

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**TÜRKİYE TİCARİ TAVUK HATLARINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN
MAREK HASTALIĞI İLE ALAKALI OLAN LEI0258 MİKROSATELİT
LOKUSU KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Begüm EVCİ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

OCAK 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**TÜRKİYE TİCARİ TAVUK HATLARINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN
MAREK HASTALIĞI İLE ALAKALI OLAN LEI0258 MİKROSATELİT
LOKUSU KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Begüm EVCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE TİCARİ TAVUK HATLARINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN
MAREK HASTALIĞI İLE ALAKALI OLAN LEI0258 MİKROSATELİT
LOKUSU KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

**Begüm EVCİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

OCAK 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE TİCARİ TAVUK HATLARINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN
MAREK HASTALIĞI İLE ALAKALI OLAN LEI0258 MİKROSATELİT
LOKUSU KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

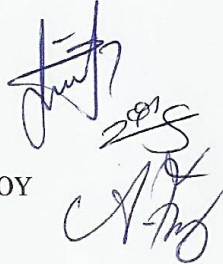
Begüm EVCİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 23/01/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Doç. Dr. Kemal KARABAĞ

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Nuri ÖZSOY



Handwritten signatures and date of the jury members. The date '2018' is visible in the center of the signatures.

ÖZET

TÜRKİYE TİCARİ TAVUK HATLARINDAKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN MAREK HASTALIĞI İLE ALAKALI OLAN LEI0258 MİKROSATELİT LOKUSU KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Begüm EVCİ

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Ocak 2018; 72 sayfa

Marek Hastalığı, Marek Hastalığı Virüsü'nden kaynaklanan, kanserojen ve tümör oluşturan bulaşıcı bir hastalık olup tavukçuluk sektörü için tehdit oluşturan en önemli hastalıklardan birisidir. Marek Hastalığı dünya tavukçuluk sektöründe yıllık 1 milyon dolar ekonomik kayba neden olmaktadır. Marek Hastalığı ile mücadele yöntemlerinin başında günlük civcivlerin aşılması gelmektedir. Ancak aşılama sonucunda bağışıklık sisteminde meydana gelen yetersizlikler nedeniyle MH ile mücadelede diğer bir yöntem Marek Hastalığı'na genetik olarak dirençli tavukların yetiştirilmesidir. Bu çalışmada, Türkiye ticari tavuk populasyonlarının, Marek hastalığı ile alakalı LEI0258 mikrosatelit lokusu kullanılarak tanımlanması amaçlanmıştır. Materyal olarak toplam 350 tavuk (herbir ticari hattan 30 olmak üzere toplam $11 \times 30 = 330$ ve 20 adet kontrol örneği) kullanılmıştır.

İncelenen populasyonların tümü değerlendirildiğinde ortalama gözlenen allel sayısı (Na), etkili allel sayısı (Ne), gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He) ve Fis değeri sırasıyla $Na=39$, $Ne=16.27$, $Ho=0.627$, $He=0.939$, $Fis=0.276$ olarak tahmin edilmiştir. Her iki generasyonda populasyonlar arasında göç eden bireylerin sayısı ortalama 1 olarak tahmin edilmiştir. Populasyonlar arasında populasyonlar içindekinden daha fazla genetik varyasyon saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçların, tavukçuluk sektöründe ihtiyaç duyulan hastalıklara dayanıklı ebeveyn genotiplerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Marek Hastalığı, MHC, Mikrosatelit, Genetik Dirençlilik

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Doç. Dr. Kemal KARABAĞ

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Nuri ÖZSOY

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN TURKISH COMMERCIAL CHICKEN LINES BY USING LEI0258 MICROSATELLITE MARKER RELATED TO MAREK'S DISEASE

Begüm EVCİ

MSc Thesis in Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

January 2018; 72 pages

Marek's disease (MD) is contagious disease of domestic chickens induced by Marek's disease virus and is one of the important complex diseases causing the threat for world poultry industry. Marek's disease causes approximately \$1 billion economic losses in world poultry industry. Enhancing genetic resistance to MD is an attractive method to augment MD vaccines. The vaccine control method is able to protect against MD, but they don't prevent MDV replication and spread. Because of vaccine inadequacy, the other method for avoiding from MD is to breed the chickens that are genetically resistant to MD. The aim of this study is that the identification of the Turkish commercial pure chicken lines by using LEI0258 microsatellite marker related to MD. The total of 350 chickens (30 samples for each line; 11 lines \times 30=330, and 20 control samples) were sampled.

The mean number of alleles (N_a), effective number of alleles (N_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and F_{IS} values over all population were estimated as $N_a=39$, $N_e=16.27$, $H_o=0.627$, $H_e=0.939$, $F_{IS}=0.276$, respectively. Pair wise gene flow (N_m) was estimated as 1 among populations for each 2 generations. Most of the genetic variation was present among populations rather than within populations. We believe that our results will assist the breeding programs to improve the resistant parent genotypes to diseases in poultry industry.

KEYWORDS: Marek's Disease, MHC, Microsatellite, Genetic Resistance

COMMITTEE: Assist. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

Assoc. Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Assist. Prof. Dr. Abdullah Nuri ÖZSOY

ÖNSÖZ

İnsanoğlu tarih boyunca sağlıklı, hastalıklara karşı dirençli, verim özellikleri yüksek ve üreme kabiliyeti olan hayvanların yetiştirilmesini ve geliştirilmesini sağlamaya çalışmıştır. Hastalıklara karşı genetik olarak dirençli hayvanların ıslahı ve seleksiyonu ile çiftlik hayvanlarının sağlık durumları geliştirilerek verim artışının olması sağlanabilmektedir. Bu doğrultuda hastalıklara karşı genetik direncin artması ilaç kullanım ihtiyacını azaltmakta ve üretim maliyetlerini düşürmektedir. Ayrıca ilaçlara dirençli patojenlerin ortaya çıkmasının gecikmesinde önemli rol oynamaktadır. Tavuklar, kolay üremeleri ve çabuk yetiştirilmeleri gibi önemli ayırıcı özellikleri açısından, verim özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla seleksiyon, ıslah ve genetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Tavuk sağlığı ve dolayısıyla tavukçuluk sektörünü önemli derecede tehdit eden Marek Hastalığı için en önemli mücadele yöntemi günlük civcivlerin aşılanmasıdır. Ancak aşılamanın kontrol mücadelesinde yetersiz kalması ve MHV'nin daha virüent hatlarının periyodik şekilde ortaya çıkması sebebiyle, 1990'lı yıllardan sonra bu hastalığa karşı genetik olarak dirençli hatların geliştirilmesi ve dayanıklılığa katkı sağlayan genlerin araştırılması çalışmalarına başlanmıştır. Bu çalışmada, daha önceden MH'ye karşı dirençlilik ile ilgili olduğu belirlenen ve MHC gen bölgesinde bulunan LEI0258 mikrosatelit lokusu bakımından Türkiye ticari tavuk hatlarında var olan genetik çeşitliliğin tanımlanması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen FBA-2017-2415 kodlu araştırma projesinin bir kısmından üretilmiştir.

Özgün bir konuya sahip tez çalışmamın belirlenmesinde, başlangıcından itibaren her aşamasında tecrübelerini benimle paylaşan, bilgileriyle yol göstererek beni yönlendiren, her konuda sabır ve özverileriyle destek veren, bana kendimi geliştirme fırsatı tanıyan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Kemal KARABAĞ'a, Yrd. Doç. Dr. Taki KARSLI'ya, Yrd. Doç. Dr. Abdullah Nuri ÖZSOY'a, laboratuvar ve tez çalışmalarında desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan çok değerli çalışma arkadaşlarım Onur VURAL ve Kübra BEDİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Özveriyle beni yetiştiren, bu süreç boyunca da maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	7
2.1. Marek Hastalığı	7
2.2. Marek Hastalığı'nın Tarihçesi.....	7
2.3. Marek Hastalığı'nın Bulaşması	10
2.4. Marek Hastalığı Virüsü (MHV)	13
2.5. Marek Hastalığı'na Karşı Korunma Yolları	14
2.5.1. Aşılama.....	14
2.5.2. Genetik dirençlilik.....	15
2.6. Major histocompatibility complex (MHC).....	16
2.6.1. Genel bilgiler.....	16
2.6.2. Tavuklarda MHC sistemi	17
2.6.3. Tavuk MHC sistemi molekül ve genleri	18
2.6.4. Tavuk MHC kompleksi ve B haplotiplerinin hastalıklarla ilişkisi.....	19
2.6.5. LEI0258 lokusu	23
2.6.6. Major Histocompatibility Complex olmayan genler (non-MHC).....	25
2.7. Mikrosatelit Markerler	26
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Canlı materyal ve örnekleme.....	31
3.1.2. Araç ve gereçler.....	32
3.1.3. Tampon çözeltiler.....	33
3.2. Metot	34
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu	34

3.2.2. LEI0258 lokusunun PCR ile çoğaltılması	35
3.2.3. Elektroforez	36
3.2.3.1. Agaroz jellerin hazırlanması	36
3.2.3.2. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi	37
3.2.4. DNA Fragment analizi	38
3.2.5. İstatistik Analizler	41
3.2.5.1. Gen Frekansları	41
3.2.5.2. Heterozigotluk değerleri	41
3.2.5.3. Akrabalı yetiştirme katsayısı (F_{IS}) ve F -istatistikleri (F_{IT} , F_{IS} ve F_{ST}) ...	43
3.2.5.4. Genetik farklılıklar	45
3.2.5.5. Moleküler varyans analizi (AMOVA)	46
3.2.5.6. Kümeleme analizleri.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1. DNA İzolasyon Sonuçları	49
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	49
4.3. Fragment Analizi.....	50
4.4. İstatistik Analizler	51
4.4.1. Genetik varyasyon.....	51
4.4.2. F -istatistikleri (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) ve gen akışı (Nm) değeri.....	53
4.4.3. İkişerli F_{ST} değerleri	54
4.4.4. Moleküler varyans analizi (AMOVA)	54
4.4.5. Nei'nin genetik uzaklık (D_A) ve genetik benzerlik değerleri	55
4.4.6. Kümeleme analizleri.....	55
4.4.6.1. İkişerli F_{ST} değerleri kullanılarak yapılan kümeleme analizi.....	55
4.4.6.2. Faktöriyel uygunluk analizi (FCA)	57
4.4.6.3. Genetik yapı analizi (Structure)	58
5. SONUÇ	60
6. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Türkiye Ticari Tavuk Hatlarındaki Genetik Çeşitliliğin Marek Hastahğı İle Alakalı olan LEI0258 Mikrosatelit Lokusu Kullanılarak Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

23.01.2018

Begüm EVCİ



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç.	:Baz çifti
gr	:Gram
°C	:Santigrat derece
MgCl ₂	:Magnezyum klorür
M	:Molar
mM	:Mili molar
ml	:Mililitre
µl	:Mikrolitre
%	:Yüzde
rpm	:Rotate Per Minute
vd.	:Ve diğerleri

Kısaltmalar

MH	:Marek Hastalığı (Marek's Disease)
MHV	:Marek Hastalığı Virüsü (Marek's Disease Virus)
MHC	:Major Histocompatibility Complex
Rfp-Y	: Restriction fragment polymorphism-Y
NOR	:Nucleolar Organizer Regions
RSV	:Rous Sarkoma Tümör Virüsü
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
QTL	: Kantitatif özellik lokusları (Quantitative Trait Loci)
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
TBE	: Tris-Borate-EDTA
SNP	: Tek Nükleotid Poliorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
<i>Taq</i>	:Thermus Aquaticus
NJ	:Neighbor Joining
FCA	:Faktöriyel Uygunluk Analizi (Factorial Correspondence Analysis)
PIC	:Polimorfizm Bilgi İçeriği (Polymorphism Information Content)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye Tavuk Verileri a) Tavuk yumurta sayısı b) Yumurta ve et tavuğu sayısı (TÜİK 2016).....	2
Şekil 2.1. Marek Hastalığı'nın tavuklarda meydana getirdiği şekilsel bozukluklar (Cornell Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden alınmıştır).	8
Şekil 2.2. Marek Hastalığı etkileri a) gözde meydana gelen bozukluklar b) akciğerde meydana gelen yapı bozuklukları c) periferik sinirlerde görülen kalınlaşmalar d) ovaryumda meydana gelen tümörler e) <i>bursa Fabricius</i> organı üzerinde tümör oluşumu (Cornell Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden alınmıştır).	9
Şekil 2.3. Marek Hastalığı'nın bulaşma fazları (Baigent ve Davidson 2004).	11
Şekil 2.4. Marek Hastalığı'nın bulaşması (Nair 2004).	12
Şekil 2.5. Sırasıyla Dalak, <i>bursa Fabricius</i> ve Timus lenfoid organlarına farklı MHV hatlarının etkisi (Meydan 2012) (Cornell Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden alınmıştır).	13
Şekil 2.6. Virüs yapısının Marek Hastalığı aşılama sonucunda evrim geçirerek daha virulent hale gelmesi (Nair 2004, Meydan 2012) (<i>mMDV-mild</i> , <i>vMDV-virulent</i> , <i>vvMDV-very virulent</i> , <i>vv+MDV-very virulent plus</i>).	15
Şekil 2.7. Tavuklarda MHC gen bölgesi (Miller 2005).	19
Şekil 2.8. MHC-B kompleksi, Y ve NOR bölgesinin kromozomun q kolundaki yeri a-a') sentromer bölgesi (<i>NOR</i> , yeşil- <i>Y bölgesi</i> , kırmızı- <i>MHC-B</i> kompleksi sarı) (Solinhaç vd. 2010).	19
Şekil 2.9. B haplotiplerinin tavuk hastalıklarıyla ilişkisi (Wang vd. 2014).	21
Şekil 2.10. B haplotipleri ve Marek Hastalığı ilişkisi (Shiina vd. 2006).	22
Şekil 2.11. MHC yapısına göre dirençli ve duyarlı tavuk hatlarında MHV'nin durumu (- - - -dirençli hat , — duyarlı hat) (Schat ve Xing 2000).	22
Şekil 2.12. LEI0258 lokusunun tavuk genomundaki yeri.	23
Şekil 2.13. LEI0258 lokusunun tekrar bölgeleri (Fulton vd. 2006).	24
Şekil 2.14. Krossing-over'da eşit olmayan parça değişimi (Anonim 2).	27
Şekil 2.15. Replikasyon kayması sonucu oluşan mikrosatelit mutasyonları (Ellegren 2000).	28
Şekil 2.16. Mikrosatelit lokusların belirlenmesinin şematik gösterimi	28
Şekil 2.17. Mikrosatelit DNA marker yöntemi (Karlı 2015).	29
Şekil 2.18. Kapiller elektroforez sisteminde allel uzunluklarının belirlenmesi.....	29
Şekil 3.1. PCR ürünlerinin elektroforez cihazında yürütülmesi	37
Şekil 3.2. Elektroforez işleminden sonra ürünlerin görüntülenmesi.....	38
Şekil 3.3. PCR ürünleri için fragment analiz cihazı	39
Şekil 3.4. DNA fragment analizinde kullanılan kitler	39
Şekil 3.5. Fragment analizi için cihazın hazırlanması.....	41
Şekil 4.1. Kan örneklerinin DNA izolasyon aşamaları.....	49
Şekil 4.2. DNA örneklerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü.....	49

Şekil 4.3. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez sonrası görüntüsü.....	50
Şekil 4.4. RIR-I, RIR-II ve Col populasyonlarına ait olan ve yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulan jel görüntüsü.....	50
Şekil 4.5. Homozigot (üstte) ve heterozigot (altta) bireylere ait pik görüntüsü.....	51
Şekil 4.6. Çalışılan tavuk hatlarında ikişerli F_{ST} değerlerine göre elde edilen filogenetik ağaç.....	56
Şekil 4.7. Çalışılan tavuk hatlarında ikişerli F_{ST} değerlerine göre elde edilen dendogram.....	56
Şekil 4.8. Çalışılan on bir saf tavuk hattı ve kontrol grubu hatlarının (B19-B21) faktöriyel uygunluk analizi tablosu.....	57
Şekil 4.9. Structure Harvester programında elde edilen en yüksek ΔK değeri.....	58
Şekil 4.10. Çalışılan tavuk hatlarında Structure kümeleme analizi görüntüsü.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya Tavuk Verileri (<i>FAO</i> 2013).....	2
Çizelge 1.2. Evcil tavuğun sistematikteki yeri (<i>Crawfords</i> 1990).....	4
Çizelge 3.1. Irklara ait kan örnekleri ve işletme ile örnek sayısı.....	31
Çizelge 3.2. Araç/gereç listesi ve kullanım amaçları.....	32
Çizelge 3.3. Tampon çözeltilerin molarite/miktarı ve içerikleri.....	33
Çizelge 3.4. Çalışılacak olan gen bölgesine ait primer dizileri (<i>Fulton</i> 2006)	35
Çizelge 3.5. PCR Stok Tampon Çözeltisi.....	36
Çizelge 3.6. PCR programı	36
Çizelge 4.1. Çalışılan on bir saf tavuk hattındaki tanıtıcı istatistikler; birey sayısı (<i>N</i>), allel genişliği (<i>AG</i>), allel sayısı (<i>Na</i>), gözlenen (<i>Ho</i>) ve beklenen (<i>He</i>) heterozigotluk değerleri, polimorfizm bilgi içeriği (<i>PIC</i>).	52
Çizelge 4.2. Çalışılan on bir saf tavuk hattında ikişerli F_{ST} değerleri	54
Çizelge 4.3. Çalışılan on bir saf tavuk hattının <i>AMOVA</i> analizi tablosu	54
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan on bir saf tavuk hattı arasındaki genetik mesafe (D_A) ve genetik benzerlik	55

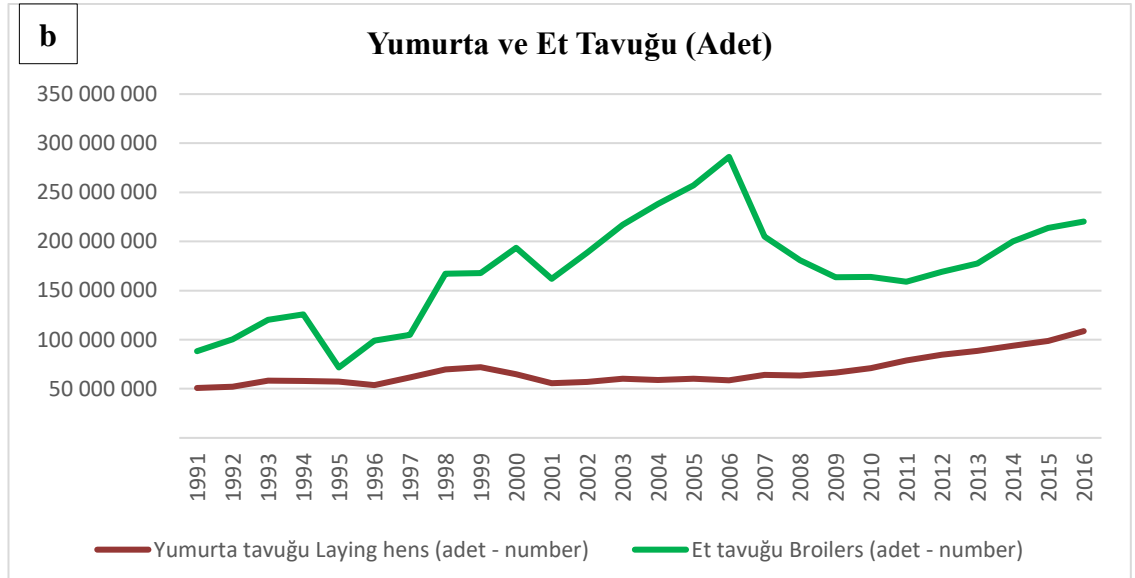
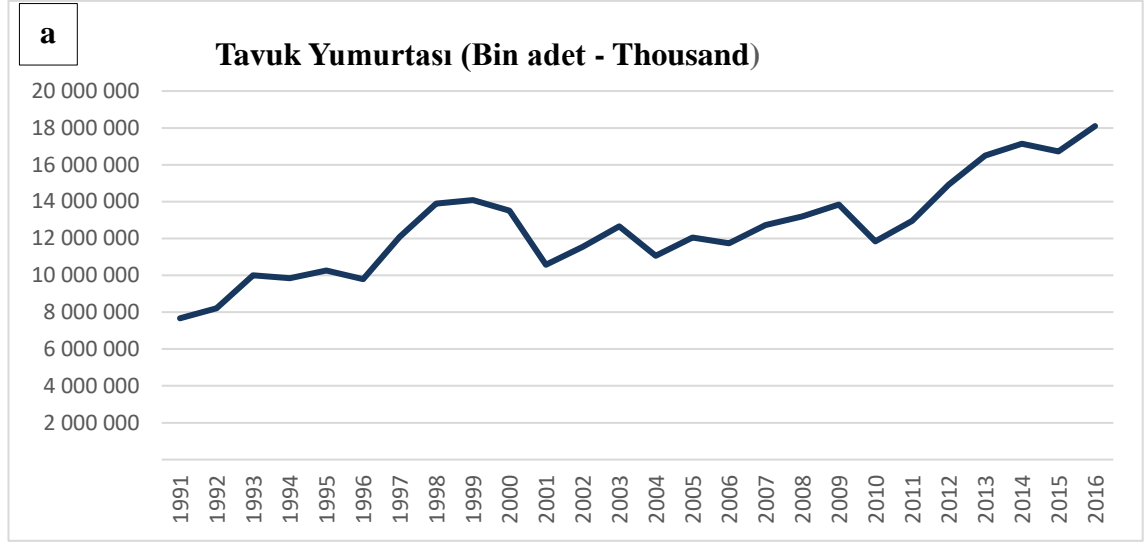
1. GİRİŞ

Günümüzde tavukçuluk, halen gelişmesini devam ettiren önemli bir endüstri sektörü konumundadır. Et ve yumurta bakımından yüksek ekonomik değere sahip olan tavuk yetiştiriciliği, Türkiye’de ve dünyada yaygın olarak yapılmaktadır. Hayvancılık sektörü içerisinde, otomasyona ve teknolojiye açık sektörlerinden birisi de tavukçuluk sektörüdür. Hayvansal protein açığının giderilmesinde kullanılan önemli alanlardan birisidir. Hızlı ve kolay üretiminin olması ve bununla birlikte maliyetinin de düşük olması başlıca avantajlarıdır (Çiçekgil ve Yazıcı 2016).

