/T
T3		C/C	T/T	T44		C/C	T/T
T4		C/C	T/T	T45		C/C	T/T
T5		C/C	T/T	T46		C/C	T/T
T6		C/C	T/T	T47		C/C	T/T
T7		C/C	T/T	T48		C/C	T/T
T8		C/C	T/T	T49		C/C	T/T
T9		C/C	T/T	T50		C/C	T/T
T10		C/C	T/T	T51		C/C	T/T
T11		C/C	T/T	T52		C/C	T/T
T12		C/C	T/T	T53		C/C	T/T
T13		C/C	T/T	T54		C/C	T/T
T14	Gerze	C/C	T/T	T55		C/C	T/T
T15		C/C	T/T	T56		C/C	T/T
T16		C/C	T/T	T57		C/C	T/T
T17		C/C	T/T	T58		C/C	T/T
T18		C/C	T/T	T59		C/C	T/T
T19		C/C	T/T	T60		C/C	T/T
T20		T/C	T/T	T61		C/C	T/T
T21		C/C	T/T	T62	Denizli	C/C	T/T
T22		C/C	T/T	T63		C/C	T/T
T23		C/C	T/T	T64		C/C	T/T
T24		C/C	T/T	T65		C/C	T/T
T25		C/C	T/T	T66		C/C	T/T
T26		C/C	T/T	T67		C/C	T/T
T27		C/C	T/T	T68		C/C	T/T
T28		C/C	T/T	T69		C/C	T/T
T29		C/C	T/T	T70		C/C	A/T
T30		C/C	T/T	T71		C/C	T/T
T31		C/C	T/T	T72		C/C	T/T
T32		C/C	T/T	T73		C/C	T/T
T33		C/C	T/T	T74		C/C	T/T
T34		C/C	T/T	T75		C/C	T/T
T35	Denizli	C/C	G/T	T76		C/C	T/T
T36		C/C	G/T	T77		C/C	T/T
T37		C/C	T/T	T78		C/C	T/T
T38		C/C	T/T	T79		C/C	T/T
T39		C/C	T/T	T80		C/C	T/T
T40		C/C	T/T	T81		C/C	T/T
T41		C/C	T/T	T82		C/C	T/T

Çizelge 4.2. Dizi analizi sonuçlarına göre örneklerin sahip olduğu 172. ve 184. nükleotitler (devam)

Kodu	Irk	172. baz	184. baz	Kodu	Irk	172. baz	184. baz
T83		C/C	T/T	T125		C/C	T/T
T84		C/C	T/T	T126		C/C	T/T
T85		C/C	T/T	T127		C/C	T/T
T86		C/C	T/T	T128		C/C	T/T
T87		C/C	T/T	T129		C/C	T/T
T88		C/C	T/T	T130		C/C	T/T
T89		C/C	T/T	T131		C/C	G/T
T90		C/C	T/T	T132		C/C	T/T
T91		C/C	T/T	T133		C/C	T/T
T92		C/C	T/T	T134		C/C	T/T
T93		C/C	T/T	T135		C/C	T/T
T94		C/C	T/T	T136		C/C	T/T
T95		C/C	T/T	T137		C/C	T/T
T96		C/C	T/T	T138		C/C	T/T
T97		C/C	T/T	T139		C/C	T/T
T98		C/C	T/T	T140		C/C	T/T
T99		C/C	T/T	T141		C/C	T/T
T100		C/C	T/T	T142		C/C	T/T
T101		C/C	T/T	T143		C/C	T/T
T102		C/C	T/T	T144		C/C	T/T
T103	Denizli	C/C	T/T	T145	Denizli	C/C	T/T
T104		C/C	T/T	T146		C/C	T/T
T105		C/C	T/T	T147		C/C	T/T
T106		C/C	T/T	T148		C/C	T/T
T107		C/C	T/T	T149		C/C	T/T
T108		C/C	T/T	T150		C/C	T/T
T109		C/C	T/T	T151		C/C	T/T
T110		C/C	T/T	T152		C/C	T/T
T111		C/C	T/T	T153		C/C	T/T
T112		C/C	T/T	T154		C/C	T/T
T113		C/C	T/T	T155		C/C	A/T
T114		C/C	T/T	T156		C/C	T/T
T115		C/C	T/T	T157		C/C	T/T
T116		C/C	T/T	T158		C/C	T/T
T117		C/C	G/T	T159		C/C	T/T
T118		C/C	T/T	T160		C/C	T/T
T119		C/C	T/T	T161		C/C	T/T
T120		C/C	T/T	T162		C/C	T/T
T121		C/C	T/T	T163		C/C	T/T
T122		C/C	T/T	T164		C/C	T/T
T123		C/C	T/T	T165		C/C	T/T
T124		C/C	T/T	T166		C/C	T/T

Çizelge 4.2. Dizi analizi sonuçlarına göre örneklerin sahip olduğu 172. ve 184. nükleotitler (devam)