Türkiye’de tavukçuluk sektörünün gelişmesi için ilk adım, 1930 yılında Ankara’da Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü’nün kurulması olmuştur. 1952 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nden günlük civcivler olarak gelen saf ırklar, Tarım Bakanlığı’na bağlı kuruluşlara ve halka dağıtılarak sektöre katkı sağlanmıştır. Sonraki yıllarda hızlı gelişme gösteren tavukçuluk sektöründe, 1968 yılında hibrit ebeveynlerin ithal edilmesi ve bu durumun özel sektörde ilgi uyandırmasıyla bu yıllarda yerli hibrit soyların geliştirilmesi çalışmalarına ağırlık verilmiş ve tavukçuluk ıslah çalışmaları 1979 yılında ülkesel proje kapsamına alınmıştır. Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü kapsamında ülke sektöründe beyaz ve kahverengi yumurtacı tavuk ve etçi tavuk ebeveyn hatları üretimi olarak geliştirilmek üzere çalışmalar yapılmıştır. Ülkemizde tavukçuluk 1970’li yıllarda hayvancılık sektörü içerisinde gelişmeye başlayıp 1980 ve sonrası yıllarda kendi üretim planlamasını yapabilir hale gelmiş ve ülke ihtiyaçlarını karşılamada önemli bir üretim dalı olmuştur (Şengör 2015). Kümes hayvanlarının, endüstriyel üretime uygun olmasından dolayı dünyada yaygınlığı artmakta ve yine görece düşük fiyatlarla insanlara hayvansal protein açısından büyük katkılar sağlamaktadır. Yemden yararlanma oranları ve üretim dönemlerinin kısa olması, kanatlı hayvanlarla yapılan üretimin diğer çiftlik hayvan türleriyle yapılan üretime kıyasla daha ekonomik olmasını sağlamaktadır (Çınar 2007).

Tavukçuluk sektörü, Türkiye’de hayvancılık sektörleri arasında entansif yetiştiricilik oranı en yüksek olan sektördür. Yakın geçmişte yumurta ve piliç eti üretiminde oluşan artışla birlikte tavukçuluk sektöründe damızlık işletmeleri, yem, aşı, ilaç ve ekipman tedarikçileri ile pazarlama işletmeleri de büyümüştür. Tüm bu sektörler bir araya gelerek tavukçuluğun endüstriyel hale gelmesini sağlamıştır (Öztürk ve Türkoğlu 2012). Türkiye’de bugün doğrudan veya dolaylı olarak yaklaşık 3 milyon insan, tavukçuluk sektöründen geçimini sağlamaktadır. Bununla birlikte tavukçuluk sektörünün yıllık cirosunun 6 milyar dolara ulaştığı bilinmektedir (Baykalır ve Şimşek 2014; Koca 2014).

Türkiye’deki yumurtacı ve etçi tavuk varlığının son 20 yıl içerisinde önemli bir artış gösterdiğini söylemek mümkündür. 1996 yılında 150 milyon civarında olan tavuk varlığı, 2016 yılında 330 milyonun üstünde seyretmiştir. Tavuk yumurtası sayısı da benzer oranda bir artış göstermiş olup 1996 yılında yumurta sayısı 9 milyon (bin adet) iken 2016 yılındaki yumurta sayısının 18 milyon (bin adet) olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.1). Dünya’da 96 milyon ton tavuk eti üretimi, 68 milyon ton tavuk yumurtası üretiminin yapıldığı bildirilmiştir (Çizelge 1.1). Dünya üretimi içerisinde Türkiye, tavuk eti ve tavuk yumurtası üretiminde 10. sırada yer almaktadır.



Şekil 1.1. Türkiye Tavuk Verileri a) Tavuk yumurta sayısı; b) Yumurta ve et tavuğu sayısı (TÜİK 2016)

Çizelge 1.1. Dünya Tavuk Verileri (FAO 2013)

Yıl	Tavuk Yumurtası (000 Ton)	Tavuk Eti (000 Ton)
2010	63,572	55,332
2013	68,262	96,337

Gelişen ıslah, besleme ve yetiştiricilik koşulları; tavuk ürünleri üretiminin ve verimliliğin artmasını sağlamaktadır. Diğer türlerle kıyaslandığında tavukçuluk sektörünün büyümesinin temel sebebini, ekonomik açıdan değerli özelliklerin ıslahında yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Bu doğrultuda, son yıllardaki yapılan ıslah çalışmaları ile genetik potansiyeli daha iyi ticari tavuk hatlarının elde edildiği gösterilmiştir (Havenstein vd. 2003; Meydan 2012).

Ülkemizde damızlık materyal üretimi için Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nde yerli yumurtacı ve etçi tavuk hibritleri elde etmek için uzun yıllar süren yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, yabancı hibrit ebeveynlerinden geriye melezleme ile üretilen ana ve baba hatlarının seleksiyon ile ıslahı ve uygun melez kombinasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Fakat, çalışmada kullanılacak hat sayısının yetersiz olduğu anlaşılmış ve bunun üzerine 1995 yılında Kanada'dan 4 adet beyaz [Black Line, Brown Line, Maroon Line, Blue Line], 6 adet kahverengi [Rhode Island Red I (RIRI), Rhode Island Red II (RIRII), Barred Rock I (BARI), Barred Rock II (BARII), Colombian Rock (COL), Line-54 (L-54)] yumurtacı olmak üzere 10 adet saf hat, yerli damızlıkların elde edilmesi için ithal edilmiş ve araştırma bu yönde sürdürülmüştür. Hatlar üzerinde yapılan araştırmalar, elde edilecek olan melez hatların yumurta veriminin artırılmasını ve diğer istenen özelliklerin optimum seviyede tutulmasını hedeflemiştir (Durmuş vd. 2008; Anonim 1; Karşlı 2015).

1995 yılında Kanada'dan ithal edilen saf hatlar akrabalığın artmaması dikkate alınarak kendi içinde çoğaltılmış, daha sonra önemli görülen bazı özelliklerin seleksiyonu ve geliştirilmesi için hat içi ıslah çalışmaları yapılmıştır. Saf hatlar arasında yapılan ikili ve üçlü melezlemeler ile ebeveynler elde edilmiştir. Ebeveynlerden elde edilmiş olan hibrit civcivler ise çeşitli testlere tabi tutulmuş ve en uygun olan kombinasyonlar elde edilmeye çalışılmıştır (Akman vd. 2005). Sonuç olarak iki tane kahverengi (ATAK, ATAK-S), bir tane beyaz (ATABEY) olmak üzere üç tane hibrit üretilmiştir (Mızrak vd. 2007). Bu üç hibrit Türk Patent Enstitüsü ve Ulusal Irk Tescil Komitesi tarafından tescil edilmiştir. Bu hibritler, ülkemizin ticari değeri olan tescilli ilk hayvan ırklarıdır (Anonim 1). Kahverengi hibritler (ATAK, ATAK-S) baba hatları olarak Rhode Island Red-I (RIRI) ve Rhode Island Red-II (RIRII), ana hatları olarak Barred Rock-I (BARI) ve Line-54 (L-54) hatları kullanılarak elde edilmiştir. Beyaz hibritin (ATABEY) elde edilmesinde ise baba hattı olarak Black Line ve ana hattı olarak da Blue Line hattı kullanılmıştır (Akünal 2009; Karşlı 2015).

Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nde bulunan saf hatlar (ATAK, ATAK-S, ATABEY) ülkemizdeki tek damızlık materyal olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Yaklaşık 20 yıldır Türkiye'de yetiştirilen bu hatlar korunmalı ve bu hatlar üzerinde yapılan ıslah çalışmalarının artarak devam etmesi sağlanmalıdır.

Yapılan arkeolojik çalışmalar evcil tavuğun ilk olarak M.Ö. 2000 yıllarında Güneydoğu Asya'da evcilleştirildiğini göstermektedir. Kırmızı yabani tavuktan (*Gallus gallus* veya *Gallus bankiva*) köken alan evcil tavuk, Asya'dan Doğu ve Batı'daki çeşitli ülkelere yayılmıştır (Crawfords 1990). Ancak tüm yabani türlerinin doğada var olmasına karşın evcil tavuğun hangi kökenden geldiği tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Tavukların *Gallus domesticus* terimi de evcil tavuğun birden fazla yabani tavuktan köken aldığı belirtmek için kullanılmaktadır. Evcil tavuğa oldukça benzeyen, Güney Asya'da yaşamakta olan ve tavuğun evcilleştirilmesine katkısı olduğu düşünülen 4 farklı yabani

tavuk türü bulunmaktadır. Bu türler *Gallus gallus* veya *Gallus bankiva* (kırmızı orman tavuğu), *Gallus sonnerati* (gri orman tavuğu), *Gallus lafayetti* (seylan orman tavuğu) ile *Gallus varius* (siyah veya yeşil orman tavuğu)'tur (Crawfords 1990). Tüm bu bilgiler doğrultusunda evcil tavuğun sistematikteki yeri tanımlanmıştır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Evcil tavuğun sistematikteki yeri (Crawfords 1990)

Alem	: Animalia (Hayvanlar)
Şube	: Chordata (Kordalılar)
Alt Şube	: Vertabrata (Omurgalılar)
Sınıf	: Aves (Kuşlar)
Takım	: Galliformes (Tavuksular)
Alt Takım	: Galli (Tavuklar)
Familya	: Phasianidae (Sülüngiller)
Alt Familya	: Phasianinae (Sülünler)
Cins	: <i>Gallus</i>
Tür	: <i>Gallus Gallus</i>

Genetik ve hayvan ıslahı alanındaki gelişmeler, yerel hayvan ırklarından kültür ırklarına, üstün verime sahip soy ve hatların elde edilmesine, bu soy ve hatlar arasında yapılan çalışmalar ile de üstün verimli ve benzer özellikte ticari hayvan tiplerinin sürekli üretimine geçilmesini sağlamıştır (Aksoy 1999). Bu doğrultuda tavukların morfolojik özellikleri bakımından tanımlanması ile çok sayıda iyi tanımlanmış ıslah hatları, çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Ayrıca yapılan bu morfolojik çalışmaları desteklemek ve özellikleri belirleyen genlerin yerlerinin tespit edilmesi amacıyla tavuklarda genetik bağlantı haritası oluşturulmaya başlanmıştır. Tavuk karyotipi, farklı büyüklüklere sahip olan ve buna bağlı olarak mikro ve makro olarak adlandırılan 2n:78 adet kromozomdan oluşmaktadır (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004). Bu kromozomlar, 8 çift makrokromozom, 30 çift mikrokromozom ve bir çift eşey kromozomunu (ZW/ZZ) içermektedir (Meydan 2012). Tavuk otozomal kromozomlarını, beş tane büyük (GGA 1-5), beş tane orta büyüklükte (GGA 6-10) ve 28 tane küçük kromozom (GGA 11-38) meydana getirmektedir (Kaya 2008; Meydan 2012).

Çeşitli hastalıklara dirençli, çevre koşullarına uyum sağlamış ve yüksek verime sahip hatların geliştirilmesi, hayvansal üretiminin artırılabilmesini sağlamaktadır. Ancak son yıllardaki tavukçuluk sektöründe oluşan başta enfeksiyöz hastalıklar olmak üzere birçok hastalık, sektörü kontrol yöntemleri geliştirmeye iten nedenler olmuştur. Tavuklarda bulaşıcı hastalıklardan birkaçı; Kuş gribi, Marek Hastalığı, Newcastle ve Salmonella'dır. Bu hastalıklar hayvan ölümlerine sebep olmakla birlikte, insanların sağlığını da direkt veya dolaylı olarak tehdit edip ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Yapılan ıslah çalışmalarındaki değişiklikler ve geliştirilen yeni aşılar, hastalık sorunlarının bazılarında çözüm yolu olmasına rağmen, hastalıkları ortadan kaldırmak için mevcut yöntemlerin geliştirilmesi veya başka kontrol yöntemleri gerekmektedir.

Tavukçuluk sektöründe, ekonomik kayıplara neden olan ve tavuk yetiştiriciliğini tehdit eden en önemli hastalıklardan birisi Marek Hastalığı (MH) olup, yapılan ticari tavuk hatlarının geliştirilmesi çalışmalarında bu hastalığa karşı genetik olarak dirençli hatların elde edilmesi amaçlanmaktadır. MH, Marek Hastalığı Virüsü (MHV)'nden kaynaklanan, kanserojen ve tümör oluşturan bir T hücre lenfoma hastalığı olarak

bildirilmiştir (Marek 1907). Bu hastalık vücutta periferal sinirlerde, birçok iç organda, gonadlarda, iris, kas ve deri gibi dokuların biri veya birkaçında bozukluklar meydana getiren ve tümöral karakterli bir hastalıktır (Calnek ve Witter 1997). Hastalık etkeni Herpesviridae ailesi Mardivirus soyuna aittir ve çok bulaşıcıdır (The Taxonomicon 2006). Günlük civcivler bu enfeksiyona karşı daha fazla duyarlıdır (Osterrieder vd. 2006). MHV, kümes içerisinde tavuktan tavuğa doğrudan temas hali ya da virüsü taşıyan toz partikülleri ile yayılmaktadır. Enfekte hayvanların tüy folikül epitelleri, virüsün yayılarak etrafa bulaşmasında ana kaynaktır. Virüsün tavuk tüylerinde ve kümes havasında fazla bulunması, hastalığın tavuklara solunum sistemi yoluyla bulaşmasına yol açar. Ayrıca enfeksiyon sebebi virüs, kümese giren insan veya diğer canlılar (kuşlar, kemiriciler vs) yoluyla olduğu gibi, havalandırma sistemi ve malzemelere bulaşarak kümes dışına yayılabilmektedir (Meydan 2012).

Günümüzde MH ile mücadelede en çok kullanılan ve en etkili yol aşılama (Witter ve Schat 2003; Mısırlıoğlu 2009). 1970 yılından itibaren, MH'yi kontrol altına almak için aşilar geliştirilmiş ve öncelikli olarak civcivlerde kullanılmıştır. MH sıklığının ve belirtilerinin büyük oranda azalmasını sağlayan aşılama, hastalık etkeni MHV'nin çoğalmasına ve yayılmasına engel olamamaktadır. Bu doğrultuda, aşılama yapılsa dahi MH, yıllık et ve yumurta üretiminin azalmasına yol açarak dünya çapında milyarlarca dolarlık kayıplara neden olmaktadır. Yüksek virülente sahip MHV hatlarının olması ve aşılama sonucu bağışıklıkta oluşan yetersizlik gibi nedenlerle MH günümüzde tavuk yetiştiriciliği ve tavuk sektörü için tehdit olmayı sürdürmektedir (Schat vd. 1981; Osterrieder vd. 2006; Meydan 2012).

MH'ye karşı bağışıklığı sağlayan birçok etken vardır. Ancak hangi bağışık yanıtın enfeksiyonda hangi evrede ve ne şekilde etki ettiği tam olarak ortaya konulamamasına rağmen, hastalığın şiddetlenmesini önlediği bildirilmiştir (Sharma vd. 1973). Enfeksiyonu takiben hayvanlarda, humoral ve hücre ilişkili olan hücresel bağışıklık gelişir. Pasif olarak aşılama yoluyla kazanılmış humoral antikolar genellikle yaşamı boyunca hayvanda kalmakta ve enfeksiyonun şiddetini azaltarak tümör oluşmasını ve hastalığın yayılmasını engelleyebilmektedir (Burgoyne ve Witter 1973). Ancak, hastalığa karşı bağışıklık konusunda hücresel bağışıklığın daha önemli olduğu vurgulanmaktadır. İçerdiği hücresel bağışıklık özelliğine göre şekillenen genotipler, MH'ye karşı duyarlılık veya dirençlilik kazandırmaktadır.

Bir canlının yaşamını en iyi şekilde sürdürebilmesi için hastalıklara karşı dirençli olması gerekmektedir. Bu nedenle bağışıklık sistemi üzerinde önemli role sahip olan Major Histocompatibility Complex (MHC) genleri, hayvancılık sektöründe üzerinde durulması gereken genler arasında yer almaktadır. Çünkü bağışıklık sisteminin kendinden olanı ve olmayanı tanıması için gerekli doku antijenlerini kodlamada görevli gen bölgesi MHC bölgesidir (Lenger 2011). MHC gen bölgesinde, bağışıklıktan sorumlu çok sayıda genin bulunmasının yanı sıra bağışık yanıtla ilgisi tanımlanmamış bazı genlerin de bulunduğu bildirilmiştir (Snell 1981; Temiz 2005; Gün 2007; Lenger 2011). Tavuklarda MHC sistemi, başlangıçta bir eritrosit antijeni olarak keşfedildiğinden dolayı, B kompleksi olarak da adlandırılmaktadır (Lamont 1989; Lenger 2011). MHC genlerini işaret etme gibi önemli bir özelliği bulduğu için B kan grubu tipleri, tavuk MHC sistemi belirlenmesinde kullanılmaktadır (Aksoy vd. 1998). MHC gen bölgesi 16. kromozom üzerinde bulunmakta olup üç farklı sınıftan oluşmaktadır: Sınıf I (B-F), Sınıf II (B-L) ve Sınıf III (B-G) (Lamont 1989; Shiina vd. 2006; Li 2010).

Tavuk MHC genlerinin viral, bakteriyel, paraziter ve otoimmün hastalıklara karşı direnç ve duyarlılıkla ilişkili bir gen kompleksi olduğu bildirilmiştir (Lamont 1989; Li 2010; Lenger 2011). MHC genleri, MH'ye karşı dirençlilik veya duyarlılıkta rol oynamaktadır (Lamont 1989; Miller 2005). Bugüne kadar çalışmalarda 29 farklı B kan grubu haplotipi belirlenmiştir (Fulton vd. 2006). Tavuklarda MH'ye direnç ile B₂, B₆, B₁₄ ve B₂₁ haplotipleri arasında; duyarlılık ile B₁, B₃, B₅, B₁₃, B₁₅, B₁₉ ve B₂₇ haplotipleri arasında bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir (Cheng 2003; Shina vd. 2006). Özellikle B₁₉ haplotipinin MH'ye duyarlılığa, B₂₁ haplotipinin ise yüksek dirence sebep olduğu saptanmıştır.

Tavuklarda MHC genleriyle ilişkili olan birçok mikrosatelit lokus belirlenmiştir (Emara vd. 2002; Fulton vd. 2006; Chazara vd. 2011; Gao vd. 2015; Fulton vd. 2016). MHC bölgesi içinde yer alan mikrosatelit lokuslarda meydana gelen varyasyonun, hastalıklara karşı dayanıklılıkta rol oynadığı bulunmuştur (McElroy vd. 2005). Belirlenen 81 tane mikrosatelit lokus içerisinde bazılarının MH'ye karşı dayanıklılık ve duyarlılık ile ilgili lokuslar (LEI0258, MCW0371, MCW0312 ve MHC-D mikrosatelit lokusları) olduğu belirlenmiştir (Fulton vd. 2006, 2016). Yapılan bu çalışmalara göre en önemli lokuslardan bir tanesi LEI0258 lokusudur. Farklı uzunluklara sahip tekrar bölgesi içeren LEI0258 mikrosatelit lokusunun allel büyüklüğü 182-552 bç. arasında değişmektedir (Fulton vd. 2006). Bu mikrosatelit sahip olduğu allel büyüklüğüne göre tavuğun sahip olduğu B haplotipini belirleyebilme avantajına sahiptir. Yapılan çalışmalarda, LEI0258 lokusunun 357 bç.'lik allelinin B₂₁ haplotipine, 539 bç. ve 552 bç.'lik allellerin ise sadece B₁₉ haplotipine özgü olduğu tespit edilmiştir (Fulton vd. 2006). LEI028 mikrosatelit lokusu kullanılarak tavuğun MHC genleri bakımından, MH'ye karşı dayanıklılığı veya duyarlılığı hakkında bilgi edinilebilir.

Bu tez çalışmasının amacı Türkiye Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nün yetiştirdiği 11 farklı ticari tavuk hattının MH ile alakalı olan LEI0258 lokusu bakımından tanımlanması ve bu lokus bakımından çalışılan hatlar arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesidir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Marek Hastalığı

Marek hastalığı (MH) özellikle evcil tavukların periferik sinirleri, gonadlar, iris, kas, deri ve çeşitli iç organlarının bir ya da daha çoğunda mononükleer hücre sızması ile karakterize, oldukça sık rastlanan viral kökenli, lenfoproliferatif (dalak, timüs, *bursa Fabricius* gibi lenfoid organlarda, lenfositlerde bölünmenin anormal olması) bir T-hücre lenfoma hastalığıdır (Witter ve Schat 2003; Nair vd. 2008). Hastalığa sebep olan etken, Herpesviridae ailesinin Mardivirus soyuna ait olan Marek Hastalığı Virüsü'dür (MHV) (Witter vd. 2005). MHV, çift sarmal yapıda ve kanserojen (oncogenic) özelliğe sahip bir virüstür. Bu virüsün infekte olduğu duyarlı tavukların sinir ve iç organlarında çeşitli lezyonlar ve tümörler gelişmeye başlar. Oluşan lezyonlar ve tümörler tavukta; felç, körlük ve ölümlerle sonuçlanan vakalara neden olur (Calnek ve Witter 1997).

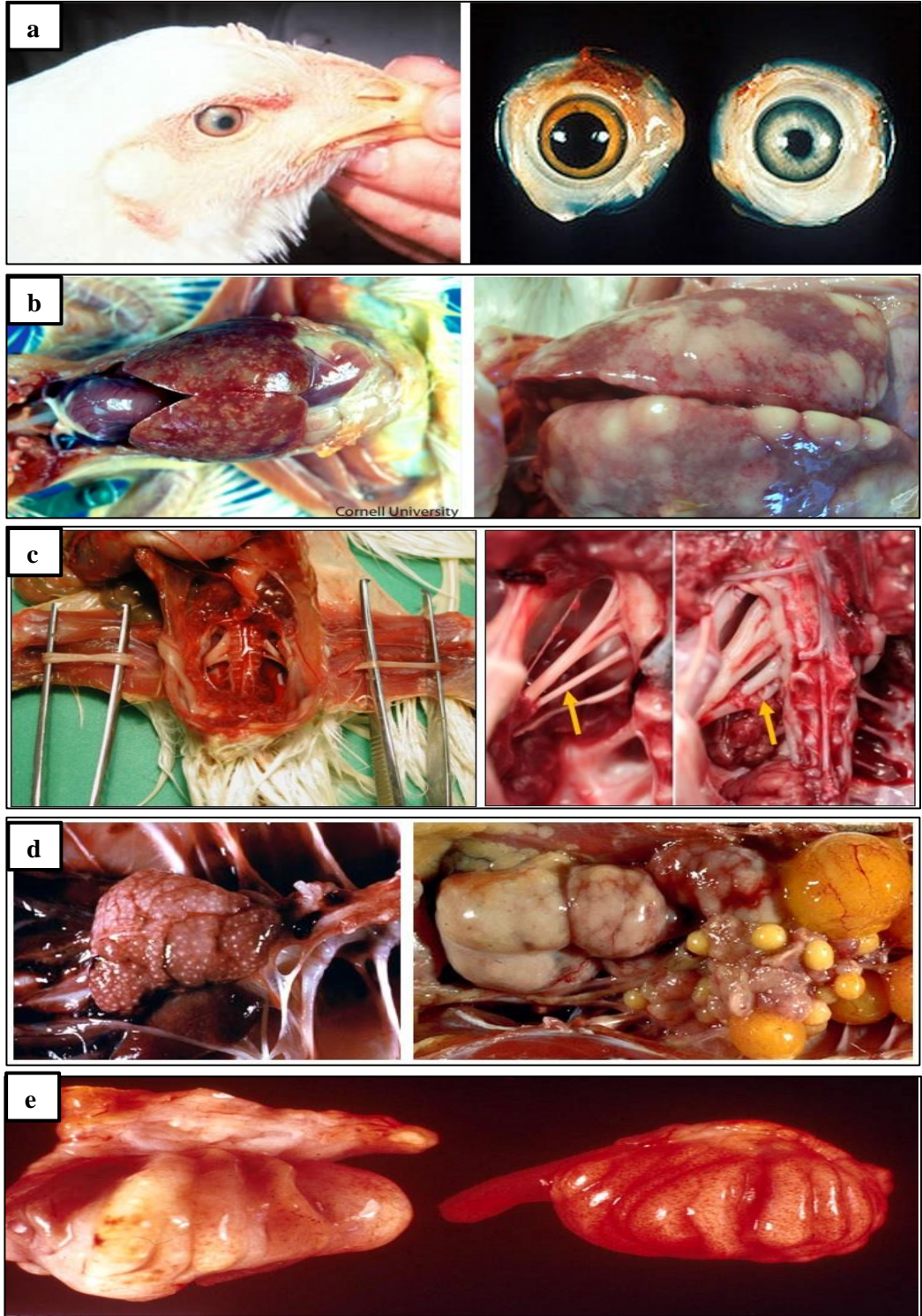
2.2. Marek Hastalığı'nın Tarihçesi

Marek Hastalığı ilk olarak 1907 yılında, Macaristan Kraliyet Veteriner Okulu (Royal Hungarian Veterinary School)'nda Patolog olan Dr. József Marek tarafından teşhis edilmiş ve tanımlanmıştır. József Marek bu hastalıkla ilk olarak 4 adet genç horozda gözlemlendiği bulgularla karşılaşmıştır. Bu horozların bacak ve kanatlarında felç (paralysis) olduğunu, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde patolojik değişikliklerin olduğunu bildirmiştir (Marek 1907). MH, tespit edilmesine takiben diğer ülkelerden de hastalığa ilişkin raporlar yayımlanmıştır (Calnek ve Witter 1972). 1921'de ABD'de (Kaupp 1921), yine 1921'de Hollanda'da (Van der Valle ve Winkler-Jenius 1924), 1929'da İngiltere'de ve 1930'da Avustralya'da (Howard vd. 1967) hastalığın görüldüğü bildirilmiştir (Başkaya ve Minbay 1974).

Hastalıkta şekillenen lezyonların çok farklı dokularda bulunması, klinik ve patolojik bulgularla çeşitliliğe, dolayısıyla da hastalığın terminolojisinde karışıklığa yol açmıştır. Hastalığın bulgularının bildirildiği ilk olgularda klinik olarak bacak ve kanatlarda oluşan felçler üzerinde durulmuş, makroskopik olarak sadece periferik ve merkezi sinir sistemi bulguları tespit edildiği için hastalık tavuk paralizisi, *Polyneuritis*, *Tavuk Felci* ve *Neuromyelitis Gallinarum* olarak tanımlanmıştır (Calnek ve Witter 1991) (Şekil 2.1). Sinirlerin dışında gelişen, özellikle yumurtalık ve dalak gibi organlarda tümoral oluşumların görülmesi, iriste grimsi opak görünüme kadar değişen körlük, gri göz, iritis gibi bulguların (Biggs 1961) olduğu daha sonraki araştırmalar, klinik semptomların ve patolojik bulguların felç ve sinirlerde görülen lezyonlarla sınırlı kalmadığını, dalak, timüs, *bursa Fabricius* gibi lenfoid organlarda ve gonad yapılarında da bozukluklara yol açtığını göstermiştir (Başkaya ve Minbay 1974) (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Marek Hastalığı'nın tavuklarda meydana getirdiği şekilsel bozukluklar (Cornell Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden alınmıştır)



Şekil 2.2. Marek Hastalığı etkileri **a)** gözde meydana gelen bozukluklar; **b)** Akciğerde meydana gelen yapı bozuklukları; **c)** periferel sinirlerde görülen kalınlaşmalar; **d)** ovaryumda meydana gelen tümörler; **e)** bursa Fabricius organı üzerinde tümör oluşumu (Cornell Üniversitesi, Veteriner Fakültesi'nden alınmıştır)

MH, 1940 ile 1960 yılları arasında *Kanatlı Löykozis Kompleksi* içinde sınıflandırılmıştır. Ancak, daha sonraki yapılan araştırmalar sonucu MH'nin etiyolojik olarak *Kanatlı Löykozis Kompleksi*'nden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu durum hastalık etkeni virüslerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. MH etkeni herpes grubu bir DNA virüsüyken, *Kanatlı Löykozis Kompleksi'nin* etkeni ise Myxovirüs grubu bir RNA virüsüdür (Meydan 2012). 1961 yılında hastalığın terminolojisi *Dünya Veteriner Kümes Hayvanları Derneği* tarafından tekrar görüşülmüştür. Yapılan bu görüşmede, hastalığı ilk ortaya koyan araştırmacıya ithafen *Marek Hastalığı* adının verilmesine karar verilmiştir (Report of the AAAP 1967). Daha sonra hastalığın klinik ve patolojik bulguları göz önünde bulundurularak iç organlarda tümörlerin görüldüğü hastalıklar için *Akut Marek Hastalığı*, sinirsel lezyonlarla oluşan hastalık tablosu için ise *Klasik Marek Hastalığı* terimleri kullanılmaya başlanmıştır (Calnek ve Witter 1972). Oldukça bulaşıcı bir hastalık olan MH'ye neden olan etkenin hücre-ilişkili bir herpesvirüs olduğu bulunmuş ve bu virüs hasta tavukların kan ve böbreklerinden izole edildiği bildirilmiştir (Meydan 2012).

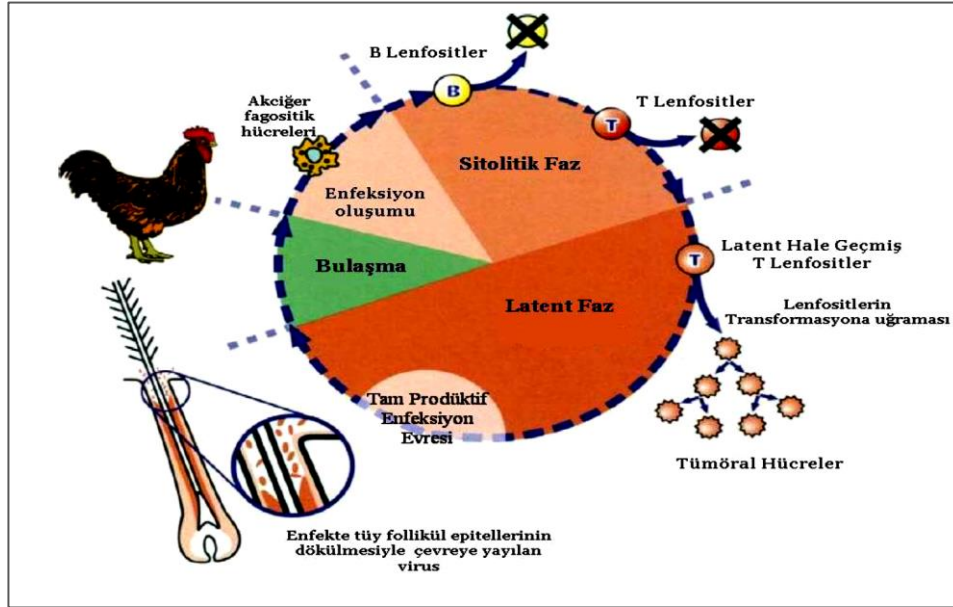
Ülkemizde ise hastalık ilk defa *Leucosis Complex* olarak rapor edilmiştir (Pamukçu ve Başkaya 1952). Hastalığın çeşitli özellikleri birçok araştırmacı tarafından ele alınmış (Köküslü ve Özkul 1977,1978; Gürel ve Yeşildere 1993, Gürel vd. 2003, Meydan vd. 2011), doktora ya da uzmanlık tezi (Aksoy 1992, Keleş 2007, Lenger 2011, Meydan 2012, Yavuz 2014) kapsamında incelenmiştir.

2.3. Marek Hastalığı'nın Bulaşması

Günümüzde tavuklar, kanatlılar içerisinde MH'nin en önemli doğal konakçıları olarak kabul edilmektedir. Bunun yanında ördek, kaz, bıldırcın, şahin, papağan, kuğu ve yaban tavuklarında da hastalığın ya da viral antijenlerin nadiren gözlemlendiği bildirilmiştir (Calnek ve Witter 1972). Yaşlı tavukların, genç tavuklara göre hastalığa karşı daha dirençli oldukları belirlenmiştir (Witter vd. 1973). MH genellikle 16 haftalıktan küçük piliçlerde görülmektedir (Minbay 2002). Hastalığın en sık görüldüğü yaş grubu ise 12-24 haftalık dönemler olmasına rağmen, 3-4 haftalık civcivler ve 24. haftadan daha yaşlı tavuklarda da hastalığın görüldüğü kaydedilmiştir (Calnet ve Witter 1978, Witter ve Schat 2003).

Virüs bulaşmış keratinize epitel hücreleri, hastalığın çevreye bulaşmasında önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Hücre canlılığına bağlı olmadan virüs, kümes koşullarında uzun süre aktivitesini devam ettirebilmektedir. MHV yüksek seviyede hücre-ilişkili bir virüstür. Tüy folikül epiteli tarafından alınan virüs, konakçıyı enfekte eder. MHV ile bulaşmış olan bu epitelleri içeren tozlar, tavuklar için bulaşma etmeni olup solunum yolu ile bulaşma göstermektedir. Hastalığa duyarlı tavuklarda MHV enfeksiyonundan sonra lenfoma oluşumu gözlenir. Lenfomalar dalak, akciğer, kalp, pankreas, böbrek, gonadlar gibi iç organlarda oluşabildiği gibi kas, periferik sinirler, göz ve deri gibi diğer organlarda da oluşabilmektedir. Virüs hattının tipi ve konakçının genotipi, farklı organlardaki lenfoma oluşumunu etkilemektedir (Meydan 2012).

Duyarlı özellikteki tavuklarda MH bulaşma aşamaları; erken sitolitik faz, gizli (latent) faz, geç sitolitik faz ve transformasyon fazı olmak üzere 4 aşamadan oluşur (Nair ve Payne 1995) (Şekil 2.3).



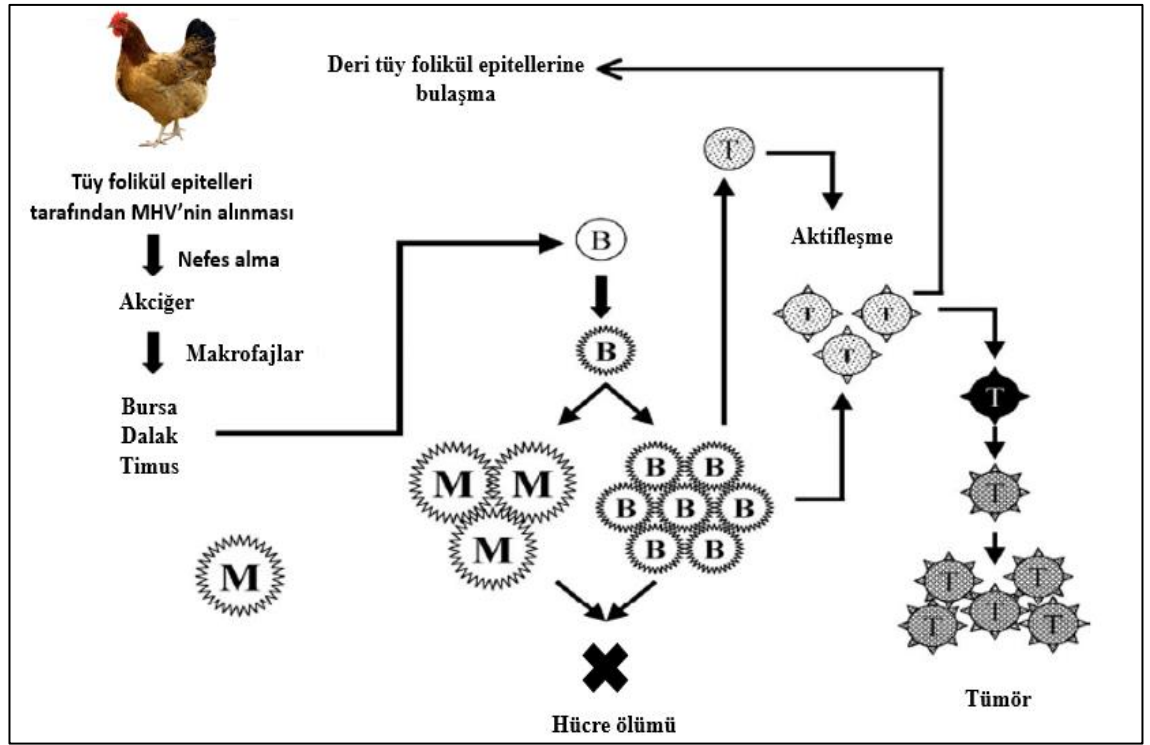
Şekil 2.3. Marek Hastalığı'nın bulaşma fazları (Baigent ve Davidson 2004)

MH etkeni vücuda solunum yoluyla girdiği, daha sonra solunum sistemindeki makrofajlar tarafından doğrudan veya epitel hücrelerindeki çoğalmayı takiben virüsün, ilk önce akciğerin lenfoid olmayan hücrelerinde replikasyona uğradığı belirlenmiştir (Nair ve Payne 1995; Witter ve Schat 2003; Nair vd. 2008). Virüs, bir hücreden başka hücreye interleukin-8 (vIL8) sayesinde geçmektedir (Engel vd. 2012; Haq 2012). Erken sitolitik fazın başlaması, virüsün vücuda girmesinden 3.-4. günlerden sonra özellikle *bursa Fabricius* ve timüs başta olmak üzere dalak ve diğer lenfoid sistemin aktive olmuş T lenfositlerin içerisine girmesi ile olmaktadır. Bu hücrelerde sitolizin meydana gelmesiyle erken sitolitik faz başlamış olur (Schat vd. 1981; Nair ve Payne 1995). Sitolitik enfeksiyon olduğunun, dalaktaki aktive olmuş CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinin varlığı ile belirlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, timüs ve *bursa Fabricius*'ta oluşan atrofi sonucu tavuklarda bağışıklık kaybı ya da baskılanması olduğu belirtilmektedir (Witter ve Schat 2003).

T lenfositlerde enfeksiyon, 6 – 7 gün sonra latent hale gelmektedir. Latent enfeksiyon fazı bazen B lenfositlerde de görülebilmektedir (Osterreider vd. 2006). Enfekte lenfositler aracılığıyla vücuda yayılan virüs; lenfoid organlar, böbrek, pankreas, karaciğer, dalak, kalp ve özellikle deride yangısal değişiklikler meydana getirmektedir (Calnek ve Witter 1991). Hastalığın 2. – 3. haftalarında duyarlı tavuklarda virüs, geç sitolitik enfeksiyon fazını başlatır (Witter ve Schat 2003). Bu faz duyarlı hayvanlarda sürekli bir bağışıklık baskılanmasına yol açar. Latent olarak virüsle enfekte olmuş hücreler kan dolaşımı yoluyla tekrar böbrekler, timüs ve *bursa Fabricius* gibi organlara

gelir (Baigent ve Davidson 2004). Bu doğrultuda söz konusu organlarda mononükleer lenfositik hücre infiltrasyonları gözlenmektedir (Keleş 2007).

MHV tarafından şekillendirilen transformasyon fazı, latent olarak enfekte olmuş lenfositlerin, lenfoblastoid tümör hücrelerine dönüşümü olarak bildirilmiştir (Baigent ve Davidson 2004). CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin, transformasyon evresi için asıl hedef hücreler olduğu saptanmıştır (Schat vd. 1991). Dalak, bursa Fabricius ve timusta aktif T lenfositler dejenerasyona uğrarlar. B lenfositlerin dejenerasyonu sonucunda ise T lenfositler aktive olur. B lenfositlerdeki olgunlaşmamış virüse karşı gelişen hücresel bağışıklık sonucu yardımcı T lenfositlerde transformasyon gelişir. Transformasyona uğrayan T lenfositler viral genomu içerdiklerinden dolayı hızlı bir şekilde tümör oluşumları gerçekleşmektedir. Enfeksiyonun girişinden sonraki 3. – 4. haftalar arasında, oluşan bu transforme hücrelerin iç organlarda ve perifer sinirlerde çoğalarak tümörleri meydana getirdikleri belirlenmiştir (Witter ve Schat 2003, Baigent ve Davidson 2004) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Marek Hastalığı'nın bulaşması (Nair 2004)

MH bulaşması, virüs veya konakçıya bağlı olarak farklı durumlarda gerçekleşebilmektedir. Bulaşmada etkili olan faktörler virüs ve konakçı ile ilgili olabilmektedir. Virüsle ilgili olan faktörler, virüsün virülensi veya kanser yapabilme özelliği ve virüsün serotipi iken, konakçı ile ilgili faktörler ise konakçının genotipi, yaşı ve cinsiyetidir. Ayrıca konakçının sahip olduğu bağışıklık sisteminin durumu ve aşılama

ile bağıklık elde edilmiş olması da MH'nin bulaşmasında etkili olmaktadır (Meydan 2012).

2.4. Marek Hastalığı Virüsü (MHV)

Marek Hastalığı'na sebep olan MHV, *Herpesviridae* familyasına bağlı *Alphaherpesviridae* subfamilyası altında yer alan *Mardivirus* soyuna ait hücre-ilişkili bir herpesvirustur (Meydan 2012). Çift eksenli DNA (dsDNA) yapısına sahip virüslerden olan MHV'nin DNA uzunluğu yaklaşık 160 kb'dir. MHV ikosaedral (yirmiyüzlü) yapıda olup viral partikülleri diğer herpesviruslarla aynı özelliktedir. Bugüne kadar 3 adet MHV serotipi tanımlanmış olup bunlar, serotip 1 (MHV-1, gallid herpesvirus tip2, GaHV-2), serotip 2 (MHV-2, gallid herpesvirus tip3, GaHV-3) ve serotip 3 (MHV-3, turkey herpesvirus, HVT)'tür (Osterrieder vd. 2006; The Taxonomicon 2013; Meydan 2012). Serotipler antijenik ve genotipik olarak sınıflandırıldığında; sadece MHV-1 yüksek seviyede patojenik ve kanserojendir, MHV-2 ve MHV-3'ün patojenik özellikte olmayıp ve kansere neden olmadığı belirlenmiştir (Witter ve Schat 2003). Ayrıca, MHV-1 serotipi, kendi içerisinde aşılansmış tavuklarda lezyon oluşturma durumuna göre vv+MHV (very virulent plus), vvMHV (very virulent), vMHV (virulent) ve mMHV (mild) olarak 4 sınıfta gruplandırılmıştır (Meydan 2012). Yapılan çalışmalarda MHV'nin, tavuk lenfoid organlarını aynı şekilde etkilemediği belirlenmiştir. Yüksek virulent özellikteki MHV hatları lenfoid organlardan *bursa Fabricius* ve timusta B ve T lenfosit kaybından dolayı şiddetli atrofiye neden olmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Sırasıyla Dalak, *bursa Fabricius* ve Timus lenfoid organlarına farklı MHV hatlarının etkisi (Cornell Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden alınmıştır)

Yapılan DNA dizilemesi sonucunda 3 adet MHV serotipinin gen içeriğinin neredeyse aynı olduğu belirlenmiştir. MHV-1 serotipinin 103 gen, MHV-2 serotipinin 102 gen ve MHV-3 serotipinin ise 99 gen içerdiği saptanmıştır. Kanserojen özellikteki

MHV-1 serotipinde bulunan MHV EcoRI-Q (Meq) geni, kansere neden olan gen olarak kabul edilmektedir. *Meq* geni, 339 amino asitten oluşan bir proteini kodlamaktadır. pp38 (phosphoprotein 38) ve vIL8 (viral interleukin 8), MHV-1 serotipinde bulunan diğer önemli genlerdir. *Meq* ve pp38 latent enfeksiyonda ve tümör oluşumunda etkili bölgelerdir. vIL8'in ise lenfositleri uyardığı ve onkogenesiste etkili olduğu bildirilmiştir (Lee vd. 2008, Meydan 2012).

2.5. Marek Hastalığı'na Karşı Korunma Yolları

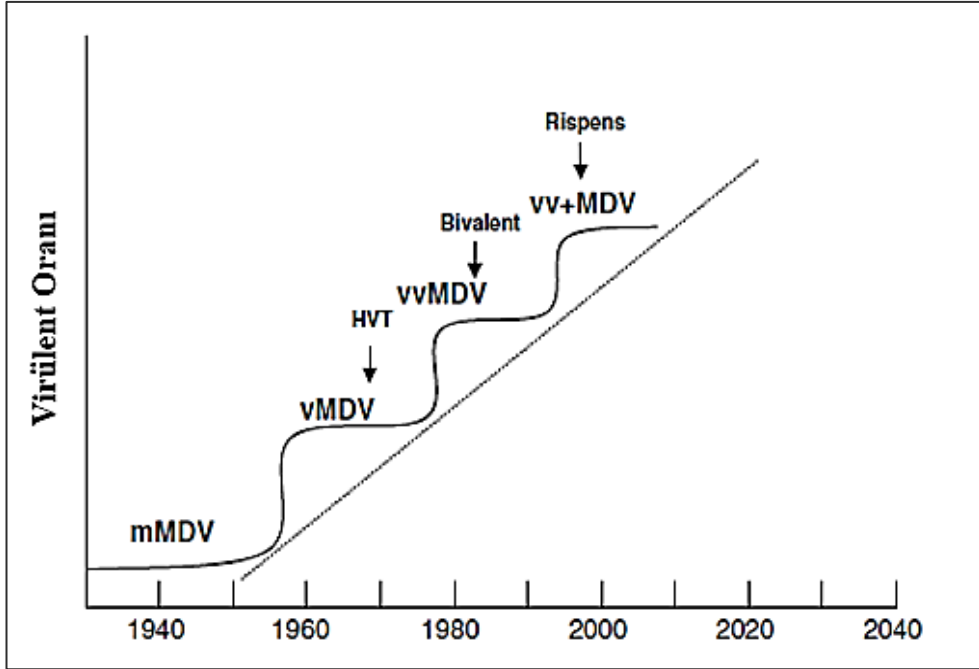
Marek Hastalığı enfeksiyonu bir ortamda çeşitli durumlarda gelişebilmektedir. MHV hayvanlar arasında direkt temas hali veya indirekt yollarla yayılabilmektedir. Kümes içerisinde enfekte tavukların bulunması direkt temas hali iken, kontamine kümes ve materyaller indirekt bulaşmaya yol açmaktadır (Minbay 2002; Witter ve Schat 2003). İmmüsupresyona sebep olan Enfeksiyöz Bursal Hastalık, Tavuk Enfeksiyöz Anemisi gibi bazı hastalıkların görüldüğü işletmelerde MH'nin de görülme olasılığının arttığı bildirilmiştir (Biggs vd. 1973). Ayrıca stres faktörlerinin de MH'yi körüklediği bilinmektedir (Morrow ve Fehler 2004). Ülkemizde yapılan bir çalışmada MH gözlenen tavuklarda oksidatif stresin artması sonucu DNA hasarının da arttığı belirlenmiştir (Keleş 2007). Bu doğrultuda aşılama, virüs salgınından sakınmak, tavukları stresten uzak tutmak, bağışıklık sistemini baskılayan diğer patojenlere karşı önlem almak ve MH'ye karşı genetik olarak dirençli olan hatların tavuk yetiştirme sistemlerine dahil edilmesi tavukçulukta MH'ye karşı korunma yolları olarak kullanılabilir (Meydan 2012).