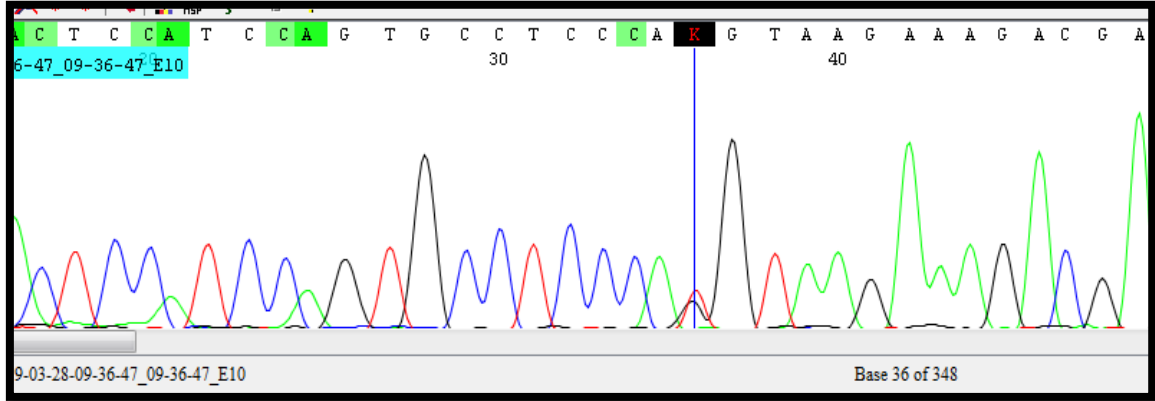
Kodu	İrk	172. baz	184. baz	Kodu	İrk	172. baz	184. baz
T167		C/C	T/T	T172		C/C	T/T
T168		C/C	T/T	T173		T/C	T/T
T169	Denizli	C/C	A/T	T174	Denizli	C/C	T/T
T170		C/C	T/T	T175		C/C	T/T
T171		C/C	T/T				

4.4 Genotiplerin Belirlenmesi ve Gen Frekanslarının Tahmin Edilmesi

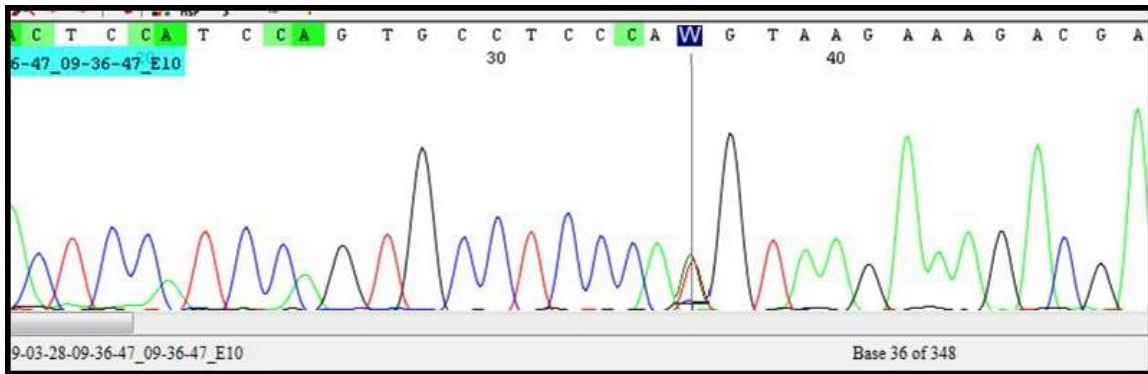
Yürütülen çalışma sonucunda farklı TVB genotiplerine sahip örneklerin TVB lokusunda 172. ve 184. nükleotitlerini gösteren örnek dizileri Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir. Türkiye yerli tavuk ırkları olan Denizli ve Gerze tavuklarını temsilen 175 tavuk üzerinde yürütülen araştırma sonucunda dört örnekte TVB lokusunda 172. SNP noktasında C/C, 184. SNP noktasında G/T nükleotitleri (Şekil 4.3); üç örnekte TVB lokusu 172. SNP noktasında C/C, 184. SNP noktasında A/T nükleotitleri (Şekil 4.4) ve iki örnekte de 172. SNP noktasında T/C ve 184. SNP noktasında T/T nükleotitleri (Şekil 4.5) tespit edilmiştir. Geri kalan 166 örneğin TVB lokusu 172. SNP noktasında C/C ve 184. SNP noktasında T/T (Şekil 4.6) olarak belirlenmiştir.

Zhang vd., (2007)'de yaptıkları araştırma ile TVB lokusundaki iki SNP polimorfizmine göre genotipleri belirleyerek tanımlamıştır. Buna göre genotiplerin sahip oldukları nükleotitler Çizelge 4.3'te ifade edilmiştir. Dizi analizi sonuçlarına göre çalışmadaki örneklerin sahip olduğu TVB lokusu 172. ve 184. nükleotitlerine göre tüm materyalin genotipleri Zhang vd., (2007)'e göre tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, Türkiye yerli tavuk ırklarında TVB lokusu bakımından TVB*S1/S' (Şekil 4.3), TVB*S1/S3 (Şekil 4.4) ve TVB*S1/R (Şekil 4.5) genotipleri nadir olarak bulunurken popülasyonda yaygın genotipin TVB*S1/S1 (Şekil 4.6) olduğu görülmüştür. Araştırma materyalinde TVB lokusu bakımından dört horozun TVB*S1/S', bir horoz ve iki tavuğun TVB*S1/S3, iki tavuğun TVB*S1/R genotipine sahip olurken diğer 166 örneğin ise TVB*S1/S1 genotipine sahip olduğu belirlenmiştir. 27 Gerze örneği arasında bir tavuk TVB*S1/R genotipinde bulunurken, 148 Denizli örneğinde dört horoz TVB*S1/S', bir horoz ve iki tavuk TVB*S1/S3, bir tavuk TVB*S1/R genotipinde olduğu tespit edilmiştir.