2.5.1. Aşılama

Marek Hastalığı'na karşı genotipik duyarlılığın olduğu 1930'lu yıllarda tespit edilmiştir (Calnek ve Witter 1972). Hastalığın deneysel olarak şekillendirildiği 1960'lı yıllardan itibaren hastalık etkeninin patogenezi ve immünolojik özellikleri ortaya koyulmuştur. Yapılan bu çalışmalar sayesinde MH'ye karşı başarılı attenüe aşılar kullanılmaya başlanmıştır (Kato ve Hirai 1985). MH'den korunma yollarının başında aşılama gelmektedir. MH'ye karşı aşı yöntemini ilk olarak Churchill vd. (1969) geliştirmiştir. 1970'li yıllarda aşılama yönteminin yaygınlaşmasıyla hastalık kontrol altına alınmaya başlanmıştır. Aşılama uygulaması, embriyonel dönemin 18. gününde amniyotik sıvıya otomatik aşılama olarak ya da 1 günlük civcivlerin kas arası veya deri altına aşı uygulanması olarak yapılmaktadır (Meydan 2012).

Hayvan ölümleriyle sonuçlanan bir hastalık olan MH'nin mortalitesi değişkenlik gösterir, ancak hastalık ortaya çıktıktan sonra mortalite de kademeli olarak artış meydana gelmektedir. Ölüm oranı aşı uygulaması yapılmamış kümeslerde %25-30 düzeyinden %60'lara kadar çıkabilmekteyken, aşı uygulanmış kümeslerde bu oran %5'e kadar düşmektedir (Witter ve Schat 2003). MH'ye karşı yapılan aşılama tavuklarda enfeksiyonun şiddetini azaltarak tümör oluşumuna, virüslerin çoğalmasını azaltarak hastalığın yayılmasına engel olmaktadır. Ancak aşılama yapılsa bile, aşılanmış tavuklardaki MHV genetik yapısını değiştirmeye devam etmekte ve MHV çoğalması

(replikasyonu) sürmektedir. Aşılamadan sonra rekombinant virüs gelişimi olmaktadır. Genetik yapısını değiştiren virüsler aşılarla dayanıklı yeni hatların oluşmasına yol açmaktadır (Şekil 2.6). Oluşan genetik evrim sonucunda daha virulent hatların meydana gelmesi, yeni alternatif aşıların geliştirilmesini gerektirmektedir (Meydan 2012).



Şekil 2.6. Virüs yapısının MH aşılama süreci sonucunda evrim geçiren daha virulent hale gelmesi (Nair 2004) (*mMDV*-mild, *vMDV*-virulent, *vvMDV*-very virulent, *vv+MDV*-very virulent plus)

2.5.2. Genetik dirençlilik

Tavuklarda MH'ye karşı aşılamadan önceki mücadelede yetersiz kalması ve MHV'nin daha virulent hatlarının periyodik şekilde ortaya çıkması sebebiyle, 1990'lı yıllardan sonra bu hastalığa karşı genetik olarak dirençli hatların geliştirilmesi ve dayanıklılığa katkı sağlayan genlerin araştırılması çalışmalarına başlanmıştır. İlk olarak MHC'nin, MH'ye karşı dayanıklılıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca tüm tavuk genomuna QTL (Quantitative trait loci) taraması, transkript profili belirlenmesi ve virüs-konakçı arasında protein-protein etkileşiminin görüntülenmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların kullanılmasıyla, MH'ye karşı dayanıklılıkla ilişkili olan 14 QTL lokusu (Cheng vd. 2007) ve 4 adet gen saptanmıştır. Bulunan genlerin büyüme hormonu geni (*GHI*), stem cell antigen 2 geni (*SCA2* veya *LY6E*) (Liu vd. 2003), MHC class II β chain geni (*BLB* veya *CD74*) ve immunoglobulin-associated beta (*CD79B*) genleri olduğu bildirilmiştir (Meydan vd. 2011, Meydan 2012).

MH'ye karşı bir diğer yol, tavuğun genetik olarak barındırdığı direncini geliştirmektir. Direnç ve duyarlılık kantitatif kalıtım göstermekte olup hem çevre hem de

pek çok gen tarafından belirlenmektedir. Genetik olarak dayanıklı hatların oluşturulması MH'nin kontrolünde oldukça önem taşımaktadır. Hastalığa karşı dayanıklı hatların geliştirilmesinde genetik markerlerin kullanıldığı DNA temelli araştırma ve uygulamaların sayısı artmaktadır. MH'ye karşı genetik dirençlilikte birçok gen veya QTL lokusunun rol aldığı tahmin edilmektedir. MH'ye karşı dirençlilik ile ilgili olan genler, MHC genleri ve MHC olmayan (non-MHC) genler olarak iki grup altında incelenebilmektedir.

2.6. Major Histocompatibility Complex (MHC)

Major Histocompatibility Complex (MHC, Major Doku Uygunluk Kompleksi), bağışıklık sisteminin kendinden olan ve olmayan molekülleri tanıması için gerek duyduğu antijenleri kodlamada görevli büyük bir gen bölgesidir. MHC, bağışıklıkla ilgili ve bağışıklıkla ilgili olmayan fonksiyonları bulunan, doku uyumunda rol alan bir gen bölgesi olarak bildirilmiştir. (Gün 2007; Lenger 2011). MHC gen bölgesi, bağışıklıktan sorumlu çok sayıda geni içerdiği gibi immun yanıtla ilgisi belirlenmemiş bazı genleri de bulundurmaktadır (Snell 1981; Temiz 2005; Gün 2007; Lenger 2011).

2.6.1. Genel bilgiler

MHC proteinleri, ilk olarak doku ve organ nakli çalışmalarında temel antijenler olarak belirlenmiştir. Aynı veya farklı türler arasında yapılan organ veya doku nakillerinin reddedilebilir olduğu bildirilmiştir (Alberts vd. 2008; Lenger 2011). MHC hücre yüzey molekülleri hem yabancı antijenlerle hem de diğer immun hücreleriyle bağlantı halinde bulunmakta ve bu durum da tetikleyen antijene özgü özel bir immun tepkiye sebep olmaktadır. Doku uyum antijenleri olarak da isimlendirilen bu moleküllerin, immun yanıt oluşumunda immun sistem hücreleri arasındaki ilişkinin kurulmasında ve antijen sunulmasında önemli görevlerinin olduğu vurgulanmaktadır (Salomonsen vd. 2005; Ahmed vd. 2007; Lenger 2011).

MHC ilk olarak farelerde yapılan doku nakli çalışmaları sırasında belirlenmiş ve H-2 antijenleri olarak isimlendirilmiş olup daha sonra tavuklarda saptanmıştır (Lamont 1989; Alberts vd. 2008; Lenger 2011). MHC genleri, bütün omurgalılarda bulunmaktadır. MHC gen bölgesi her türde farklı kromozom üzerinde bulunabilmekte, MHC lokusunun içerdiği gen sayısı değişebilmekte ve genler farklı şekilde organize olabilmektedir. MHC genleri tarafından kodlanan moleküller, türlere göre farklı biçimde adlandırılmaktadır. MHC moleküllerinin isimleri insanda HLA, sığırdada BoLA, koyunda OLA, keçide GLA, atta ELA, köpekte DLA, kedide FLA olarak belirlenmiştir. Farklı olarak, farelerde H-2, ratlarda RT1 ve tavuklar için ise B terimleri bildirilmiştir (Arda vd. 1994; Diker 1998; Lenger 2011).

MHC proteinlerinin üç önemli özelliği bulunmaktadır. Birincisi, MHC proteinlerinin T hücre aracılı nakil tepkimelerinde en fazla öne çıkan antijenler olmalarıdır. İkinci olarak, T hücrelerinin büyük bir çoğunluğunun yabancı MHC

proteinlerini tanıyabilmeleridir. Üçüncü olarak da MHC proteinlerini kodlayan genlerden bazılarının, omurgalı canlılarda en fazla polimorfizmi göstermesidir (Alberts vd. 2008; Lenger 2011).

MHC'nin üç ana bölge içeren (sınıf I, II ve III) ve farklı fonksiyonlara sahip olan genel yapısı, memeli türleri arasında homoloji göstererek ortak nükleotid dizilimine sahip olacak şekilde korunduğu bildirilmiştir (Amills vd. 1998). Ancak, farklı memeli MHC'leri arasında bazı bölgelerin yüksek oranda gösterdiği homolojinin yanı sıra farklılıkların da olduğu belirlenmiştir (Lenger 2011). İnsanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda, bağışıklık hastalıklarının çoğunun MHC ile ilgisi olduğu düşünülmektedir. Belli hastalıkların belli allelleri taşıyan bireylerde daha sık görüldüğü vurgulanmaktadır. Hastalıklarla ilgisi olduğu bulunan alleller daha çok sınıf II genlerinde bulunmaktadır. İnsan MHC'siyle ilişkili hastalıklardan en önemlilerinin Romatoid Artrit ve İnsüline Bağımlı Diyabet Hastalığı olduğu bildirilmiştir (Dalva 2004).

2.6.2. Tavuklarda MHC sistemi

Tavuklarda (*Gallus domesticus*) kan gruplarıyla ilgili yapılan çalışmalarda, B kan grubu allellerinin bazı önemli özelliklerinin olduğu anlaşılmıştır (Aksoy vd. 1998; Lenger 2011). Landsteiner ve Miller (1924) araştırmalarında değişik tavuk eritrositlerinin farklı antijenik özelliklere sahip olduklarını keşfetmişlerdir. Tavuklarda MHC sistemi, başlangıçta kan doku çalışmalarında bir eritrosit antijeni olarak keşfedildiğinden dolayı B kompleksi olarak da adlandırılmaktadır (Lamont 1989; Lenger 2011). Yapılan çalışmalarda tavuklardaki B sisteminin doku uyuşumunu kontrol eden genlerle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Shiina vd. 2006; Lenger 2011). Bu doğrultuda MHC sistemi, tavuklarda B kan grubu haplotipleri ile belirlenebilmektedir. Tavuklarda B kompleksi sistemi ile ilgili moleküler çalışmalara 1988 yılında başlanmıştır (Guillemot vd. 1988). Tavuk MHC'si ile bağlantılı immun tepkinin genetik kontrolü de hücresel kaynaklı bağışıklık üzerine yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Lamont 1989; Lenger 2011).

Tavuklardaki MHC sistemi olan B kompleksi T lenfositlere karşı antijen sunan heterodimerik transmembran glikoproteinlerinden oluşmaktadır (Lenger 2011). Tavuklar, yaklaşık 92 kb uzunluğunda olan ve birbirine sıkı halde bağlı olan 19 gen içeren küçük bir MHC gen bölgesine sahiptir (Zekerias vd. 2002; Lenger 2011). Tavuk MHC genleri 16. kromozom üzerinde lokalize olmuştur (Lamont 1998; Lenger 2011). MHC bölgesinde protein kodlayan genler, T hücrelerine antijen sunumunda yer almaktadır. Bu yüzden bu bölgedeki genetik çeşitliği tanımlamak, patojen ve konak ilişkilerini anlamak açısından önem taşımaktadır. MHC genlerinin ürün miktarı aynı zamanda birincil immun sistemi organlarının gelişimini de etkilediği bildirilmiştir (Lamont 1998). Bu genlerin temelinde 3 MHC sınıfı (lokusu) bulunmaktadır. Bunlar, sınıf I veya B-F (memelilerdeki sınıf I ile benzerdir), sınıf II veya B-L (memelilerdeki sınıf II ile benzerdir) ve sınıf IV veya B-G (tavuklara özgüdür)'dir (Meydan 2012). Sınıf I (B-F) antijenleri, hemen hemen tüm hücrelerin üzerinde bulunmaktadır. Sınıf II (B-L) antijenleri, monositler,

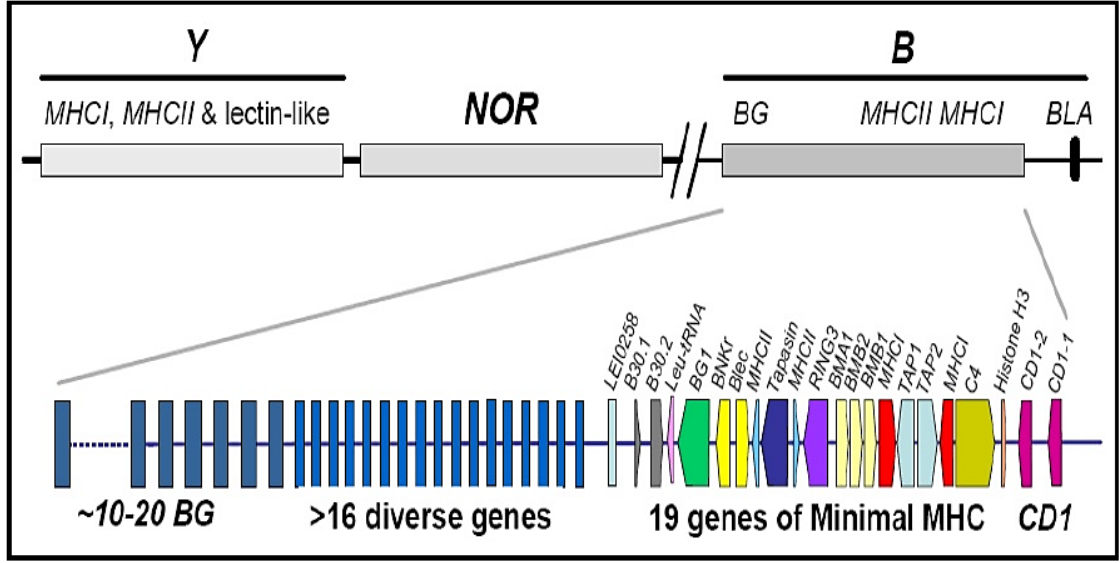
makrofajlar, B hücreleri ve T hücrelerinin bir kısmında bulunmaktadır (Lamont 1989; Emara vd. 2002; Zekerias vd. 2002; Shiina vd. 2006; Li vd. 2010; Lenger 2011). Sınıf IV (B-G) lokusu, kan gruplarının uygun tipini belirleyen eritrositlere eksprese olmaktadır.

2.6.3. Tavuk MHC sistemi molekül ve genleri

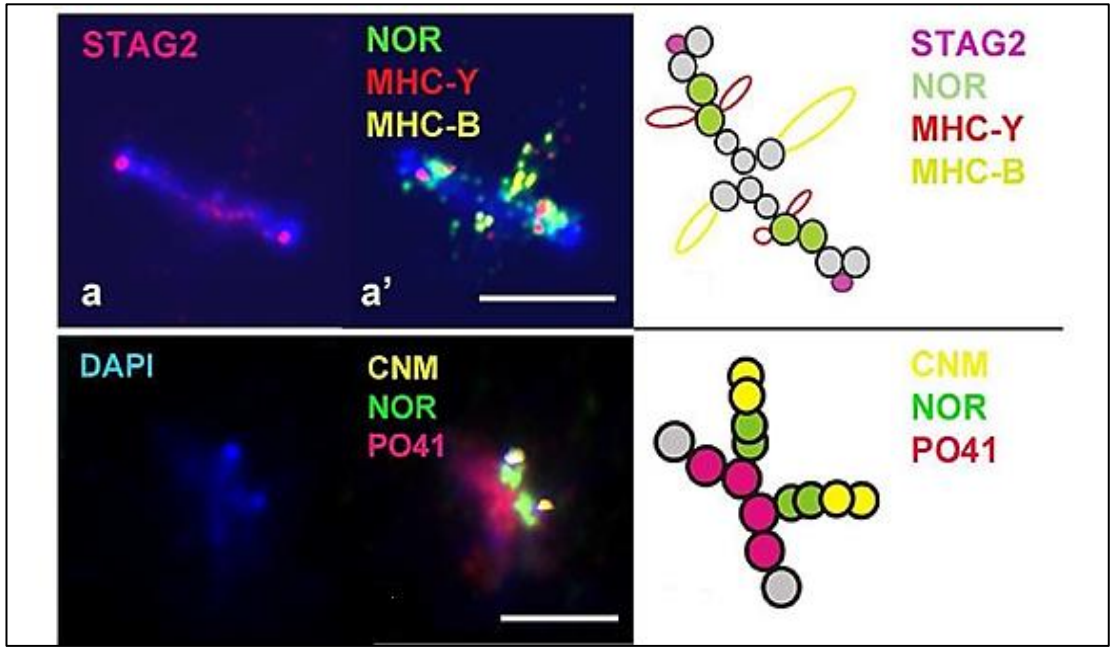
Sınıf I (B-F) ve Sınıf II (B-L) moleküllerini kodlayan tavuk MHC genleri, yapı ve fonksiyon bakımından memeli MHC genlerine çok benzemesine rağmen tavuk MHC yapılanmasında farklılıklar bulunmaktadır. MHC sınıf I ve sınıf II genleri yüksek derecede polimorfizm göstermektedir. Bireyler arasında aminoasit dizileri bakımından büyük farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıkların en önemli nedenlerini, nokta mutasyonları, gen konversiyonu ve karşılıklı rekombinasyon olayları oluşturmaktadır (Ahmed vd. 2007; Lenger 2011)

Tavuklarda sınıf I ve sınıf II genlerine benzer olarak MHC'nin genetik olarak bağımsız başka bir gen grubu olduğu da bildirilmiştir (Lenger 2011). Polimorfik özellikteki bu gen bölgesi, Rfp-Y (Restriction fragment polymorphism-Y) olarak adlandırılmaktadır. Tavuk MHC genleri, B ve Rfp-Y kompleksleri olarak iki bağımsız grup halinde bulunmaktadır (Shiina vd. 2006; Lenger 2011). Ayrıca, B ve Rfp-Y bölgelerinin arasında, yaklaşık 400 kısa tekrardan oluşan ribozomal RNA bölgelerini içeren NOR (Nucleolar Organizer Regions) bölgesi de bulunmaktadır. B ve Y genetik olarak bağlı olmamalarına rağmen B ve Y bölgelerinin her ikisi de aynı kromozomun iki farklı bölgesinde konumlanmaktadır. Rfp-Y sisteminin sınıf I ve sınıf II genleri hakkında az sayıda bilgi bulunmaktadır (Emara vd. 2002; Miller vd. 2004; Shiina vd. 2006; Lenger 2011). Rfp-Y bölgesinin MHV ve bir başka tavuk hastalığı olan RSV (Rous Sarkoma tümör virüsü)'ye direnç ile ilişkili olduğu bildirilmekle birlikte detaylı bilgi bulunmamaktadır (Shiina vd. 2006; Lenger 2011).

B kompleksi, memeli sınıf I ve sınıf II bölgelerine homolog olan B-F ve B-L bölgelerini ve ayrıca tavuklara özel olan sınıf IV gen bölgesini içermektedir (Emara vd. 2002; Zekerias vd. 2002; Lenger 2011). Ayrıca tavuklardaki B kompleksi genleri, memelilerden oldukça farklı şekilde organize olmuştur (Şekil 2.7). Farklı bölgelerde kümelenmeyen B-F ve B-L genleri, karışık halde B-F/B-L bölgesine buldukları belirlenmiştir (Diker 1998). Tavuk 16. kromozomu, mitotik metafaz evresinde FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) yöntemi kullanılarak haritalandırılmıştır. 16. kromozomun q kolunda B, Y ve NOR bölgelerinin konumlandığı saptanmıştır (Şekil 2.8) (Solinac vd. 2010).



Şekil 2.7. Tavuklarda MHC gen bölgesi (Miller 2005)



Şekil 2.8. MHC-B kompleksi, Y ve NOR bölgesinin kromozomun q kolundaki yeri a-a') sentromer bölgesi (NOR, yeşil- Y bölgesi, kırmızı- MHC-B kompleksi sarı) (Solinjac vd. 2010)

2.6.4. Tavuk MHC kompleksi ve B haplotiplerinin hastalıklarla ilişkisi

MHC üretiminin MHV'ye bağlı düzenlenmesini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Konak savunmasını yenmek için pek çok herpesvirüsün mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizmalar MHC sınıf I ve sınıf II proteinlerinin çalışmalarına engel olmaktadır (Hegde vd. 2003; Ambagala vd. 2005). Yapılan çalışmalarda herpes simplex virüsünün (HSV), endoplazmik retikulumda antijenik peptidin boşluğuna

bağlanarak MHC proteininin çalışma mekanizmasını engelleyerek, MHC sınıf I yüzey proteinlerinin üretimine engel olduğu bildirilmiştir (Früh vd. 1995; Hill vd. 1995). Başka bir alfaherpes virüsü Varicella zoster virüs (VZV), engelleyici bir protein içermeden, MHC sınıf I yüzey moleküllerinin yüzeye çıkmasını engelleyerek, üretimini bozduğu belirlenmiştir (Abendroth ve Arvin 2001). Diğer alfaherpesvirüslerden olan equine herpesvirus-1, bovine herpesvirus (BHV)-1 ve pseudorabies virüsün de TAP protein aktivitesini inhibe ederek MHC sınıf I yüzey molekül üretimini bozarak yüzeye çıkmasını engellediği bildirilmiştir. Beta herpesvirüsü olan insan cytomegalovirus, çok sayıda fazla içerdiği viral protein ile MHC sınıf I üretim ve taşınmasını birden fazla noktada bozduğu belirlenmiştir. Sonuçlar her bir durumda aynı olsa bile viral proteinler ve kullanılan mekanizmalar her virüse özgü olarak değişmektedir (Ambagala vd. 2005). MHV'ye bakıldığında, MHC sınıf I proteininin özellikle alfa zincirinin yüzeydeki üretimi engellenmektedir. Bu mekanizma ve viral proteinler tam olarak bilinmemesine rağmen toplam MHC sınıf I protein seviyeleri değişmediği saptanmıştır. Bu durumun da MHC proteinlerinin hücre içerisinde kalarak yüzeye çıkamamasına yol açtığı düşünülmektedir (Hunt vd. 2001)

Herpesviruslerin aynı zamanda MHC sınıf II proteinlerinin mekanizmasını da bozduğu belirlenmiştir (Hegde vd. 2003). VZV, insan cytomegalovirus (HCMV), fare cytomegalovirus ve büyük olasılıkla HSV1 virüsü, interferon tarafından başlatılan MHC sınıf II protein üretiminin düzenlenmesini, interferon yolundaki sinyal moleküllerini etkileyerek transkripsiyonel seviyede bastırdığı bildirilmiştir (Miller vd. 1998; Abendroth vd. 2000). Herpesvirusların MHC sınıf II üretimini translasyon sonrasında da bozabildiği belirlenmiştir. MHC sınıf II proteininin hücre içerisindeki hareketini etkileyerek engel olmaktadır. Örneğin, HSV-1 ICP34.5 viral proteininin, MHC sınıf II proteininin hücre yüzeyine çıkmasını engellerken, hücre içerisindeki üretim aşamasına engel olmadığı bildirilmiştir (Trgovcich vd. 2002). MHC sınıf II proteinlerinin engellenmesinin sebeplerinden birisi olan viral proteinler, herpesvirusun cinsine özgüdür ve kendilerine ait mekanizmaları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda MHC sınıf I proteinlerinde olduğu gibi MHC sınıf II proteinlerinin de enfekte olmuş hücrelerde hücre yüzeyine çıkamamaktadır.

Tüm bu herpesvirüslerden farklı olarak MHV, enfekte tavukların merkezi sinir sisteminde, endotel hücrelerde ve damardan dışarı çıkan hücrelerde (makrofaj ve T hücrelerinde) MHC sınıf II üretimini tetiklediği bildirilmiştir (Gimeno vd. 2001).

MHC sistemi (B kompleksi) ve hastalık bağlantısı, laboratuvar üretimi tavuklarda ve ticari tavuk hatlarında yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Hansen vd. 1967; Bacon vd. 1981). Tavuklarda MHC tiplerini tespit etmek yararlı bir konu haline gelmiştir. Tavuk MHC'si farklı haplotiplerdeki tavuklara aşı uygulaması yapılarak saptanmıştır. MHC haplotip isimlendirmesi, serolojik ajanlar kullanılarak reaksiyon veren maddeler standardize edilmiş ve ulusal dil haline getirilmiştir (Briles 1982).

Tavuk MHC sisteminin, bazı enfeksiyöz patojenlere karşı direnci belirlediği yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Miller vd. 2004; Shiina vd. 2006; Lenger 2011). Tavuklarda B kan grubu haplotipleri bakımından seçilen bazı tavuk soy ve hatları arasında, hastalıklara karşı direnç ile ilgili farklılıkların olduğu ilk kez Hansen ve ekibi tarafından belirlenmiştir (Hansen vd. 1967). Bazı hastalıklara karşı dirençli ya da duyarlı olan aile, soy veya hatlar mevcuttur. Houghton Rhode Island Red ırkı MH'ye karşı duyarlı iken, lenfoid löykozis hastalığına karşı ise dirençli olduğu, Houghton Light Sussex ırkının da eimeria türlerine karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Cornel K hattı tavukların Avian Löykozis hastalığına (ALV) (Aksoy 1999; Lenger 2011), Leghorn ırkı yumurtacı tavukların ise *Salmonella gallinarum* infeksiyonlarına dirençli oldukları belirlenmiştir (Arda vd. 1994; Lenger 2011).

Tavuk MHC genlerinin; viral, bakteriyel, paraziter ve otoimmün hastalıklara direnç ve duyarlılıkla ilişkili bir gen kompleksi olduğu vurgulanmaktadır (Lamont 1989; Ahmed vd. 2007; Li vd. 2010; Lenger 2011). Marek Hastalığı (MH), Avian löykozis virüs (ALV), Rous Sarkoma tümör virüsü (RSV), enfeksiyöz bursal hastalık virüsü (IBDV), *Pasteurella multocida*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, kanatlı kolerası, koksidiyoz gibi çok sayıda patojenlerin sebep olduğu hastalıklara; tiroitidis ve vitiligo gibi otoimmün hastalıklara karşı hastalık direnci veya duyarlılık gelişmesi ile MHC arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Fulton vd. 2006; Shiina vd. 2006; Lenger 2011) (Şekil 2.9).

B HAPLOTİPİ	HASTALIK	HASTALIK İLE İLİŞKİSİ
B23	MAREK HASTALIĞI	DUYARLILIK
B21	MAREK HASTALIĞI	YÜKSEK DİRENÇ
	KUŞ GRİBİ	NORMAL DİRENÇ
	AVIAN LÖKOSİZ	ZAYIF DİRENÇ
B19	MAREK HASTALIĞI	DUYARLILIK
	AVIAN LÖKOSİZ	YÜKSEK DUYARLILIK
B18	SALMONELLA	DUYARLILIK
B17	MAREK HASTALIĞI	ZAYIF DİRENÇ
B15	MAREK HASTALIĞI	DUYARLILIK
	AVIAN LÖKOSİZ	ZAYIF DİRENÇ
	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	DUYARLILIK
	SALMONELLA	DUYARLILIK
B13	MAREK HASTALIĞI	DUYARLILIK
	KUŞ GRİBİ	DUYARLILIK
	AVIAN LÖKOSİZ	ZAYIF DİRENÇ
	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	ZAYIF DİRENÇ
B12	AVIAN LÖKOSİZ	YÜKSEK DİRENÇ
	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	TÜMÖR BÜYÜMESİNİ BASTIRICI
B6	MAREK HASTALIĞI	NORMAL DİRENÇ
	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	TÜMÖR GERİLEMESİ İLE İLİŞKİLİ
B5	MAREK HASTALIĞI	DUYARLILIK
	AVIAN LÖKOSİZ	ZAYIF DİRENÇ
	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	DUYARLILIK
B3	MAREK HASTALIĞI	DUYARLILIK
B2	MAREK HASTALIĞI	NORMAL DİRENÇ
	AVIAN LÖKOSİZ	DUYARLILIK
	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	DUYARLILIK
B1	ROUS SARKOMA HASTALIĞI	TÜMÖR BÜYÜMESİNİ ARTIRICI
	SALMONELLA	YÜKSEK ÖLÜM ORANI

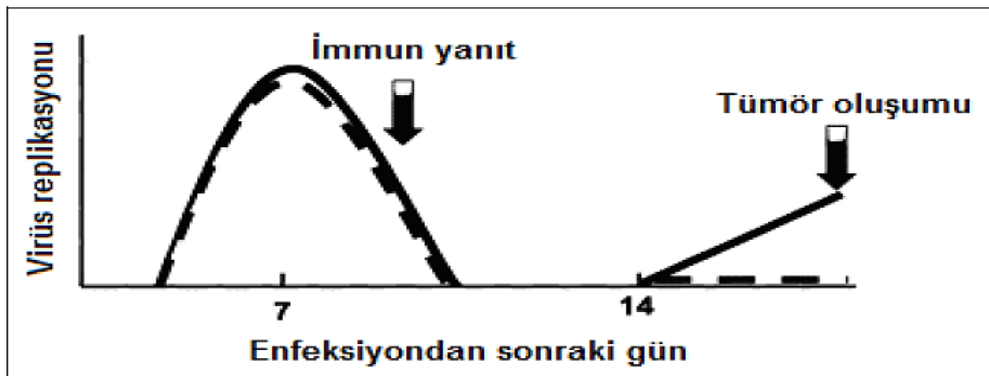
Şekil 2.9. B haplotiplerinin tavuk hastalıklarıyla ilişkisi (Wang vd. 2014)

Tavuk MHC genlerinin, MH'ye direnç veya duyarlılıkla ilişkili olduğu yapılan birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur (Lamont 1989; Emara vd. 2002; Miller 2005). Tavuklardaki MHC allelleri de tavuk MHC sistemi olan B kompleksini yani B haplotiplerini belirlemektedir. Dalgaard ve ekibi tarafından yapılan çalışmada, B kan grubu dikkate alınmadan MH'ye karşı dirençli bireyler seçilmiş ve sonuçta sürüde B₂₁ haplotipine sahip bireylerin hızla arttığı saptanmıştır (Dalgaard vd. 2003). Tavuklarda B₂, B₆, B₁₃, B₁₄ ve B₂₁ haplotiplerinin MH'ye direnç ile; B₁, B₃, B₁₃, B₁₅, B₁₉ ve B₂₇ haplotiplerinin duyarlılık ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Shiina vd. 2006). Özellikle B₁₉ haplotipinin MH'ye duyarlılığa, B₂₁ haplotipinin ise yüksek dirence neden olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.10).

B HAPLOTİPİ	MAREK HASTALIĞI İLİŞKİSİ
B21	YÜKSEK DİRENÇ
B2	ORTA DİRENÇ
B6	ORTA DİRENÇ
B14	ORTA DİRENÇ
B1	DUYARLILIK
B3	DUYARLILIK
B5	DUYARLILIK
B13	DUYARLILIK
B15	DUYARLILIK
B27	DUYARLILIK
B19	YÜKSEK DUYARLILIK

Şekil 2.10. B haplotipleri ve Marek Hastalığı ilişkisi (Shiina vd. 2006)

Bazı B haplotiplerinin aşı ile daha iyi koruma sağlamasından dolayı, B haplotiplerinin aşı ile elde edilen bağışıklığı da etkilediği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bütün bu etkenlere karşın B haplotipinin etkisinin, tavuğun genetik yapısına bağlı olduğu bildirilmektedir (Cheng 2003; Meydan 2012). MHV'ye dayanıklı ve duyarlı tavuk hatlarındaki virüs çoğalması 14. güne kadar aynı olmasına rağmen 14.günden sonraki virüs çoğalması ve tümör oluşumunda farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Schat ve Xing 2000) (Şekil 2.11).



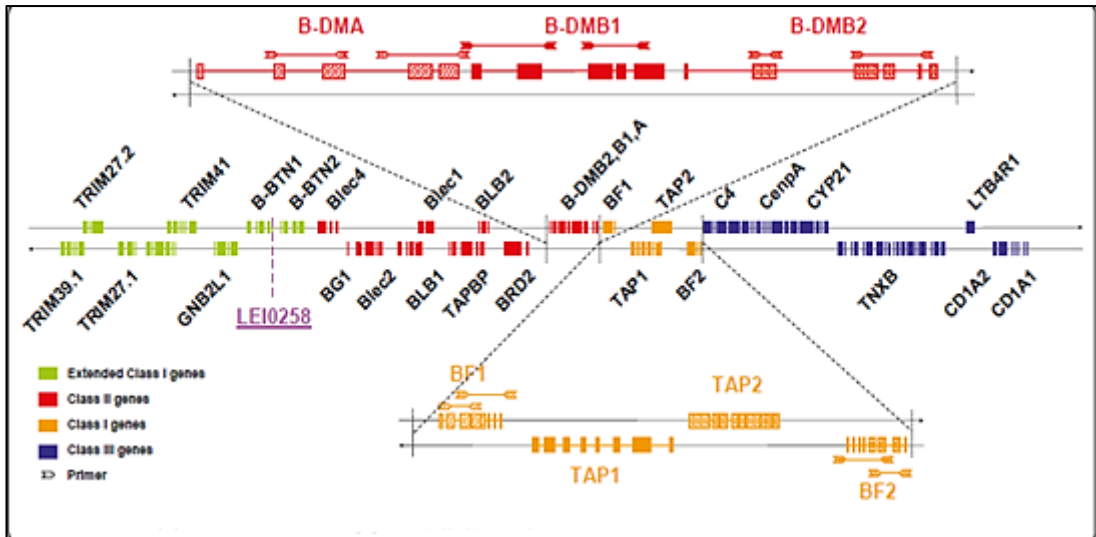
Şekil 2.11. MHC yapısına göre dirençli ve duyarlı tavuk hatlarında MHV'nin durumu (- - - -dirençli hat , — duyarlı hat) (Schat ve Xing 2000)

Hastalıklara karşı direnç oluşturmada rol alan mekanizma vardır ve MHC tarafından üstlenilen genetik kontrollerde farklılıklar mevcuttur. Bu durum, MHC olmayan genlerin de hastalık direncinde önemli rolü olduğunu göstermektedir.

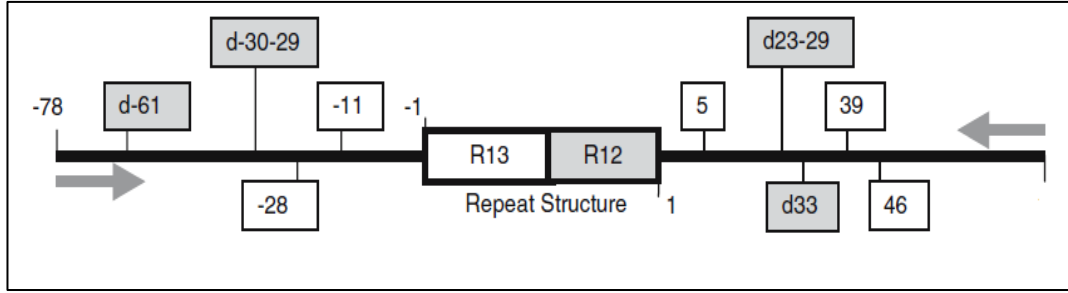
2.6.5. LEI0258 lokusu

MHC genleriyle bağlantılı olan birçok mikrosatelit lokus tespit edilmiştir (Emara vd. 2002; Fulton vd. 2006; Chazara vd. 2011; Han vd. 2013; Gao vd. 2015; Fulton vd. 2016). MHC bölgesinin içerisine lokaliz olmuş mikrosatelit lokusların, hastalıklara karşı dayanıklılıkta rol oynadığı yapılan birçok araştırma ile bildirilmiştir. McElroy vd. (2005) yaptıkları çalışmada 81 adet mikrosatelit lokusu incelemiş ve bunlardan 17 tanesinin MH ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Gao vd. (2015) 4 adet mikrosatelit lokusun (LEI0258, MCW0371, MCW0312, MHC-D) MH'ye karşı dirençlilik veya duyarlılık ile alakalı olduğunu belirlemiştir.

Fulton vd. (2006, 2016)'nin yaptıkları çalışmalara göre en önemli lokus LEI0258 mikrosatelit lokusudur ve MHC genlerinin arasında konumlanmıştır. LEI0258 mikrosatelit lokusu 16. kromozomda bulunmaktadır (McConnell vd. 1999). Bu lokus, tavuk MHC sisteminin de bulunduğu B bölgesinin tam ortasında, BG1 genine yakın şekilde konumlanmıştır (Şekil 2.12). LEI0258 lokusu, 2 adet tekrarlanan bölge içermektedir. Bu tekrar bölgelerinden birincisi 13 bç. uzunluğundadır (R13; CTATGTCTTCTTT) ve bu bölge 1 ila 28 kez arasında tekrar edebilmektedir. İkinci tekrar bölgesi ise 12 bç. uzunluğunda (R12; CTTTCCTTCTTT) olup, 2 ila 20 kez arasında tekrar edebilmektedir. Bu tekrar bölgelerine ilave olarak birçok SNP, insersiyon ve delesyon bölgeleri de içermektedir (Şekil 2.13). Bu iki bölgenin tekrar sayısına göre allel büyüklüğünün 182-552 bç. arasında değişebildiği bildirilmiştir (Fulton vd. 2006).



Şekil 2.12. LEI0258 lokusunun tavuk genomundaki yeri



Şekil 2.13. LEI0258 lokusunun tekrar bölgeleri (Fulton vd. 2006)

Birden fazla kıta ve tür popülasyonlarından alınan örneklerde, LEI0258 gen bölgesi ile ilgili alleller bulunmuştur. MHC sistemi ile ilgili yapılan pek çok çalışmada bu bölge, dünyanın değişik bölgelerinde yetiştirilen tavuk hatlarında çok yüksek genetik çeşitlik göstermiştir ve elde edilen çeşitli haplotiplerde 35'den fazla alleli olduğu tespit edilmiştir (Chazara vd. 2013). Bu bölge, tavuk MHC-B bölgesini tanımlamada ve aynı zamanda MHC haplotiplerinin kategorizasyonunda kullanılmaktadır. LEI0258 gen bölgesindeki 12-13 tekrarları, SNP ve küçük baz ekleme-çıkarmalarının çeşitliliği sağladığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda LEI0258 mikrosatelit lokusuna ait 26 farklı allel büyüklüğü tespit edilmiştir (Fulton vd. 2016).

LEI0258 bölgesi içerdiği allel sayısı çok fazladır ve allel boyutlarında çok çeşitlilik bulunmaktadır. Bu büyük allelik farklılıklar, maliyeti az olan elektroforetik boyut ayırma yöntemleriyle kolaylıkla ayırt edilerek MHC haplotip belirteci olarak kullanılmaktadır. LEI0258 mikrosatelit lokusunun en önemli avantajı, tavuğun sahip olduğu B haplotipini belirleyebilmesidir. Örneğin, LEI0258 lokusunun 357 bç.'lik allelinin B₂₁ haplotipine, 539 bç. ve 552 bç.'lik allellerinin ise sadece B₁₉ haplotipine özgü olduğu tespit edilmiştir (Fulton vd. 2006). Dolayısıyla LEI0258 mikrosatelit lokusu kullanılarak tavuğun sahip olduğu MHC genleri bakımından MH'ye karşı dirençli veya duyarlı olduğu tahmin edilebilmektedir. En iyi tanımlanmış haplotip 357 bç. uzunluğundaki B₂₁ haplotipidir. B₂₁ haplotipinin MHV'ye karşı yüksek oranda dirençli olduğu bildirilmektedir (Hansen vd. 1967; Briles vd. 1977; Bacon vd. 1981).

Yapılan çalışmalarda LEI0258 ve MCW0371 lokuslarının tavuklardaki MHC haplotiplerini belirlemede kullanışlı olduğu bildirilmiştir ve bu sayede pek çok özgün allel tanımlanabilmektedir. MCW0371 gen bölgesi, LEI0258 gen bölgesinin 10.560 bç. aşağısında yer almaktadır. MHC genlerine olan fiziksel yakınlıklarından dolayı bu gen bölgeleri, MHC haplotipinin genetik belirteçleri olarak araştırılmaktadır. Akrabalı yetiştirilen tür örnekleri ile ticari hatlar arasında yapılan araştırmaya göre LEI0258 lokusunun sadece allel boyutu ile B haplotiplerinin belirlenmesinde ve pek çoğunun ayırt edilmesinde yeterli olduğu bildirilmiştir. Örneğin, LEI0258 lokusu bakımından B₂ ve B₁₅ haplotiplerinin allel boyutlarının aynı ve 261 bç. uzunlukta olduğu belirlenmiştir. Ancak allel boyutları aynı olan haplotipler, farklı lokuslarda farklı boyutlarda olabilmektedir. LEI0258 lokusunda aynı uzunluğa sahip olan B₂ ve B₁₅ haplotipleri, MCW0371

lokusunda farklılık göstermiş, B₂ haplotipinin 206 bç., B₁₅ haplotipinin ise 203 bç. uzunluğunda olduğu belirlenmiştir (Fulton vd. 2006).

Serolojik olarak farklı ancak LEI0258 lokusu allel büyüklüğü aynı ve 205 bç. uzunlukta olan B₁₃ ile B₁₇ allelleri arasında 1 tane SNP farkı bulunmuştur. Yine bu iki allel MCW0371 lokusunda farklı uzunluklar göstermekte olup B₁₃ haplotipi 202 bç., B₁₇ haplotipi ise 205 bç. uzunluktadır. LEI0258 lokusunda büyüklükleri birbirinin aynısı olan çeşitli haplotipler, MCW0371 lokusundaki polimorfizmlere bakılarak ayırt edilebilmektedir. Farklı türdeki allellerin pek çok tavukta görülmesi, allelin türe özgü olmadığını göstermektedir. Ayrıca aynı allel büyüklüğü, aynı MHC haplotipi ile ilgili olmayabilmektedir (Fulton vd. 2006).

Başka bir çalışmada, ticari tavuk hatlarının LEI0258 bölgesi çeşitliliğinin, gezen tavuklara göre daha az olduğu belirlenmiştir. Serbest dolaşan-doğal ortam türlerinin, ticari türlere göre parazit ve hastalık tiplerine yakalanma riskinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Belirli bir alanda üretilen ticari tavuk hatlarının bilinen sınırlı özellikleri bulunmaktadır. Serbest dolaşan türlerin ise MHC genlerinde daha fazla çeşitlilik olabileceği bildirilmiştir (İzadi vd. 2011). İran'da Horasan tavuk ırkına ait örneklerle yapılan çalışmada LEI0258 mikrosatelit lokusuna kullanılarak 25 farklı büyüklükte allel bulunmuştur. En yüksek frekans 360 bç. uzunluğuna sahip allellerde ve en düşük frekans ise 207 ile 262 bç. uzunluğundaki allellerde saptanmıştır (Nikbakht ve Esmailnejad 2015). Hindistan'da 2 yerel tavuk ve 3 saf tavuk ırkına ait örneklerle LEI0258 mikrosatelit lokusu kullanılarak yapılan çalışmada 22 farklı allel büyüklüğü saptanmıştır. Bu allelik farklılık 182-552 bç. uzunluğu arasında değişmektedir. Hint yerel tavuk ırklarının, saf populasyonlara kıyasla daha fazla allel bulundurduğu bildirilmiştir (Kannaki vd. 2016).

LEI0258 mikrosatelit lokusunun kullanıldığı diğer bazı araştırmalarda, Vietnam tavuk ırkında 24 farklı allel büyüklüğü, Tanzania tavuk ırkında 23 farklı allel büyüklüğü, Tayvan tavuk ırkında 16 farklı allel büyüklüğü ve Brezilya tavuk ırkında 15 farklı allel büyüklüğü tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda ortak özellik olarak yerel ırkların, ticari ırklara kıyasla daha yüksek sayıda allel büyüklüğüne sahip olduğu söylenebilir (Lima-Rosa vd. 2005; Schou vd. 2007; Lwelamira vd. 2008; Owen vd. 2009; İzadi vd. 2011).

2.6.6. Major Histocompatibility Complex olmayan genler (non-MHC)

B haplotipi aynı olan dirençli tavuk hatları (hat 6) ve duyarlı tavuk hatlarının (hat 7) MH'ye karşı dirençlerinin farklı olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı MHC olmayan (non-MHC) genlerin de MH'ye karşı direnç ile ilişkili olduğu kanısına varılmıştır. Yapılan çalışmalarda genetik markerler kullanılarak 14 adet QTL lokusunun (7 önemli ve 7 önerilen) MH'ye karşı dirençle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cheng vd. 2007, Meydan 2012).