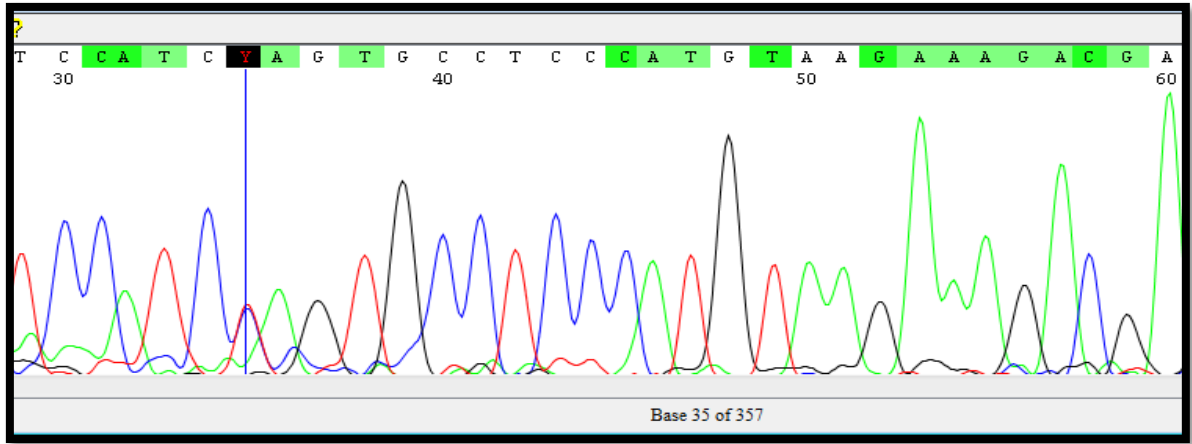
Denizli ve Gerze tavuklarında TVB*S1, TVB*S3, TVB*S' ve TVB*R frekansları hesaplanarak Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.



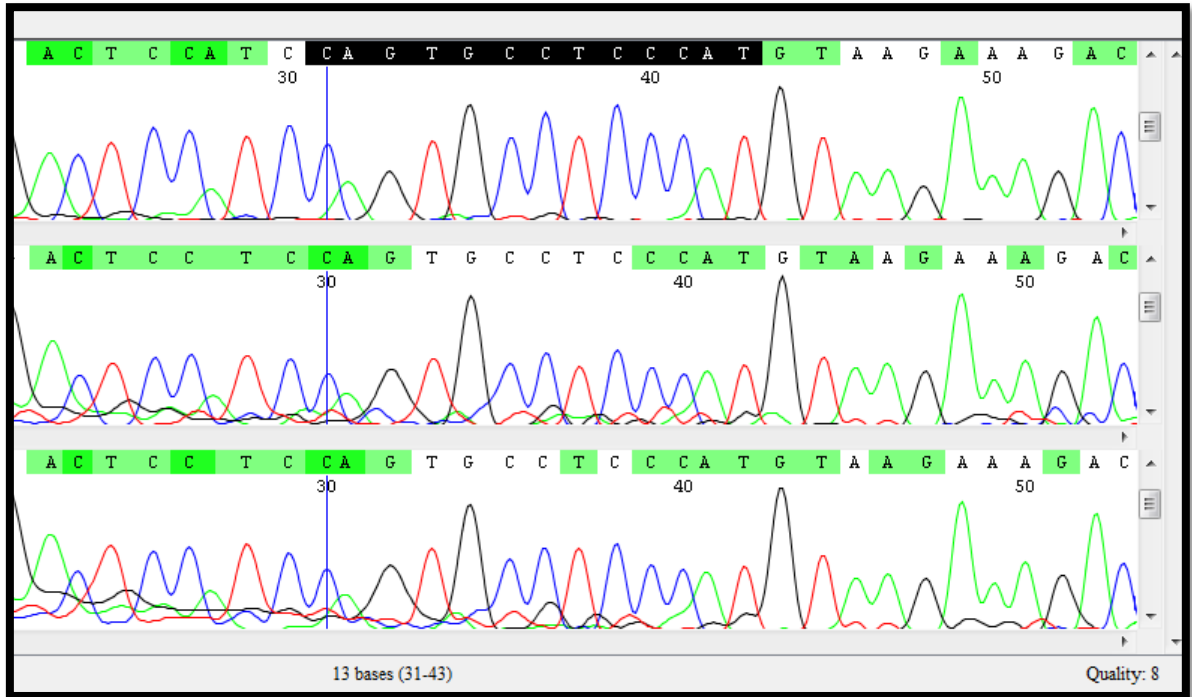
Şekil 4.3. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/S' genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (C/C) ve 184. (G/T) bazlarının görüntüsü



Şekil 4.4. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/S3 genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (C/C) ve 184. (A/T) bazlarının görüntüsü



Şekil 4.5. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/R genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (T/C) ve 184. (T/T) bazlarının görüntüsü



Şekil 4.6. DNA sekanslama sonucunda TVB*S1/S1 genotipli örneklerin sahip olduğu 172. (C/C) ve 184. (T/T) bazların görüntüsü

Çizelge 4.3. Farklı TVB genotiplerinin 172. ve 184. pozisyonundaki dizileri (Zhang vd., 2007; Yu vd., 2012)

Genotip	172. nükleotitler	184. nükleotitler
TVB*S1/S1	C/C	T/T
TVB*S1/S'	C/C	G/T
TVB*S1/S3	C/C	A/T
TVB*S1/R	T/C	T/T
TVB*S3/S3	C/C	A/A
TVB*S3/R	T/C	A/T
TVB*R/R	T/T	T/T