QTL lokuslarının yanı sıra başka bazı genlerin de MH'ye karşı direnç katkı sağladığı belirlenmiştir. İlk olarak tavuklarda 1. kromozom üzerinde lokalize olan

büyüme hormonu geninin (*GHI*) MH'ye karşı dirençle ilgili olduğu tespit edilmiş olan QTL lokusları ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmada bu genin, ticari White Leghorn tavuklarında tümörlü dokuların oluşumuyla ilgisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca GH1 proteininin, hastalık etkeni MHV ırklarındaki SORF2 proteini ile etkileşime girdiği belirlenmiştir. Daha sonraki araştırmalarda 2. kromozom üzerinde konumlanmış olan stem cell antigen 2 geni (*SCA2* veya *LY6E*)'nin tavuklarda MHV enfeksiyonundan sonra tümörlerin oluşma oranı ve tümörlerin hayatta kalabilme özellikleriyle ilgili olduğu bildirilmiştir (Liu vd. 2003). Yapılan son çalışmalarda ise immunoglobulin-associated beta geninin (*CD79B*)'nin MHV enfeksiyonundan sonraki özelliklerle 4. ve 15. günlerinde DNA ekspresyonunda değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Meydan vd. 2011; Meydan 2012).

2.7. Mikrosatelit Markerler

Genetik varyasyonların belirlenmesinde günümüze kadar pek çok moleküler yöntem (RAPD, AFLP, Mikrosatelit, SNP vb.) geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Ancak son zamanlarda en sık kullanılan yöntemlerden ikisi Mikrosatelitler ve SNP'lerdir (Karlı vd. 2013). Mikrosatelitler, ilk olarak 1989 yılında insan genomunda tek bir lokusun amplifikasyonundan sorumlu olan DNA dizisine komşu olarak bulunan, dinükleotid tekrar dizileri olarak bildirilmiştir (Weber ve May 1989). Tekrarlayan DNA biçimlerinden en sık görüleni mikrosatelitlerdir ve genel yapıları (CA)*n*'dir (Passarge 1995). Tekrarlayan bu nükleotid dizileri, kromozomal sentromeri çevreledikleri için 'satellit (uydu)' adını almaktadır (Butler 2005). Mikrosatelitler, basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats, SSR) ya da kısa art arda tekrarlar (Short Tandem Repeats, STR) şeklinde de isimlendirilirler (Bruford ve Wayne 1993; Butler 2005).

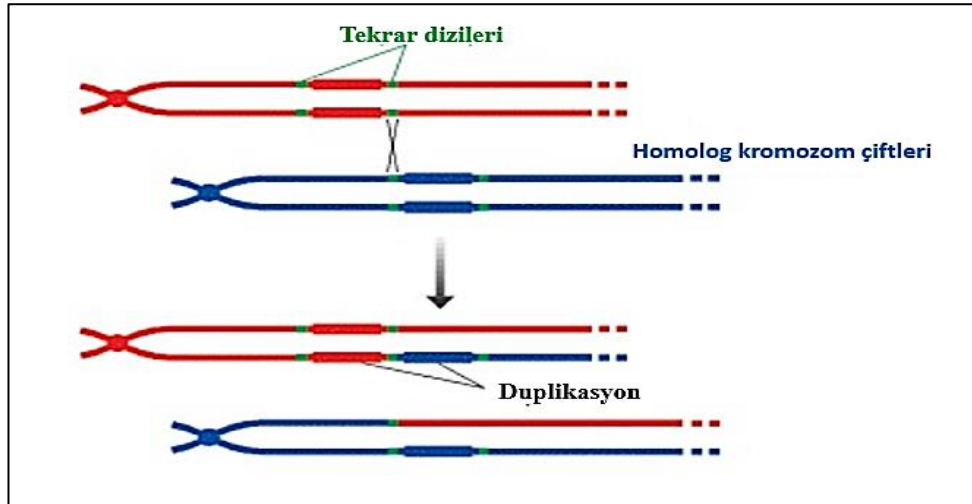
Mikrosatelitler, ökaryotik genom boyunca kodlanan ve kodlanmayan bölgelere yaygın olarak dağılmış halde bulunan, 1 ila 6 nükleotid uzunluğundaki kısa tekrarlardan oluşan DNA parçaları olarak bildirilmiştir (Arif ve Khan 2009; Teneva 2009). Mikrosatelit markerler, yaygın olarak -di, tri nükleotidlik tekrarlardan oluşabildiği gibi farklı formlar halinde de bulunabildikleri bildirilmiştir (Bruford vd. 2003). Motiflerin sayısı, bir populasyonun bireyleri hatta homolog kromozomlar arasında dahi farklılıklar gösterebilmektedir. Mikrosatelit markerlerin genom içerisinde çok sayıda olması, polimorfizm oranının yüksek olması, kodominant kalıtım göstermesi, tekrarlanma sıklığının yüksek olması gibi özelliklerinden dolayı populasyonlardaki genetik varyasyonun gösterilmesinde tercih edilmektedir (Hillel vd. 2003). Günümüzde tüm dünyada çiftlik hayvanları, evcil ve yabani hayvan populasyonlarında genetik varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında mikrosatelit markerlerin yoğun şekilde kullanıldığı bildirilmektedir (Tadano vd. 2014).

Çiftlik hayvanlarında genetik varyasyonun gösterilmesi çalışmalarının yanında genom bağlantı haritalarının oluşturulmasında ve kantitatif özellik lokuslarının (QTL) belirlenmesinde mikrosatelit markerler, SNP'ler ile birlikte yaygın olarak

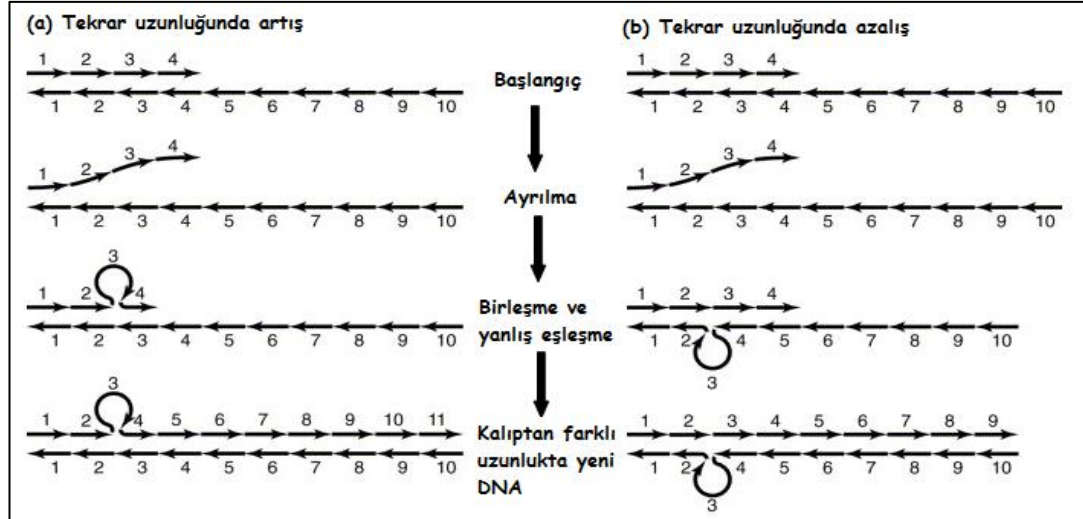
kullanılmaktadır. QTL belirlenmesi ve aday gen yaklaşımı ile bu lokusların Marker Destekli Seleksiyon (MAS) programlarında kullanılması biyoteknolojik gelişmelere önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu doğrultuda, tavuklarda mikrosatelit markerler kullanılarak yapılan QTL araştırmaları sonucunda bazı mikrosatelit lokusların Marek Hastalığı, Newcastle ve Koksidiyoz hastalıklarına dayanıklılık ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Izadi vd. 2011; Wang vd. 2014).

Mikrosatelitler genomun %3'nü oluşturan tekrar birimleridir. Tekrar birimlerinin sağındaki ve solundaki bölgelere flanking bölgesi denilmektedir. Mikrosatelit polimorfizmini belirlemek için tekrar bölgesinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle çoğaltılmasında flanking bölgesinin bilinmesi ve bu bölgelere uygun primer sentezlenmesi gerektiği bilinmektedir (Schlotterer ve Harr 2001; Klug vd. 2011).

Yüksek oranda polimorfik olan mikrosatelitlerin polimorfizminin temelini, tekrar sayılarındaki farklılıklar oluşturmaktadır. Bu polimorfik farklılıklar mikrosatelit bölgelerinde oluşan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Tüm genomda olduğu gibi mikrosatelit lokuslarda da mutasyona sebep olan birçok faktör bulunmaktadır. İki önemli mekanizmanın mikrosatelit lokuslarda mutasyon oluşumuna daha çok neden olduğu belirlenmiştir. Bunlardan ilki krossing-over sırasında eşit olmayan parça değişimi sonucu oluşan yeni kombinasyonlar (Unequal Crossing Over, UCA) (Şekil 2.14), ikincisi ise replikasyon sırasındaki DNA eksen kayması ya da diğer ismi ile replikasyon kayması durumudur (Şekil 2.15). Mikrosatelit mutasyonlarının oluşmasında replikasyon kayması mekanizmasının eşit olmayan parça değişimine göre daha etkili olduğu bildirilmektedir (Schlotterer ve Harr 2001; Joukhadar ve Jighly 2012).

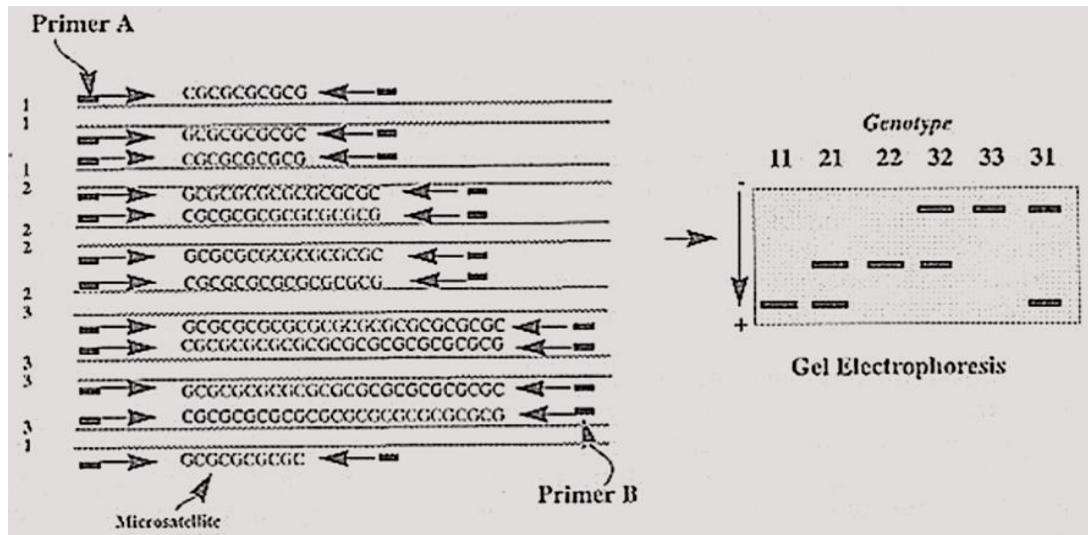


Şekil 2.14. Krossing-over'da eşit olmayan parça değişimi (Anonim 2)

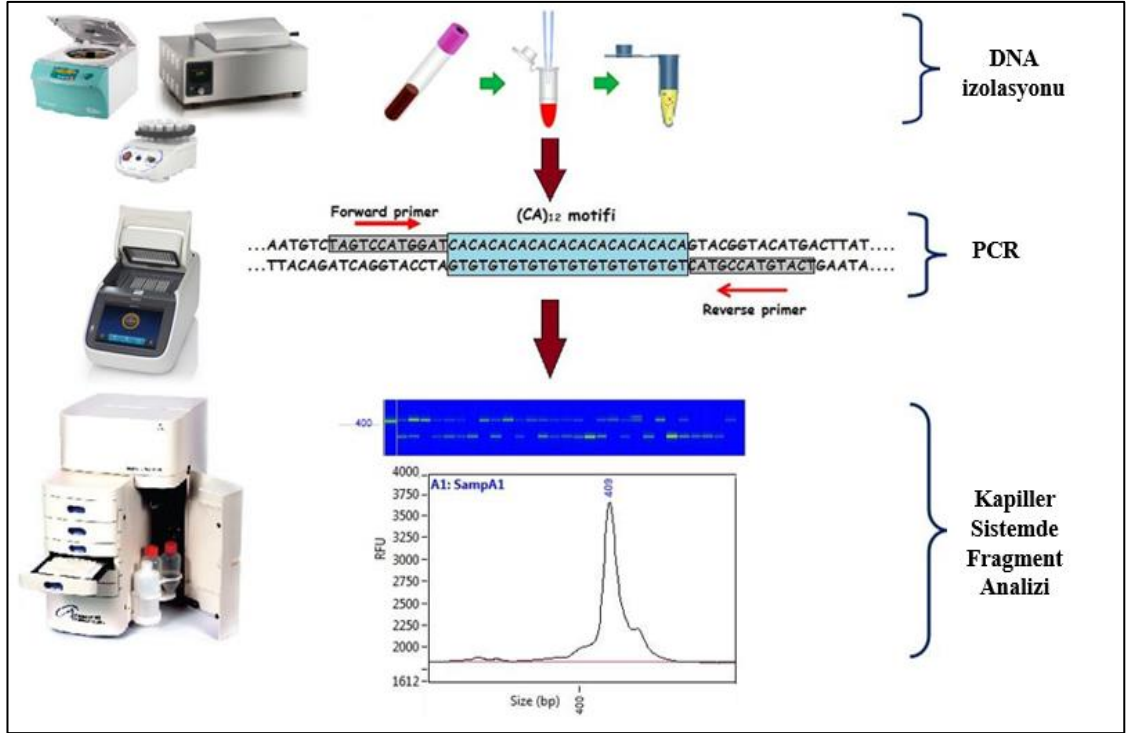


Şekil 2.15. Replikasyon kayması sonucu oluşan mikrosatelit mutasyonları (Ellegren 2000)

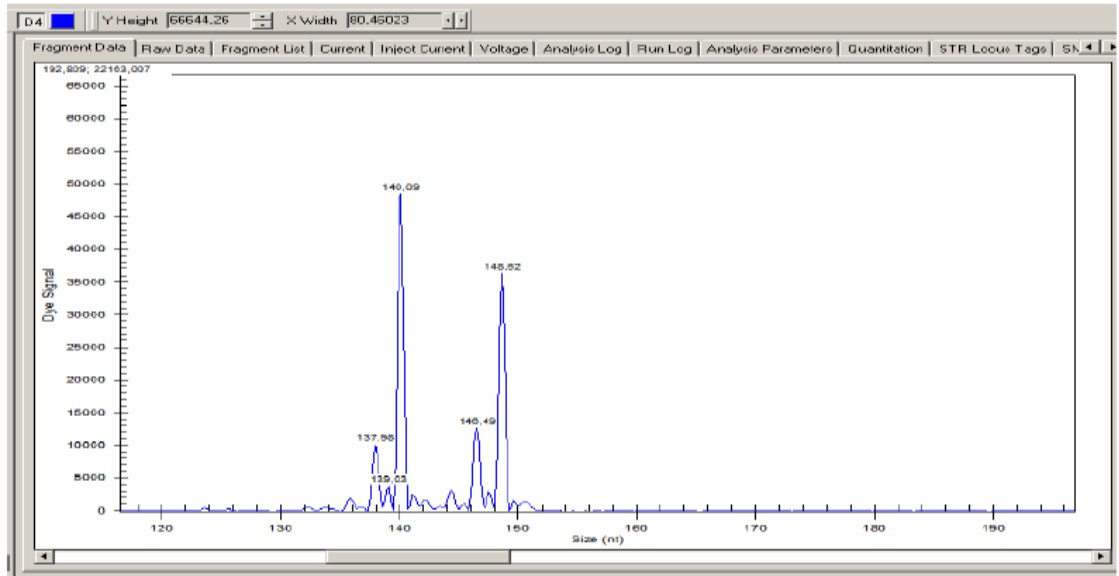
Genom içerisinde konumlanmış mikrosatelit lokuslar, oligonükleotid primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi aracılığıyla amplifiye edilebilmektedir. Elde edilen PCR ürünleri, elektroforez yöntemi ile görüntülenebilmektedir. İki bant veren ürünler heterozigot, tek bant veren ürünler homozigot olarak belirlenmektedir (Fatima 2006) (Şekil 2.16). Mikrosatelitler jel elektroforezinde görüntülenebildikleri gibi, otomatik dizi analiz cihazlarından fragment analizi yapılarak bilgisayar sisteminde özel analiz programları kullanılarak, uzunluğu bilinen standart örnekler yardımıyla da analiz edilebilmektedir. Kapiller elektroforez sisteminin kullanıldığı bu teknikte, allel uzunluklarını gösteren piklerin olduğu sonuçlar elde edilebilmektedir (Şekil 2.17 ve 2.18).



Şekil 2.16. Mikrosatelit lokusların belirlenmesinin şematik gösterimi



Şekil 2.17. Mikrosatelit DNA marker yöntemi (Karşlı 2015)



Şekil 2.18. Kapiller elektroforez sisteminde allel uzunluklarının belirlenmesi

Mikrosatelit markerler çeşitli kanatlı çalışmalarında da kullanılmıştır. Türkiye yerli tavuk ırklarında (Denizli ve Gerze) genetik çeşitliliğin belirlenmesi için moleküler markerlerin kullanıldığı çalışmalar oldukça az sayıdadır. Kaya (2008) tarafından Denizli ve Gerze populasyonlarına ait tavuk genotipleri, 10 mikrosatelit marker kullanılarak genetik çeşitlilikleri incelenmiştir. Yine Türkiye ticari tavuk hatlarındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde mikrosatelit markerlerin kullanıldığı az sayıda çalışma

bulunmaktadır. Karlı (2015) tarafından Türkiye'deki ticari tavuk hatlarına ait altı saf tavuk popülasyonunun genetik çeşitliliği, 22 mikrosatelit marker kullanılarak belirlenmiştir.

Mikrosatelit markerlerin diğer marker yöntemlerinden ayıran bazı önemli üstün özellikleri ve kullanım alanları kısaca şöyle sıralanabilir;

- 1.Çok düşük miktarlarda DNA örneği yöntemin uygulanmasında yeterli olmaktadır.
- 2.Ko-dominant marker olan mikrosatelitler sayesinde homozigot veya heterozigot bireyler tespit edilebilmektedir. Diğer dominant marker özelliğinde olan RAPD ya da AFLP gibi yöntemlere kıyasla bu özellik bakımından avantajı bulunmaktadır.
- 3.Yüksek derecede polimorfik özelliktedir. En yakın türler, popülasyonlar arasında ya da akrabalı yetiştirilmiş popülasyonlar içinde dahi genetik varyasyon saptanabilmektedir.
- 4.Tekrarlanabilirliği çok yüksek olan bu yöntemin, RAPD ve AFLP gibi marker yöntemlerinin aksine her denemede farklı sonuçlar göstermemektedir ve bu durum da yöntemin güvenilirliğinin artmasını sağlamaktadır.
- 5.Genom içerisinde çok sayıda dağılmış olan, çeşitli verimlerle ilgili olan kantitatif karakter lokuslarının (QTL) belirlenmesinde ve belirlenen bu lokusların aday gen yaklaşımı ile marker destekli seleksiyon (MAS) kullanılmasına olanak sağlamaktadır.
- 6.Farklı jel koşullarında uygulanabilir olmakla birlikte kapiller sistemlerle otomasyona da uygun kullanımı bulunmaktadır. Multipleks PCR ya da tek tek yapılan PCR ürünlerinin kapiller sistemde birleştirilerek multipleks fragment analizi sayesinde iş gücü ve maliyetten tasarruf edilebilmektedir.
- 7.Genetik haritalama hastalık ve verim özelliklerini kontrol eden kromozom ve genom bölgelerinin tanımlanmasında, ebeveyn tayini ile pedigrî çalışmalarında, gen kaynaklarının korunması çalışmaları, genetik çeşitliliğin araştırılması alanlarında mikrosatelit markerler kullanılmaktadır (Minvielle vd. 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Canlı materyal ve örnekleme

Araştırmada hayvan materyali olarak, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı olan Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nde bulunan on bir ırka ait saf hat populasyonlardan kan örnekleri alınmıştır (Çizelge 3.1). Tavukların kanat altı toplar damarından antikoagülanlı (EDTA) tüplere 2-5 ml olarak alınan kan örnekleri soğuk zincir içerisinde, mümkün olan en kısa sürede Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Hayvan Biyoteknolojisi Laboratuvarı'na getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, Marek Hastalığına karşı dayanıklılık bakımından Türkiye ticari tavuk hatları genotiplerinin karşılaştırılması amacıyla kontrol DNA örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla Amerika Tarım Bakanlığı (USDA; United State Department of Agriculture), Ziraat Araştırma Servisi (ARS; Agriculture Research Service), Kanatlı Hastalıkları ve Kanser Laboratuvarı (ADOL; Avian Disease and Oncology Laboratory)'nda 1940 yılından beri akrabalı yetiştirilerek elde edilen ve %99+ oranında dayanıklı (hat 6₃) ve duyarlı (hat 7₂) olan tavuk hatlarına ait DNA'lar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Irklara ait kan örnekleri ve işletme ile örnek sayısı

İrk	İşletme	n
Rhode Island Red I	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Rhode Island Red II	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Barred Rock I	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Barred Rock II	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Line-54	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Black Line	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Blue Line	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Brown Line	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Maroon Line	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
D-229 Line	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Colombian Rock	Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	30
Hat 6 ₃ (Dayanıklı)	USDA-ARS-ADOL	10
Hat 7 ₂ (Duyarlı)	USDA-ARS-ADOL	10
TOPLAM		350

3.1.2. Araç ve gereçler

Çizelge 3.2. Araç/gereç listesi ve kullanım amaçları

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Soğutmalı Santrifüj (Hettich 320E)	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin sıcağa hassas örneklerin bozulmadan santrifüj edilerek çöktürülmesi
Mini Santrifüj (Hettich-Micro 120)	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Thermal cycler (Thermo, Boeco)	PCR ile lokusların çoğaltılması
Jel görüntüleme (Syngene)	DNA izolasyonu sonrasında PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Otoklav (50 L, TOMY-SX500E)	Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu
Hassas terazi (DESI-TM600)	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerin tartılması
Yatay elektroforez sistemi (BioRad)	DNA izolasyonu ve PCR ürünlerinin tespit edilmesi
Elektroforez güç kaynağı	Elektroforez işlemi için gerekli kesintisiz düzenli elektrik akımının sağlanması
Manyetik karıştırıcı (MTOPS-M300)	Tampon çözeltilerin hazırlanması
Mikro dalga fırın (ARÇELİK)	Çözeltilerin hazırlanması ve Agaroz jellerin hazırlanması
DNA Fragment Analyzer sistemi	Mikrosatelit lokusların fragment büyüklüklerinin belirlenmesi
pH metre (Milwaukee)	Hazırlanan tamponların pH'larının ayarlanması
Laminar Flow	PCR çalışmalarının steril ortamda yapılması
Vorteks (Biosan)	DNA izolasyonu ve PCR sırasında tüplerin karıştırılması
Buzdolabı (UĞUR)	Örneklerin, sarf malzemelerin ve tamponların saklanması
Derin Dondurucu (UĞUR)	Örneklerin, sarf malzemelerin ve tamponların saklanması