Çizelge 4.4. Türkiye yerli tavuk ırklarının TVB lokusundaki allel frekansları

Populasyon	Örnek sayısı	Allel Frekansı			
		S1	S3	S'	R
Denizli	148	0.9730	0.0101	0.0135	0.0034
Gerze	27	0.9815	—	—	0.0185
Toplam	175	0.9743	0.0086	0.0114	0.0057

Literatürde TVB lokusu 184. bazında tespit edilen (T→A) mutasyonuna TVB*R' (Yang vd. 2011), (T→G) mutasyonuna TVB*S' (Yu vd, 2012) olarak adlandırılmış ve TVB*S''nin ALVE alt grubuna karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Farklı ALV alt tiplerinin konukçu hücrelerine gireceği reseptörleri kodlayan TVA, B ve C lokuslarındaki bazı alleller kodladığı reseptörler ile virüslerin hücreye girişine izin vermediğinden bu allellere genetik direnç allelleri denir ve "R" ile gösterilirler. TVB lokusu 172. ve 184. dizilerinde olan iki SNP ile üç farklı TVB alleli oluşmaktadır. TVB*S1 alleli ALVB,

ALVD ve ALVE, TVB*S3 alleli ise ALVB ve ALVD alt tiplerine karşı hassastır. TVB*R alleleline dirençlilik alleli denir ve ALVB, ALVD ve ALVE tipi virüslerin hücreye girişini engelleyerek genetik dirençlilik gösterirler (Zhang vd., 2007). Çin yerli tavuk ırklarında dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada Yu vd., (2012) buldukları mutasyona TVB 184. SNP (G/T) sahip dört horoz tespit edilmiş, bunların TVB*S1/S' genotipinde oldukları belirlenmiştir.

TVB lokusu genetik polimorfizm çalışmalarında TVB*R allelinin genellikle White Leghorn populasyonlarında görüldüğü, lokal tavuk ırklarında yaygın allelin TVB*S1 alleli olduğu ve lokal ırklarda TVB*R allelinin nadir olarak görüldüğü bildirilmiştir (Zhang vd, 2007; Yang vd., 2011; Yu vd., 2012; Project Directorate on Poultry in India, 2013; Liao vd., 2014). Elde edilen sonuçlar Türkiye yerli tavuk ırklarında TVB lokuslarını belirlemek için Kaya, (2018) tarafından PCR-RFLP kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarına benzer sonuçlar bulunmuştur. Gerze tavukları arasında bir tavuğun TVB*S1R genotipinde; Denizli horoz ve tavukları içinde yedi tavuğun TVB*S1S3 genotipinde diğerlerinin ise TVB*S1S1 genotipinde olduğu tespit edilmiştir. Aynı populasyonlar kullanılarak yapılan bu çalışmada ise Denizli ve Gerze tavuklarında birer TVB*S1/R genotipi tespit edilirken Denizli populasyonunda üç örnekte TVB*S3 ve dört örnekte ise TVB*S' alleleline rastlanılmıştır. Yapılan araştırmada Kaya, (2018)'in çalıştığı populasyona ek olarak Denizli populasyonuna 7 tavuk daha eklenmiş ve bu eklenen tavukların birinde TVB*S1/R genotipine sahip olduğu görülmüştür. Direnç alleli olan TVB*R alleli, Gerze tavuklarında olduğu gibi Denizli populasyonunda da nadir olarak görülmüş, populasyon mevcudu artırıldığında TVB*R genotipli örnek sayısı artabilir. Kaya, (2018) tarafından PCR-RFLP kullanılarak yapılan çalışmada yedi örnekte TVB*S3 alleli tespit edilirken, bu çalışmada üç örnekte TVB*S3 alleli, diğer dört örneğin TVB*S' alleleline sahip olduğu görülmüştür. Bu durum PCR-RFLP analizinde kullanılan *NlaIII* kesim enziminin özelliğine atfedilmektedir. *NlaIII* kesim enzimi 'CATG' dizisini keserken 'CAAG' veya 'CAGG' dizilerini kesememekte (Zhang vd., 2005), bu durum örneklerde tespit edilen TVB lokusu 184. SNP noktasındaki nükleotitlerle uyumaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Türkiye yerli tavuk ırkları olan Denizli horozu ve Gerze tavuğunun TOB farklı işletmelerinde korunan popülasyonlarından 175 örnek kullanılarak TVB lokusundaki genetik polimorfizmler DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. 27 Gerze tavuğu ve 148 Denizli horoz ve tavuğu üzerinde yürütülen araştırma sonucunda iki örneğin TVB lokusunda 172. SNP noktasında T/C, üç örnekte de 184. bazında A nükleotiti ve dört örnekte de 184. SNP noktasında G nükleotiti heterozigot olarak tespit edilmiştir. Geri kalan 166 örneğin 172. nükleotidi C/C ve 184. nükleotidi T/T olarak belirlenmiştir. Çalışmada hedeflenen ve PCR-RFLP yöntemi ile belirlenemeyen TVB lokusu 172. ve 184. SNP noktasında mutasyonlar araştırılmış ve Denizli horozu popülasyonunda bazı örneklerin TVB lokusu 184. SNP dizisindeki G mutasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Lokal ırkların buldukları çevreye adaptasyonu ve hastalıklara karşı gösterdikleri direnç bakımından eşsiz niteliklere sahip oldukları bilinmektedir. ALV'nin 5 alt grubundan üçünün konakçı hücrel reseptörlerini kodlayan TVB lokuslarının belirlenmesi ALV'ye karşı genetik direnç için önemlidir. Yürütülen tez çalışmasında TVB*R alleleline sahip tavukların bulunması ALV'ye karşı geliştirilecek genetik direnç çalışmalarına yardımcı olacaktır. Ayrıca korunan Gerze tavuğu popülasyonunun az olması nedeniyle örnek sayısı az olmuş, daha geniş imkanlar ile örnek sayısının artırılmasıyla genetik direnç alleli olan TVB*R allelinin frekansı daha da artırılabilir.