3.1.3. Tampon çözeltiler

Genomik DNA moleküllerinin izolasyonunda kullanılacak olan tampon çözeltiler Çizelge 3.3 'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tampon çözeltilerin molarite/miktarı ve içerikleri

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar		İçerik
Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi	0.32	M	Sukroz
	10.00	mM	EDTA
	5.00	mM	MgCl ₂
Fizyolojik Tampon Çözeltisi	75.00	mM	NaCl
	25.00	mM	EDTA
Lisis TE Tampon Çözeltisi	500.0	mM	Tris-HCl
	20.00	mM	EDTA
	10.00	mM	NaCl
SDS Solusyonu (% 10)	10.00	g	SDS
	100.0	ml'ye tamamlanır.	Saf H ₂ O
6M NaCl Çözeltisi	3.51	g	NaCl
	10.00	ml'ye tamamlanır.	Saf H ₂ O
DNA Yükleme Tampon Çözeltisi	5.00	ml	Gliserol
	2.00	ml	Bromfenol
	1.50	ml	EDTA
10 X TBE Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi	1.50	ml	Saf H ₂ O
	108.0	g	Tris
	55.0	g	Borik Asit
	40.0	ml	0.5M EDTA (ph 8.0)
1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi	1 litreye	tamamlanır.	Deiyonize dH ₂ O
	100	ml	10 X TBE
	1 litreye	tamamlanır.	Deiyonize dH ₂ O

3.2. Metot

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA molekülünün izolasyonunda Miller vd. (1988) tarafından bildirilen protokol laboratuvar ortamında optimize edilerek (Meydan 2007) aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. -80 °C'de muhafaza edilen kan örnekleri 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 Çözeltilisi** (Çizelge 3.3) ilave edilecek ve kısa bir süre vorteksle iyice karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Bekletme süresinin sonunda örnekler 3.000 rpm de 10 dk. 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 Çözeltilisi** ile tekrar (en fazla 3 defa) muamele edilmiştir.
6. Peletlerin üzerine 1.000 µl **Fizyolojik Tampon Çözeltilisi** (Çizelge 3.3) eklenmiş ve kısa bir süre karıştırılmıştır.
7. Örnekler 3.000 rpm de 10 dk. santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.
8. Peletlerin üzerine 600 µl **Lisis TE Tampon Çözeltilisi** (Çizelge 3.3) eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.
9. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl %10' luk **SDS solusyonu** (Çizelge 3.3) ve 5 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 65 °C'de 1,5 saat su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir elle hafifçe karıştırılmıştır.
10. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 200 µl **6M NaCl Çözeltilisi** (Çizelge 3.3) eklenmiş ve 15 dk. vorteksle iyice karıştırılmıştır ve 11.000 rpm de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine koyulmuştur.
12. Örnekler 10.000 rpm de 5 dk. tekrar santrifüj edilmiş ve yine üstte kalan sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine alınmıştır. Örnekler üzerine örnek hacminin iki katı hacimde (yaklaşık 1.000 µl) %99,9 'luk etil alkolden (-20 °C 'de muhafaza edilen) ilave edilmiştir.
13. Etil alkol ilave edildikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar hafifçe elle karıştırılmıştır.

14. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 10.000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
15. Santrifüj sonunda etil alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletinin üzerine 1.000 µl %70'lik etil alkol ilave edilerek 10.000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
16. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde yer alan alkol uzaklaştırılmıştır.
17. Tüp içindeki alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler çeker ocak içinde kurumaya bırakılmıştır.
18. Tamamen kuruyan örnekler üzerine 100 µl saf su ilave edilmiş olup, DNA peletinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 °C 'de bekletilmiştir.
19. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının (kırılıp kırılmadığı) kontrolleri %2 'lik agaroz jellerinde yapılmıştır.
20. Spektrofotometre ölçümleri sonucunda 260/280 dalga boylarında 1.8–2.0 saflık ile miktar olarak 50 ng / µl değerinin üzerinde bulunan ve ayrıca %2 'lik agaroz jellerinde tek parça olduğu tespit edilen her bir örneğe ait DNA molekülleri PCR işlemi yapıncaya kadar +4 °C 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. LEI0258 lokusunun PCR ile çoğaltılması

Tavuk populasyonlarında genetik yapının belirlenmesinde, populasyonlar arasındaki genetik ilişkinin ortaya çıkarılmasında kullanılan çok sayıda mikrosatelit lokus vardır. Bu araştırmada on bir saf tavuk hattındaki genetik yapının ortaya çıkarılmasında, Fulton ve ekibinin (2006) yapmış olduğu çalışmalarda ortaya koymuş olduğu LEI0258 mikrosatelit lokusundan yararlanılmıştır. Çalışılacak olan mikrosatelit lokusun çoğaltılması için kullanılacak olan primerlerin detayları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışılacak olan gen bölgesine ait primer dizileri (Fulton 2006)

Mikrosatelit lokus	Primer dizileri	Fragment büyüklüğü
LEI0258	Forward primer: 5' CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG 3' Reverse primer: 5' AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC 3'	194-543 bp.

Çizelge 3.5'de verilen PCR Stok Tampon Çözeltisinde, her seferde incelenecek örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde steril 1,5 ml'lik ependorf tüpü içinde hazırlanmıştır. Bu PCR Stok Tampon Çözeltisinde her bir örnek için 29.5 µl alınarak tüplere dağıtılmıştır. Hazırlanan PCR Stok Tampon Çözeltisi tüplere dağıtıldıktan sonra örnekler için DNA'dan 0.5 µl alınarak bu çözeltinin üzerine eklenmiştir. Daha sonra tüplerin kenarlarına yapışmış olan kısmı dibe çöktürmek için bu karışım 3-5 sn

mikrosantrifüjde 3.500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda içinde örneklerin bulunduğu tüpler PCR çoğaltımlarının yapıldığı cihaza (Thermal cycler) yerleştirilmiştir. Üzerinde durulan mikrosatelit lokusun çoğaltılmasında Çizelge 3.6’da verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.5. PCR Stok Tampon Çözeltisi

Miktar	İçerik	Derişim
0.5 µl	DNA	100ng
2 µl	Buffer	10X
2.4 µl	MgCl ₂	25mM
0.3 µl	dNTPs	2mM
0.3 µl	Forward Primer	10pmol
0.3 µl	Reverse Primer	10pmol
0.6 µl	Taq DNA polimeraz	5U/ng
13.6 µl	Su	
20 µl	Toplam	

Çizelge 3.6. PCR programı

94°C	→	1 dk	DNA eksenlerinin birbirlerinden ayrılması (<i>initial denaturation</i>)
94°C	→	1 dk	DNA eksenlerinin birbirlerinden ayrılması (<i>denaturation</i>) Primerin komplementer kalıp DNA eksenine hibritlenmesi (<i>annealing</i>) Üzerinde durulan DNA bölgesinin sentezinin yapılması (<i>extension</i>)
60°C	→	45 sn	
72°C	→	45 sn	
72°C	→	10 dk	Üzerinde durulan bölgesinin sentezinin son kez yapılması (<i>final extension</i>)

3.2.3. Elektroforez

Örneklerin elektroforez işlemi için elektroforez çözeltisi olarak çizelge 3.3’te içeriği verilen **1 X Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi** kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi önce **10 X Elektroforez/Jel Stok Tampon Çözeltisi** olarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Hazırlanan bu stok solüsyonu deiyonize su ile 10 katı sulandırılarak (1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi) hem jelin hazırlanmasında hem de elektroforez tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 40 ml, Elektrolit Çözeltisi olarak da 450 ml 1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi kullanılmıştır.

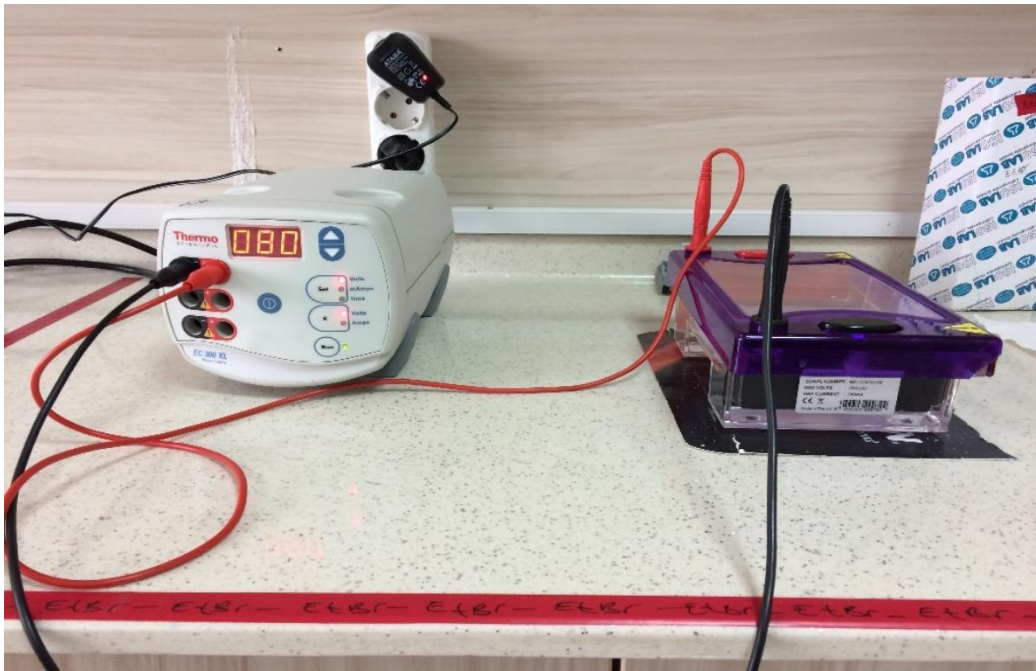
3.2.3.1. Agaroz jellerin hazırlanması

Agaroz jel hazırlamak için 0.8 gr agaroz tartılıp 100 ml’lik erlen mayerin içerisine konulmuş ve üzerine 40 ml 1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi eklenmiş ve %2’lik agaroz jel elde edilmiştir. Çözelti içinde bulunan toz agaroz iyice eriyip homojenize edilmek için mikrodalga fırında 2-5 dk. süreyle kaynatılmıştır. Kaynatılan jel üzerine 5 µl Etidyum Bromid çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan jel öncelikle musluk altında su yardımıyla 50°C’ye kadar soğutulmuş ve 16 kuyucuklu tarak bulunan jel

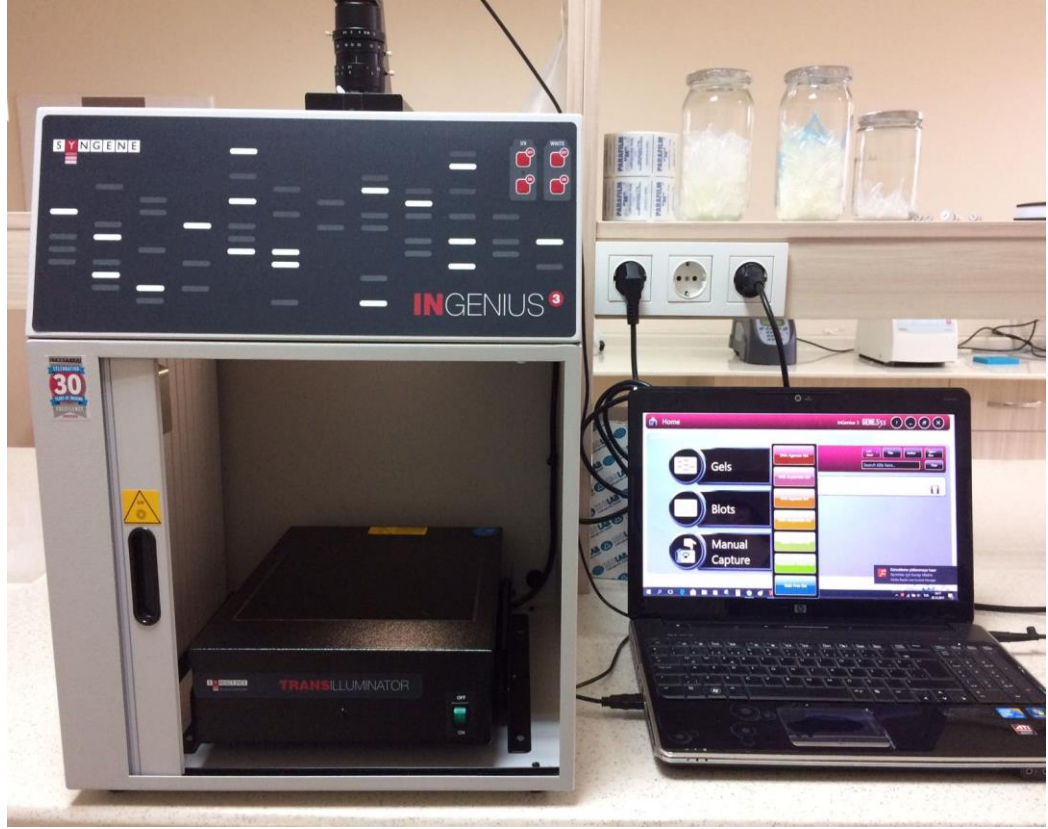
tablasına dökülerek oda sıcaklığında soğuması sağlanmıştır. Yaklaşık 30 dk sonra tarak, kuyulara zarar vermeden ve jeli yırtmadan dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Hazırlanan jel 1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi ile dolu olan yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra üzerini tamamen kaplayana kadar 1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi ilave edilmiştir.

3.2.3.2. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi

PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 0,2 µl'lik PCR tüplerine konulmuş ve üzerine 3 µl Jel Yükleme Tampon Çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin jele yüklenmesinden önce PCR ürünlerinin tüplerin kenarlarına yapışmış olma ihtimalini azaltmak için bu karışım 3-5 sn mikrosantrifüjde 3.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu karışım kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Elektroforez cihazında işlem sonunda görüntülenecek olan bantların büyüklüklerinin saptanması için ilk kuyucuğa 100 bç. aralıklarla bant veren 1.5 kb büyüklüğünde DNA ladder 6 µl yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 80 V/cm'de yaklaşık olarak 30-40 dk. sonra tamamlanmıştır (Şekil 3.1). Elektroforez işleminden sonra jellerin Jel Görüntüleme Sisteminde (Syngene) fotoğrafları çekilerek elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. PCR ürünlerinin elektroforez cihazında yürütülmesi



Şekil 3.2. Elektroforez işleminden sonra ürünlerin görüntülenmesi

3.2.4. DNA fragment analizi

Çalışmada kullanılan 350 adet DNA örneğinde LEI0258 mikrosatelit lokusu PCR ile çoğaltılmıştır. PCR işleminden sonra %2 lik jelde kontrolleri yapılan PCR ürünleri Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies GmbH, Heidelberg, Germany) otomatik kapiller elektroforez sistemi kullanılarak her örneğe özgü allel uzunluklarının belirlenmesi sağlanmıştır (Şekil 3.3).

Elde edilen PCR ürünleri fragment analizleri yapılmak üzere DNA Fragment Analyzer sistemine yüklenerek allel uzunluklarının belirlenmesi sağlanmıştır. DNA Fragment Analyzer dizi analiz cihazında fragment analizi yapılarak, bilgisayar ortamında uzunluğu önceden bilinen standartlar yardımıyla analiz işlemi yapılmıştır. Uygulanan uygun standarta göre elde edilen veriler yani allel uzunlukları analiz programında tek tek okunarak sonuçlar Excel programında istatistik programlarda kullanılmak için kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.3. PCR ürünleri için fragment analiz cihazı

Elde edilen PCR ürünlerinden fragment analizi yapılabilmesi için DNF-900-K1000 kodlu dsDNA 900 Reagent Kit kullanılmıştır (Şekil 3.4). Fragment Analyzer™ cihazında analize başlamadan önce PCR ürünleri ve uygun kimyasallar/tamponlar cihaza yerleştirilmiştir. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulanarak analize başlanmıştır.



Şekil 3.4. DNA fragment analizinde kullanılan kitler

1. 20 µl'lik PCR ürünlerinden, 5'er µl alınarak 96'lık platelere aktarılmıştır. Platedeki H12 numaralı kuyucuk boş bırakılmıştır.
2. Her bir örneğin üzerine 25 µl **1X Dilution Buffer** eklenmiştir.
3. H12 numaralı kuyucuğa 25 µl marker (35-1500 bç.) eklenmiştir.
4. Üzerlerine Dilution Buffer eklenmiş olan PCR örnekleri, 2500 rpm'de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjlenen örneklerin üzerlerine örneklerin buharlaşmaması için 20 µl **Mineral Oil** eklenmiştir.
6. 96'lık boş bir plate içerisine **Upper-Lower Marker (35-1500 bç.)**'dan her bir kuyucuğa 30 µl eklenmiştir ve 2500 rpm'de 30 sn. santrifüj edilmiştir.
7. Markerlerin olduğu kuyucuklara buharlaşmaması için 20 µl **Mineral Oil** eklenmiştir.
8. 96'lık daha büyük bir plate içerisine her bir kuyucuğa (1000 µl) kapiller sistem üzerinde tampon görevi gören **1X Inlet Buffer (930 dsDNA Inlet Buffer)** eklenerek cihazdaki en üst bölmeye (B) yerleştirilmiştir (Şekil 3.5).
9. Cihazın ikinci bölmesinde analiz atıklarının biriktirildiği kutu bulunmakta olup, buraya herhangi bir şey konulmamıştır.
10. Cihazın üçüncü bölmesine (M), marker bulunan plate yerleştirilmiştir (Şekil 3.3).
11. Cihazın dördüncü bölmesi (1) ve beşinci bölmesi (2)'ne Dilution Buffer eklenmiş olan PCR ürünlerini içeren plateler yerleştirilmiştir (Şekil 3.5).
12. Cihazın yan bölmesinde bulunan solüsyonların bulunduğu kısımda atık tüpünün boş olmasına dikkat edilmiştir.
13. Capillary Conditioning Solution tüpüne, 1X olacak şekilde hazırlanan **Capillary Conditioning Solution (5X)**'dan 275 ml eklenmiştir.
14. İçerisine 25 µl **Intercalating Dye (DNF-600)** eklenmiş olan 250 ml **Separation Gel (dsDNA 810)**, jel tüpüne eklenmiştir. Jel karışımı, kabarcık oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırılmıştır.
15. Son olarak Fragment Analyzer™ cihazına uygun olan **Fragment Analyzer (Active)** programı çalıştırılmış ve fragment analizi başlatılmıştır.



Şekil 3.5. Fragment analizi için cihazın hazırlanması

3.2.5. İstatistik analizler

Çalışmada elde edilen fragment uzunlukları belirlendikten sonra LEI0258 mikrosatelit lokusuna ait allel sayıları (n_A) ve frekansları, etkili allel sayısı (n_E), gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk değerleri, polimorfik bilgi içeriği (PIC), Hardy-Weinberg Dengesine (HWE) uygunluk değerleri, Wright'ın F istatistikleri, Faktoriyel Birleştirici Analizleri (FCA: Factorial Correspondence Analysis), genetik mesafe hesaplamaları, filogenetik ağaçların çizimi, Structure analizi yapılarak veriler analiz edilmiş ve ırk içi-ırklar arası genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Elde edilen verilerin analiz edilmesinde POPGENE ver. (Yeh et al. 1997), Arlequin ver. 5 (Schneider et al. 2000), Structure ver. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), Splitstree ver. 4.14.6 (Huson ve Bryant 2006) ve Genetix ver. 4.05 (Belkhir et al. 2004) paket programları kullanılmıştır.

3.2.5.1. Gen frekansları

Gen frekansları, çalışılan on bir populasyonda LEI0258 mikrosatelit lokusu bakımından elde edilen genotiplerden Nei (1987)'nin gen (allel) sayma yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Gen frekanslarının hesaplanmasında POPGENE (Yeh et al. 1997) paket programı kullanılmıştır.

3.2.5.2. Heterozigotluk değerleri

Tavuk ırklarında genetik varyasyona; mutasyon, şans, seleksiyon ve göçler sebep olabilmektedir. Oluşan genetik varyasyon protein, enzim ve çeşitli DNA polimorfizmleri

kullanılarak tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmada, mikrosatelit araştırmalarında heterozigotluk ölçüsü olarak standart kabul edilen allel genişlikleri (AG), allel sayısı (Na) ve etkili allel sayısı (Ne), gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He) ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC) istatistikleri uygun programlar kullanılarak hesaplanmıştır.

Allel genişlikleri (AG)

Lokustaki genetik çeşitliliğin bir göstergesi olan allel genişliği (AG), çalışılacak lokusun etkinliği ve uygunluğu hakkında bilgi veren, lokusların genetik varyasyon ölçüsünü tanımlamada kullanılan bir istatistiktir. Belirli bir lokustaki allel genişliği populyasyondan populyasyona değişebilmektedir. Populyasyonların karşılaştırılmasında kullanılan allel genişliğinin yüksek olması, çalışılan populyasyonlardaki genetik varyasyonun belirlenme ihtimalini artırmaktadır. Bu çalışmada allel genişlikleri POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programları kullanılarak hesaplanmıştır.

Allel sayısı (Na)

Allel sayısı (Na), populyasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan bir diğer özellik değeridir ve örnek sayısından etkilenmektedir. Allel sayısı ne kadar yüksek ise populyasyonlardaki genetik varyasyon da o kadar yüksektir ve allel sayısı populyasyondan populyasyona değişebilmektedir. Bu değer kullanılarak populyasyonların karşılaştırılmaları mümkün olmaktadır. Çalışmada allel sayısı değerlerinin hesaplanmasında POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programı kullanılmıştır.

Etkili allel sayısı (Ne)

Çalışılacak lokusların allel sayısı ile etkili allel sayısı değerlerine bakılarak, hangi lokusun çalışılmasının daha uygun olabileceğine karar verilebilmektedir. Etkili allel sayısı, bir lokusta tespit edilen allellerin ne kadarının o lokustaki genetik varyasyona katkı sağladığını gösteren bir parametre olup populyasyondan populyasyona değişebilmektedir. Bu istatistiğin hesaplanmasında POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programı kullanılmıştır.

Gözlenen heterozigotluk (Ho)

Populyasyonlarda genetik varyasyonun ölçülmesinde heterozigotluk değerleri kullanılmaktadır. Gözlenen heterozigotluk (Ho) üzerinde durulan lokuslar bakımından heterozigot genotiplerin toplam genotiplere oranı şeklinde hesaplanır. Gözlenen heterozigotluk değerlerinin belirlenmesinde POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programı kullanılmıştır.