Yürütülen çalışma ile moleküler genetik yöntemler ile yerli ırkların DNA seviyesinde tanımlanmasına katkı sağlanmış ve yerli tavuk ırklarının korunmasına yardımcı olunmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdul-Careem, M. F., Hunter, B. D., Nagy, É., Read, L. R., Sanei, B., Spencer, J. L., Sharif, S., 2006. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips. *Journal of virological methods*, 133(1): 34-40.
- Abdul-Careem, M. F., Haq, K., Shanmuganathan, S., Read, L. R., Schat, K. A., Heidari, M., Sharif, S., 2009. Induction of innate host responses in the lungs of chickens following infection with a very virulent strain of Marek's disease virus. *Virology*, 393(2): 250-257.
- Abujoub, A. A., Coussens, P. M., 1997. Evidence that Marek's disease virus exists in a latent state in a sustainable fibroblast cell line. *Virology*, 229(2): 309-321.
- Adkins, H. B., Blacklow, S. C., Young, J. A., 2001. Two functionally distinct forms of a retroviral receptor explain the nonreciprocal receptor interference among subgroups B, D and E avian leukosis viruses. *Journal of Virology*, 75(8): 3520-3526.
- Anderson, A. S., Parcells, M. S., Morgan, R. W., 1998. The glycoprotein D (US6) homolog is not essential for oncogenicity or horizontal transmission of Marek's disease virus. *Journal of virology*, 72(3): 2548-2553.
- Anonim, 2018. "Chicken assembly and gene annotation", http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Annotation, son erişim tarihi: 10.05.2019.
- Artuso, R., Fallerini, C., Dosa, L., Scionti, F., Clementi, M., Garosi, G., Longo, I., 2012. Advances in Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 20(1): 50.
- Aşcıoğlu, F., Koluçak, T., Çetinkaya, Ü., Akyüz, F., 2002. Kapiller elektroforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı: geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma. *Adli Tıp Der.*, 16(2-4): 88-93.
- Avakian, A. P., Poston, R. M., Kong, F. K., Van Kampen, K. R., Tang, D. C. C., 2007. Automated mass immunization of poultry: the prospect for nonreplicating human adenovirus-vectored in ovo vaccines. *Expert review of vaccines*, 6(3): 457-465.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barnard, R. J. O., Young, J. A. T., 2003. Alpharetrovirus envelope-receptor interactions. In *Cellular Factors Involved in Early Steps of Retroviral Replication* (107-136). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Barrow, A. D., S.C. Burgess, K. Howes, and K. Venugopal., 2001. Invasion of avian macrophages by highly virulent Marek's disease virus strain C12/130 represents a "tropic" shift in the pathogenesis. In: Current Progress on Marek's Disease Research. K.A. Schat, R.M. Morgan, M.S. Parcels, and J.L. Spencer, eds. *American Association of Avian Pathologists*, Kennett Square, PA. 63–67.
- Brojatsch, J., Naughton, J., Rolls, M. M., Zingler, K., Young, J. A., 1996. CAR1, a TNFR–related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis–sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell*, 87(5): 845-855.
- Buckmaster, A. E., Scott, S. D., Sanderson, M. J., Bournnell, M. E., Ross, N. L., Binns, M. M., 1988. Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification. *Journal of General Virology*, 69(8): 2033-2042.
- Burnside, J., Bernberg, E., Anderson, A., Lu, C., Meyers, B. C., Green, P. J., Morgan, R. W., 2006. Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *Journal of virology*, 80(17): 8778-8786.
- Chicken Sequencing Consortium, 2004. Chicken Sequencing Consortium. *Nature*, 432: 695-716.
- Crittenden, L. B., Salter, D. W., 1992. A Transgene, Alv 6, That Expresses The Envelope Of Subgroup A Avian Leukosis Virus Reduces The Rate Of Congenital Transmission Of A Field Strain Of Avian Leukosis Virus. *Poultry Science*, 71(5): 799-806.
- Cui, X., Lee, L. F., Reed, W. M., Kung, H. J., Reddy, S. M., 2004. Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. *Journal of virology*, 78(9): 4753-4760.
- Darcan, C., Türkyılmaz, O., 2017. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1): 41-49.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Elamurugan, A., Karthik, K., Badasara, S. K., Hajam, I. A., Saravanan, M., 2015. Novel insights into identification of shedders and transmitters of avian leukosis virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5: 192-201.
- Elleder, D., Plachý, J., Hejnar, J., Geryk, J., Svoboda, J., 2004. Close linkage of genes encoding receptors for subgroups A and C of avian sarcoma/leucosis virus on chicken chromosome 28. *Animal genetics*, 35(3): 176-181.
- Fadly, A. M., Nair, V., 2008. Leukosis/sarcoma group. *Diseases of poultry*, 11: 465-516.
- Feng, M., Zhang, X., 2016. Immunity to avian leukosis virus: where are we now and what should we do?. *Frontiers in Immunology*, (7): 624.
- Gao, Y., Yun, B., Qin, L., Pan, W., Qu, Y., Liu, Z., Wang, X., 2012. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J in layer flocks in China. *Journal of clinical microbiology*, 50(3): 953-960.
- Garcia-Camacho, L., Schat, K. A., Brooks Jr, R., Bounous, D. I., 2003. Early cell-mediated immune responses to Marek's disease virus in two chicken lines with defined major histocompatibility complex antigens. *Veterinary immunology and immunopathology*, 95(3-4): 145-153.
- Gavora, J. S., Benkel, B., Spencer, J. L., Gagnon, C., Crittenden, L. B., 1995. Influence of the alv 6 recombinant avian leukosis virus transgene on production traits and infection with avian tumor viruses in chickens. *Poultry science*, 74(5): 852-863.
- Geerligs, H. J., Hoogendam, A., 2007. Determination of optimal conditions for thawing and diluting cell-bound CVI 988 Marek's disease vaccine and stability of the diluted vaccine. *Avian diseases*, 51(4): 969-973.
- Gilka, F., Spencer, J. L., 1995. Extravascular haemolytic anaemia in chicks infected with highly pathogenic Marek's disease viruses. *Avian Pathology*, 24(3): 393-410.
- Gimeno, I. M., 2008. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow?. *Vaccine*, 26, C31-C41.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Imai, K., Yuasa, N., Furuta, K., Narita, M., Banba, H., Kobayashi, S., Horiuchi, T., 1991. Comparative studies on pathogenical, virological and serological properties of Marek's disease virus isolated from Japanese quail and chicken. *Avian Pathology*, 20(1): 57-65.
- Johnson, E. S., Overby, L., Philpot, R., 1995. Detection of antibodies to avian leukosis/sarcoma viruses and reticuloendotheliosis viruses in humans by western blot assay. *Cancer detection and prevention*, 19(6): 472-486.
- Johnson, E. S., 2005. Assessing the role of transmissible agents in human disease by studying meat workers. *Cell Science Review*, (2): 1-15.
- Ka, S., 2009. *Gene Expression in the Brains of Two Lines of Chicken Divergently Selected for High and Low Body Weight* (Doctoral dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis).
- Kaya, M., 2018. Determination of the Tumor Virus B Locus in Turkish Native Chicken Breeds. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 24(2).