Beklenen heterozigotluk (He)

Beklenen heterozigotluk (He) değerleri, Nei (1987)'nin yansız (unbiased) heterozigotluk değerleri, gen frekansları kullanılarak belirlenmiştir. Birden fazla lokus olması halinde ise beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerlerinin ortalaması alınarak hesaplama yapılmaktadır. Beklenen heterozigotluk değerlerinin hesaplanmasında POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programından yararlanılmıştır.

Polimorfizm bilgi içeriği (PIC)

Polimorfizm bilgi içeriği (Polymorphism Information Content; *PIC*)'nin hesaplanmasında popülasyondaki toplam allel sayısı ve allel frekanslarından yararlanılmaktadır. Bir genetik markerin ne kadar polimorfik olduğu ve çalışılan lokustaki varyasyonun ne ölçüde olduğu hakkında bilgi veren *PIC* değeri, çalışılan lokusta markerin kullanılabilirliği hakkında bilgi sağlamaktadır. *PIC* değerinin 0.50'nin üzerinde olması markerin yüksek seviyede bilgi sağladığını göstermektedir. *PIC* değerinin 0.75'den yüksek olması ise lokusun çok daha yüksek seviyelerde bilgi verici olduğunu gösterir (Botstein vd. 1980). Çalışılan lokuslar için *PIC* değerleri POWERMARKER (Liu ve Muse 2005) paket programı kullanılarak tespit edilmiştir.

Herhangi bir lokusta tespit edilebilecek *PIC*'nin değer aralıklarının sağladığı bilgiler şu şekildedir;

- $PIC > 0.50$ ise, yüksek seviyede bilgi sağlayan bir marker,
- $0.50 > PIC > 0.25$ ise, orta seviyede bilgi sağlayan bir marker,
- $0.25 > PIC$ ise, çok az bilgi sağlayan bir marker olarak değerlendirilir.

3.2.5.3. Akrabalı yetiştirme katsayısı (*F_{IS}*) ve *F*-istatistikleri (*F_{IT}*, *F_{IS}* ve *F_{ST}*)

Popülasyon içerisinde akraba bireylerin çiftleştirilmesi ile gerçekleştirilen akrabalı yetiştirme (inbreeding), genotip frekanslarında Hardy-Weinberg genetik dengesinde beklenen oranlardan homozigotlaşmaya doğru oluşan bir değişimdir. Hardy-Weinberg dengesinden olan sapmalar, çalışılan lokus ya da lokuslar bakımından homozigotlaşma indeksi (*F*, fixation index) olarak belirtilmektedir (Wright 1978).

Popülasyonlarda akraba bireylerin çiftleştirilmesi akrabalı yetiştirme (*inbreeding*) olarak adlandırılır. Akrabalı yetiştirme, genotip frekanslarında Hardy-Weinberg genetik dengesinde beklenen oranlardan homozigotlaşmaya doğru bir değişim olarak tanımlanmaktadır. Üzerinde çalışılan lokus veya lokuslar bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinden olan sapmalar homozigotlaşma indeksi (*F*, fixation index) olarak ifade edilmektedir (Wright 1978). Alt popülasyonlardan oluşan bir popülasyondaki akrabalı yetiştirme durumunun belirlenmesinde veya polimorfik alleller ile ilişkili seleksiyon modelinin belirlenmesinde *F*-istatistik modeli evrensel olarak kabul edilmektedir. Bu doğrultuda *F*-istatistikleri olarak adlandırılan *F_{IT}*, *F_{IS}* ve *F_{ST}* değerleri kullanılmaktadır. Bu değerlerin arasında $(1-F_{IT}) = (1-F_{IS}).(1-F_{ST})$ şeklinde bir ilişki bulunmaktadır (Nei 1987; Hartl and Clark 2007).

Akrabalı yetiştirme katsayısı (F_{IS})

Akrabalı yetiştirme sonucu popülasyonlarda meydana gelen Hardy-Weinberg dengesinden sapmanın nedenini popülasyonda oluşan heterozigotluktaki eksiklik ya da başka bir ifade ile homozigotlaşmanın artmasıdır. *F_{IS}* değeri -1 ile +1 arasında değerler alabilmektedir. Negatif değerler heterozigotluk, pozitif değerler ise homozigotluk

fazlalığını göstermektedir. Rastgele çiftleşen büyük populasyonlarda F_{IS} değerinin sıfır ya da negatif değer alması beklenen durumdur. Akrabalı yetiştirme katsayısı her saf hatta tüm lokuslar için ve tüm saf hatların bir arada düşünülmesi ile oluşturulan populasyonda tüm lokuslar için belirlenmiştir. Akrabalı yetiştirme katsayılarının hesaplanmasında POPGENE (Yeh *et al.* 1997) paket programları kullanılmıştır.

F-istatistikleri (F_{IT} , F_{IS} ve F_{ST})

Seleksiyon uygulanması, çiftlik hayvanlarının ıslahında özellikle ticari kanatlı yetiştiriciliğinde hibrit soylar elde etmek için ana baba hatlarında yoğun şekilde yapılmaktadır. Yapılan seleksiyon sonucu sadece rastgele çiftleşmenin olmaması, populasyondaki akrabalığın artmasına yol açmaktadır. Akrabalığın artması ise üzerinde çalışılan lokus ya da lokuslar bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinden sapmaya dolayısıyla homozigotlaşmanın artmasına neden olmaktadır. Oluşan bu sapmalar homozigotlaşma indeksini ya da fiksasyon indeksini belirtmektedir. Fiksasyon indeksleri, aynı tür ya da ırka ait farklı populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılan değerlerdir.

Fiksasyon indeksleri (F istatistikleri, F_{IT} , F_{IS} ve F_{ST}), Wright (1965) tarafından geliştirilmiş olup, populasyonların genetik yapılarının belirlenmesinde kullanılan en yaygın belirteçlerdir. Bu metot daha sonraki yıllarda Nei (1977) tarafından genişletilmiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarda bu değerler, populasyonlar arası ve populasyon içi genetik farklılaşmanın belirlenmesinde halen çok sık kullanılmaktadır. Bu çalışmada F istatistiklerinin hesaplanmasında POPGENE (Yeh vd. 1977) paket programı kullanılmıştır.

F_{IT} değeri, tüm populasyonlardaki bireylerin bir arada düşünülmesi ile oluşan yeni populasyonun Hardy-Weinberg dengesinden sapmasını belirleyen değer olup, tüm bireylerden oluşan yeni populasyondaki rastgele birleşen iki gametin ortak atadan gelme ihtimalini belirtmektedir. F_{IT} hem akrabalı yetiştirmeden hem de populasyonlar arası farktan kaynaklanan sapmayı belirlemektedir. Yapılan çalışmada üzerinde çalışılan on bir saf tavuk hattı tek bir populasyon gibi düşünülmüş ve çalışılan LEI0258 lokusu için F_{IT} değeri bulunmuştur. Yani populasyonda çalışılan lokus için akrabalı yetiştirme katsayısı ya da Hardy-Weinberg dengesinden sapmaları hesaplanmıştır. $F_{IT} - 1$ ile $+1$ arasında değer alabilir. $+1$ 'e doğru gidildikçe akrabalı yetiştirme oranı artıyor demektir. F_{IT} değeri $F_{IT} = (H_T - H_o) / H_T$ formülü ile hesaplanmaktadır.

F_{IS} değeri, alt populasyonlar içerisinde akraba olan bireylerdeki homolog alleller arasındaki bağılıkları belirlemektedir. Bu değer, alt populasyonlardaki akrabalık düzeyini ya da alt populasyonların Hardy-Weinberg dengesinden sapmasını belirtmekte olup, alt populasyonların rastgele birleşen iki gametinin ortak atadan gelme ihtimalini vermektedir. F_{IS} değeri -1 ile $+1$ arasında değer alabilir. Eğer F_{IS} değeri negatif olarak bulunur ise heterozigotluk fazla olmaktadır, sıfır değerine yakın bulunur ise Hardy-

Weinberg dengesi bulunmaktadır ve pozitif olarak bulunur ise homozigotluk fazla olmaktadır. Seleksiyon uygulanması, akrabalı yetiştirilmenin artmasına dolayısıyla bu durum da heterozigotluğun eksikliğine neden olur ve buna bağlı olarak da F_{IS} negatif değer almaktadır. Çalışılan on bir farklı saf tavuk hattından herhangi birinde rastgele alınan iki bireyden birleşen iki gametin ortak atadan gelme ihtimalini gösteren F_{IS} değeri $F_{IS} = (H_s - H_o) / H_s$ formülü ile hesaplanmaktadır.

F_{ST} değeri, alt populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların ölçülmesi olup, alt populasyonlardan rastgele ele alınan iki gametin ortak atadan gelme ihtimalini belirtmektedir. Bir lokus açısından populasyonları karşılaştırmada kullanılmaktadır. Populasyonlarda genetik farklılaşmaların ölçümünde en yaygın kullanılan değerdir. F_{ST} 0 ile 1 arasında bir değer alır. Belirlenen F_{ST} değeri 1'e ne kadar yakın ise alt populasyonlar ortak atadan oldukça uzak olduğu dolayısıyla F_{ST} değeri küçük olduğu zaman populasyonların arasındaki varyasyonun da az olduğu söylenebilir. Yani iki populasyon birbirine genetik olarak benziyor demektir. Çalışılan on bir saf tavuk hattından herhangi ikisinde içinde rastgele alınan iki bireyden birleşen iki gametin ortak atadan gelme ihtimalini gösterir ve $F_{ST} = (H_T - H_s) / H_T$ formülü ile hesaplanmaktadır.

Hartl ve Clark (2007)'a göre, populasyonlar arasındaki genetik farklılık 4 farklı grupta toplanmıştır. Wright (1978)'a göre populasyonlar arasındaki genetik farklılıklar (F_{ST}) 0.05'ten daha küçük ise bu farklılıkların biyolojik olarak herhangi bir anlam taşımadığı bildirilmiştir (Hartl ve Clark 2007).

Eğer F_{ST} değeri;

- (0-0.05) arasında bir değer alıyor ise küçük bir genetik farklılaşma;
- (0.05-0.15) arasında bir değer alıyor ise orta düzeyde farklılaşma;
- (0.15-0.25) arasında bir değer alıyor ise büyük bir genetik farklılaşma;
- (0.25'ten büyük değerler alıyorsa çok büyük bir genetik farklılaşmanın mevcut olduğu söylenebilir (Hartl ve Clark 2007).

F_{ST} değerleri on bir saf tavuk populasyonu için ayrı ayrı hesaplanmıştır. F istatistiklerinin hesaplanmasında POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programları kullanılmıştır.

3.2.5.4. Genetik farklılıklar

İkişerli F_{ST} değerleri

İkişerli F_{ST} değeri populasyonlar arasındaki farklılaşmayı göstermektedir. Çalışmada kullanılan populasyonları ikişerli karşılaştırarak genetik farklılaşmayı kıyaslamada kullanılır. İkişerli F_{ST} değeri populasyonda özgün allellere göre, orta frekansa sahip allellerden daha çok etkilenmektedir. İkişerli F_{ST} değeri on bir saf tavuk populasyonu için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu çalışmada populasyonlar arasındaki genetik

farklılaşmanın ikişerli olarak karşılaştırılmasında Arlequin (Excoffier vd. 2006) paket programı kullanılmıştır.

Gen akışı (Nm)

Hartl ve Clark (2007) populasyonların birbirlerinden farklılaşmasını önleyen etkenlerden birinin göç olduğunu bildirmiştir. Nm değeri iki farklı yöntemle hesaplanmakta olup, birinci Nm hesaplama yönteminde özgün allellerin frekansları kullanılmaktadır. İkinci yöntemde ise F_{ST} değeri kullanılarak belirlenmektedir. Bu çalışmada POPGENE (Yeh vd. 1997) paket programı ile Nm değeri $Nm=0.25(1-F_{ST})/F_{ST}$ eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.5. Moleküler varyans analizi (AMOVA)

Moleküler marker yöntemlerinin DNA seviyesinde RAPD, AFLP, RFLP ve mikrosatelit yöntem uygulamaları kullanılarak elde edilen verilerin istatistik analizlerinde Moleküler Varyans Analizi (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) kullanılmaktadır. Bu analiz Excoffier vd. (1992) tarafından Varyans Analizi (ANOVA) formülleri moleküler verilere göre düzeltilerek geliştirilen çok değişkenli bir analiz yöntemidir. AMOVA ile toplam genetik varyasyonun ne kadarının çalışılan populasyonların farklı olmasından (among population), ne kadarının ise populasyonlardaki bireylerin farklı olmasından (within population) kaynaklandığı belirlenebilmektedir. Bu çalışmada AMOVA analizi için Arlequin (Excoffier vd. 2006) paket programı kullanılmıştır.

3.2.5.6. Kümeleme analizleri

Kümeleme analizlerinin belirlenmesinde genel olarak iki farklı tipte yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler uzaklık-temelli (*distance-based methods*) ve model-temelli (*model-based methods*) yöntemlerdir. Uzaklık-temelli yöntemler herhangi iki birey arasındaki uzaklıkları veren ikişerli uzaklık matrisi değerleri hesaplanır ve daha sonra bu matrisi uygun grafik (örneğin üç boyutlu ve çok boyutlu olarak) yöntemleriyle sunulmakta ve oluşan kümeler gözle tanımlanabilmektedir. Model-temelli yöntemlerde ise, bazı parametrik modellerden rastgele çekilen her bir kümeden elde edilen gözlemler (varsayımlar) üzerinde durulmaktadır. Her bir kümeye karşılık gelen parametre için elde edilen sonuç daha sonra standart istatistik yöntemleri (örneğin maksimum likelihood ve Bayesian yöntemleri gibi) kullanılarak her bir bireyin üyesi olduğu kümenin sonucuyla birlikte değerlendirilir (Pritchard *et al.* 2000).

Kümeleme analizleri Weir and Cockerham (1984) tarafından formüle edilen *ikişerli F_{ST}*, Nei (1978)'nin yansız genetik uzaklık (D), Belkhir *et al.* (1998-2004)'ın faktöriyel uygunluk analizi (FCA) ve Pritchard *et al.* (2000)'ün genetik yapı analizi (*structure*) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Genetik mesafenin belirlenmesi ile filogenetik ağaç oluşturulması

İki popülasyon ya da tür arasındaki genetik mesafe, gen farklılıklarını belirtmektedir. Bu değer allel frekanslarından yararlanılarak belirlenmekte olup, genetik mesafe tahmininde değişik yöntemler bulunmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemlerden birisi Nei'nin (1972) genetik benzerlik değerinden hesaplanan, standart genetik uzaklık (D) yöntemi ile bundan türetilen yansız (unbiased) genetik mesafe (Nei 1978) değeridir. Eğer genetik mesafe değeri 0 ise popülasyonlar arasında fark yok demektir. Eğer genetik benzerlik değeri 0 ise popülasyonlarda çalışılan mikrosatelit lokus bakımından hiçbir ortak allelin olmadığı söylenebilir.

İkişerli F_{ST} değerleri ile kümeleme analizi

Weir and Cockerham (1984) tarafından formüle edilen F_{ST} (ikişerli) değerlerinden yararlanılarak oluşturulan kümeleme analizlerinde dendogramlar için en yakın komşu ($NJ = neighbor\ joining$) yöntemi kullanılmıştır (Nei and Kumar 2000). NJ kümeleme analizleri Splitstree (Huson ve Bryant 2006) paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Genetik uzaklık (D_A) değerleri ile kümeleme analizi

Mikrosatelit verilerden genetik mesafe belirlenmesinde Nei'nin genetik mesafe değerlerinden (D_A) yararlanılmaktadır. Yapılan kümeleme analizlerinde değişik yöntemler bulunmaktadır. Kümeleme analizlerinde en yaygın kullanılan dendogram metotları UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) ya da NJ (Neighbor Joining, en yakın komşu) metodudur. UPGMA metodunda popülasyonların evrim zamanı aynı kabul edilerek ağaç oluşturulduğu için günümüzde NJ daha çok tercih edilen yöntemdir. NJ yönteminde popülasyonlar arasındaki fark dikkate alınmaktadır (Saitou ve Nei 1987). Bu çalışmada UPGMA dendogramı ve NJ ağacı Splitstree (Huson ve Bryant 2006) paket programı ile oluşturulmuştur.

Faktöriyel uygunluk analizi (FCA)

Faktöriyel uygunluk analizi (FCA, factorial correspondence analysis), genellikle 3 boyutlu bir düzlemde bireylerdeki farklılığı ve popülasyonlar arasındaki farklılıkların da görsel olarak ortaya konulmasını sağlayan analiz yöntemidir. FCA analizi için GENETIX v. 4.05 (Belkhir vd. 2004) paket programından yararlanılmıştır.

Structure analizi

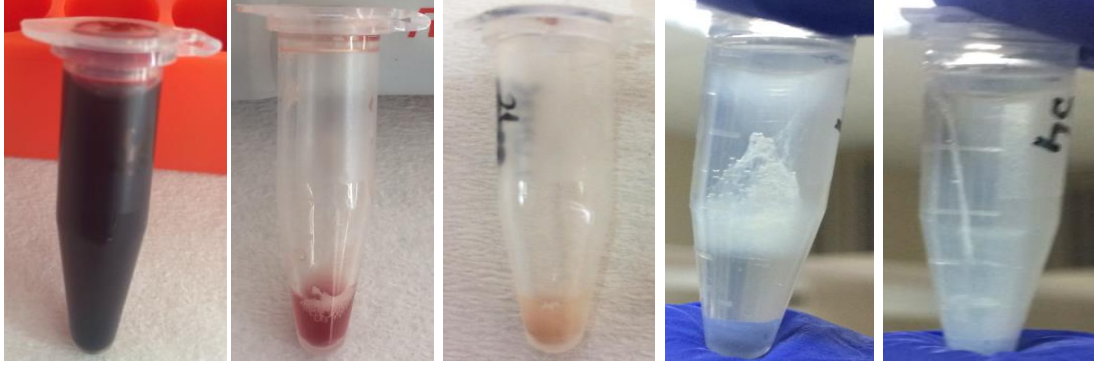
Popülasyonlardaki farklılıkların belirlenmesi örneklerin coğrafi kökenlerinin etkisine dayanmaktadır. Ancak popülasyonun genetik yapısı her zaman bireylerin coğrafi kökenini belirtmeyebilir. UPGMA ve en yakın komşu (NJ) kümeleme analizinde kümeleme sonuçlarına ilave bilgilerin (bireylerin örneklendiği coğrafi bölgeler gibi) birleştirilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (Pritchard vd. 2000; Evanno vd. 2005).

Mesafe temelli bu yöntemlerdeki eksiklikleri gidermek için Pritchard vd. (2000) tarafından model temelli (model-based method) alternatif bir yöntem olan Structure analizi geliştirilmiştir. Structure analizi populasyon yapısını ve populasyonların genetik mesafe ayrımını göstermede etkili bir yol olup, Structure Bayesian yaklaşımı ile K sayısı kadar populasyonda her bir lokusta tahmin edilen allel frekansları kullanılarak populasyonun genetik yapısını belirlemekte ve çok sayıda lokus bakımından belirlenen genotiplerden yararlanarak birbirleriyle ilişkili olan bireyleri ait oldukları populasyonlara doğru bir şekilde kümelemektedir. Çalışmada kullanılan on bir saf tavuk populasyonunun genetik yapısı Structure 2.2 (Pritchard vd. 2000) programı kullanılarak belirlenmiştir.

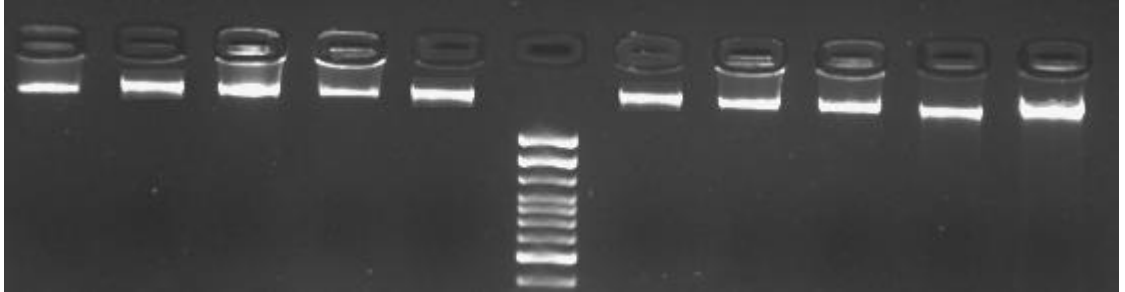
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyon Sonuçları

Daha önce de belirtildiği üzere genomik DNA izolasyonu için tuz çöktürme yöntemi uygulanmış olup, her bir aşamada tüplerin resmi çekilmiştir (Şekil 4.1). Çalışılan on bir saf tavuk populasyonundan alınan kanlardan izole edilen genomik DNA'ların kalite kontrolü %2'lik agaroz jel elektroforezinde yapılmış ve görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



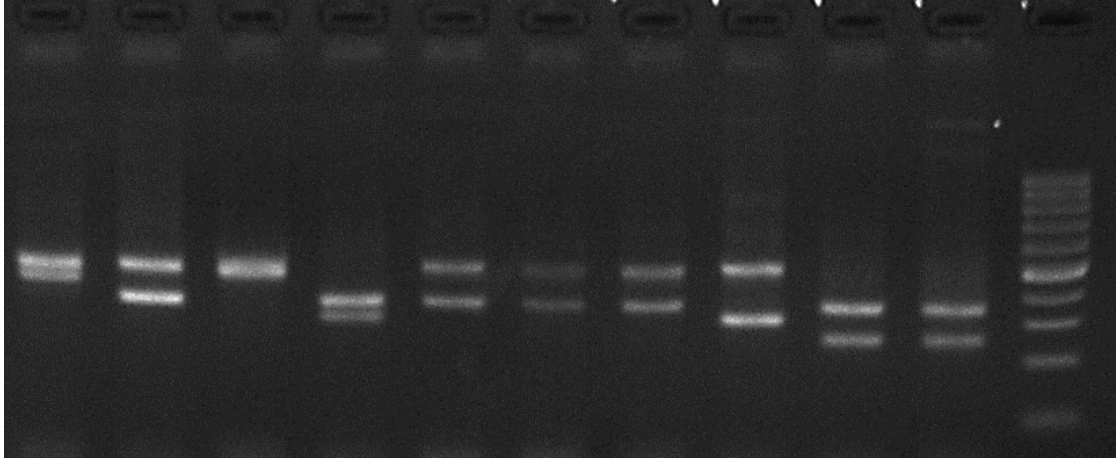
Şekil 4.1. Kan örneklerinin DNA izolasyon aşamaları



Şekil 4.2. DNA örneklerinin %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