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., 2012. International Committee on Taxonomy of Viruses: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Klucking, S., Adkins, H. B., Young, J. A., 2002. Resistance to infection by subgroups B, D, and E avian sarcoma and leukosis viruses is explained by a premature stop codon within a resistance allele of the tvb receptor gene. *Journal of virology*, 76(15): 7918-7921.
- Kretschmer, R., Ferguson-Smith, M., de Oliveira, E., 2018. Karyotype Evolution in birds: From conventional staining to chromosome painting. *Genes*, 9(4): 181.
- Lee L.F., Fadly A. M., Hunt H. D., 2014. Avian leukosis virus subgroup J envelope gene product for diagnosis and immunogenic composition. Washington, DC: United States Patent.
- Li, X., Schat, K.A., 2004. Quail cell lines supporting replication of Marek's disease virus serotype 1 and 2 and herpesvirus of turkeys. *Avian diseases*, 48(4): 803-812.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, X., Dong, X., Sun, X., Li, W., Zhao, P., Cui, Z., Wang, X., 2013. Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine. *Vaccine*, 31(46): 5479-5485.
- Liao, C. T., Chen, S. Y., Chen, W. G., Liu, Y., Sun, B. L., Li, H. X., Xie, Q. M., 2014. Single nucleotide polymorphism variants within tva and tvb receptor genes in Chinese chickens. *Poultry science*, 93(10): 2482-2489.
- Maxam, A. M., Gilbert, W., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2): 560-564.
- Matsuo, K., Sonoda, K., Sakaguchi, M., Zhu, G. S., Hirai, K., 1997. Insertion of tandem direct repeats consisting of avian leukosis virus LTR sequences into the inverted repeat region of Marek's disease virus type 1 DNA. *Virus Genes*, 14(2), 157-162.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. R. N., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3): 1215.
- Mohamed, M. A., El-Motelib, T. Y. A., Ibrahim, A. A., El-Deen, M. E. S., 2010. Contamination rate of avian leukosis viruses among commercial Marek's disease vaccines in Assiut, Egypt market using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Veterinary World*, 3(1): 8.
- Morgan, R.W., Q. Xie, J.L. Cantello, A.M. Miles, E.L. Bernberg, J. Kent, and A. Anderson. 2001. Marek's disease virus latency. *Curr Top Microbiol Immunol*. 255:223–243.
- Morrow, C., Fehler, F., 2004. Marek's disease: a worldwide problem. In *Marek's disease* (49-61). Academic Press.
- Murata, S., Chang, K. S., Lee, S. I., Konnai, S., Onuma, M., Ohashi, K., 2007. Development of a nested polymerase chain reaction method to detect oncogenic Marek's disease virus from feather tips. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 19(5): 471-478.
- Nair, V., Fadly, A., 2013. "Leukosis/Sarcoma Group". *Diseases of Poultry* (13. Basım). Editör: David, E. S. Pondicherry: Wiley-Blackwell.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ono, M., Jang, H. K., Maeda, K., Kawaguchi, Y., Tohya, Y., Nukura, M., Mikami, T., 1996. Detection of Marek's disease virus serotype 1 (MDV1) glycoprotein D in MDV1-infected chick embryo fibroblasts. *Journal of veterinary medical science*, 58(8): 777-780.
- Payne, L. N., Venugopal, K., 2000. Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 19(2): 544-560.
- Payne, L. N., Nair, V., 2012. The long view: 40 years of avian leukosis research. *Avian Pathology*, 41(1): 11-19.
- Pruková, D., Vernerová, Z., Pilčík, T., Stepanets, V., Indrová, M., Geryk, J., Svoboda, J., 2007. Differences in pathogenicity among strains of the same or different avian leukosis virus subgroups. *Avian pathology*, 36(1): 15-27.
- Project Directorate on Poultry in India. "2012-2103 Annual reports of Project Directorate on Poultry in India",
http://agritech.tnau.ac.in/animal_husbandry/pdf/AnnReport_poultry_12_13.pdf, son erişim tarihi: 15 Şubat 2016.
- Rajabzadeh, M., Dadras, H., Mohammadi, A., 2010. Detection of avian leukosis virus subgroups in albumen of commercial and native fowl eggs using RT-PCR in Iran. *Tropical animal health and production*, 42(8): 1829-1836.
- Reinke, A. W., Grigoryan, G., Keating, A. E., 2010. Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays. *Biochemistry*, 49(9): 1985-1997.
- Robertson, J. S., Nicolson, C., Riley, A. M., Bentley, M., Dunn, G., Corcoran, T., Minor, P., 1997. Assessing the significance of reverse transcriptase activity in chick cell-derived vaccines. *Biologicals*, 25(4): 403-414.
- Rubin, H., 2011. The early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35): 14389-14396.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12): 5463-5467.
- Schmid, M., Nanda, I., Guttenbach, M., Steinlein, C., Hoehn, M., Scharl, M., Wimmers, K., 2000. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenetic and Genome Research*, 90(3-4): 169-218.
- Schmid, M., Nanda, I., Burt, D. W., 2005. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. *Cytogenetic and genome research*, 109(4): 415.
- Schmid, M., Smith, J., Burt, D. W., Aken, B. L., Antin, P. B., Archibald, A. L., Ashwell, C., Blackshear, B.J., Boschiero, C., Brown, C. T., Burgess, S. C., Cheng, H. H., Chow, W., Coble, D. J., Cooksey, A., Crooijmans, R.P.M.A., Damas, J., Davis, R.V.N., Koning, D. J., Delany, M. E., Derrien, T., Desta, T. T., Dunn, I. A., Dunn, M., Ellegre, H., Eöry, L., Erb, J., Farré, M., Fasold, M., Fleming, D., Flicek, P., Fowler, K. E., Frésard, L., Froman, D. P., Garceau, V., Gardner, P. P., Gheyas, A. A., Griffin, D. K., Groenen, M.A.M., Haaf, T., Hanotte, O., Hart, A., Häsler, J., Hedges, S. B., Hertel, J., Howe, K., Hubbard, A., Hume, D. A., Kaiser, P., Kedra, D., Kemp, S. J., Klopp, C., Kniel, K. E., Kuo, R., Lagarrigue, S., Lamont, S. J., Larkin, D. M., Lawal, R. A., Markland, S. M., McCarthy, F., McCormack, H. A., McPherson, M. C., Motegi, A., Muljo, S. A., Münsterberg, A., Nag, R., Nanda, I., Neuberger, M., Nitsche, A., Notredame, C., Noyes, H., O'Connor, R., O'Hare, E. A., Oler, A. J., Ommeh, S. C., Pais, H., Persia, M., Pitel, F., Preeyanon, L., Barja, P. P., Pritchett, E. M., Rhoads, D. D., Robinson, C. M., Romanov, M. N., Rothschild, M., Roux, P. -F., Schmidt, C. J., Schneider, A. -S., Schwartz, M., Searle, S. M., Skinner, M. A., Smith, C. A., Stadler, P. F., Steeves, T. E., Steinlein, C., Sun, L., Takata, M., Ulitsky, I., Wang, Q., Wang, Y., Warren, W. C., Wood, J.M.D., Wragg, D., Zhou, H., Burgess, S. C., 2015. Third report on chicken genes and chromosomes 2015. *Cytogenetic and genome research*, 145(2): 78-179.
- Smith, E. J., Cheng, H. H., 1998. Mapping Chicken Genes Using Preferential Amplification Of Specific Alleles. *Microbial & Comparative Genomics*, 3(1): 13-20.
- Smith, A., Benkel, B. F., 2009. Novel avian leukosis virus-related endogenous proviruses from layer chickens: characterization and development of locus-specific assays. *Poultry science*, 88(8): 1580-1585.
- TOB, 2013. “Tarım ve Orman Bakanlığı”, www.tarimorman.gov.tr, Son erişim tarihi : 05.04.2019

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tsang, S. X., Switzer, W. M., Shanmugam, V., Johnson, J. A., Goldsmith, C., Wright, A., Heneine, W., 1999. Evidence of avian leukosis virus subgroup E and endogenous avian virus in measles and mumps vaccines derived from chicken cells: investigation of transmission to vaccine recipients. *Journal of virology*, 73(7): 5843-5851.
- Turan, N., Yılmaz, H., 2005. “Investigations on the Presence of Antibodies to Avian Leukosis Virus Subgroup-J (ALV-J) in Broiler Breeders and Broilers”, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 1255-1258.
- TÜİK, 2018. “Tarımsal Üretim İstatistikleri”, www.tuik.gov.tr, son erişim tarihi: 05.05.2018
- Türkoğlu, M., Sarıca, M. 2004. Tavukçuluk bilimi (yetiştirme, besleme, hastalıklar) (5.Basım). *Bey Ofset Matbaacılık.*, 63-65.
- Wang, Q., Gao, Y., Wang, Y., Qin, L., Qi, X., Qu, Y., Wang, X., 2012. A 205-nucleotide deletion in the 3' untranslated region of avian leukosis virus subgroup J, currently emergent in China, contributes to its pathogenicity. *Journal of virology*, 86(23): 12849-12860.
- Warren, W. C., Hillier, L. W., Tomlinson, C., Minx, P., Kremitzki, M., Graves, T., Markovic, C., Bouk, N., Pruitt, K. D., Thibaud-Nissen, F., Schneider, F., Mansour, T. A., Brown, C. A., Zimin, Z., Hawken, R., Abrahamsen, M., Pyrkosz, A. B., Morisson, M., Fillon, V., Vignal, A., Chow, W., Howe, K., Fulton, J. E., Miller, M. M., Lovell, P., Mello, C. V., Wirthlin, M., Mason, A. S., Kuo, R., Burt, D. W., Dodgson, J. B., Cheng, H. H., Schneider, V., 2017. A new chicken genome assembly provides insight into avian genome structure. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(1): 109-117.
- Weiss, R. A., 1993. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. *In The retroviridae* (1-108). Springer, Boston, MA.
- Wicker, T., Robertson, J. S., Schulze, S. R., Feltus, F. A., Magrini, V., Morrison, J. A., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Peterson, D.G., Paterson, A. H., Ivarie, R., 2005. The repetitive landscape of the chicken genome. *Genome research*, 15(1): 126-136.
- Yang, J., Yu, Y., Yao, J., Chen, Y., Xu, G., Yang, N., Sun, D., Zhang, Y., 2011. “Molecular identification of avian leukosis virus subgroup E loci and tumor virus B locus in Chinese indigenous chickens”, *Poultry Science*, 90: 759-765.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yu, J. C., Ning, Z. H., Bao, M., 2012. Genetic variation at the TVB locus in Chinese native chicken breeds. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(22): 4226-4229.
- Zhang, H. M., Bacon, L. D., Cheng, H. H., Hunt, H. D., 2005. Development and validation of a PCR-RFLP assay to evaluate TVB haplotypes coding receptors for subgroup B and subgroup E avian leukosis viruses in White Leghorns. *Avian pathology*, 34(4): 324-331.
- Zhang, H. M., Bacon, L. D., Heidari, M., Muir, W. M., Groenen, M. A., Zhang, Y., Wong, G. K., Fulton, J. E., O'sullivan, N. P., Albers, G. A., Vereijken, A. L., Rattink, A. P., Okimoto, R., Mckay, J. C., Mcleod, S., Cheng, H. H. 2007. "Genetic variation at the tumour virus B locus in commercial and laboratory chicken populations assessed by a medium-throughput or a high-throughput assay", *Avian Pathology*, 36: 283-91.
- Zimber, A., Perk, K., Ianconescu, M., Yegana, Y., Gazit, A., Yaniv, A., 1983. Lymphoproliferative disease of turkeys: pathogenesis, viraemia and serum protein analysis following infection. *Avian Pathology*, 12(1): 101-116.
- Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R., Robinson, F. E., 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poultry Science*, 93(12): 2970-2982.

EK AÇIKLAMALAR**Sayfa****EK AÇIKLAMA A : ARAŞTIRMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇ LİSTESİ.....52**

EK AÇIKLAMA A: ARAŞTIRMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇ LİSTESİ

Araç ve gereç listesi

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Bidestile Saf Su Cihazı/Ultra Saf Su Cihazı	DNA İzolasyonu ve PCR Reaksiyonları İçin Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması
pH metre/Hi 2211	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması İçin Gerekli pH'nın Ayarlanması
Çalkalayıcı sıcak su banyosu/ Thermomixer Comfort	DNA İzolasyonu
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı/MS-300 HS	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması
Çalkalayıcı (Vortex)/ FisherScientific FB1502	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması ve DNA İzolasyonu
Santrifüj/ Thermofisher Scientific 18.000 rpm Micro CL 21R	DNA İzolasyonu ve PCR Aşamalarında
Santrifüj/ Thermofisher Scientific 14.600 rpm	Örneklerin Kısa Süreli Santrifüj Edilerek Çöktürülmesi
Hassas Terazi/ Radwag AS220/C/2	Tampon Çözeltilerin Hazırlanmasında Sarf Malzemelerin Tartılması
Jel Elektrophorez Takımları/Cleaver Scientific Max. 250 mA	DNA İzolasyonu ve PCR Ürünlerinin Tespiti
Jel Elektrophorez Takımları/Owl Separations Systems 7303 A2 Class II	
Güç Kaynakları/Thermofisher Scientific EC 300 XL	Elektrophorez Sistemlerinin Elektrik Otamlarının Sağlanması
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi/Thermofisher Scientific EC 300 XL	DNA İzolasyonu, PCR Ürünleri PCR-RLFP Lokusların Ön Denemelerinin Jelde Görüntülenmesi ve Bilgisayar Ortamına Aktarılması
Thermal Yazıcı/Sony Dijital Graphicprinter Up	DNA İzolasyonu İle PCR Ürünlerinin Arşivlenmesi İçin Baskı Yapılması
Mikro Dalga Fırını/Arçelik MD 5653	Agaroz Jellerin Hazırlanması
-20 °C Derin Dondurucu Buzdolabı/+4 °C	Örnek ve Çeşitli Sarf Malzemelerin Muhafazası
Çeker Ocak /Hedlab Class II	DNA tüplerinden etil alkolün uzaklaştırmak için tamamen kurutmaya bırakılması
Otoklav/ALP	Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu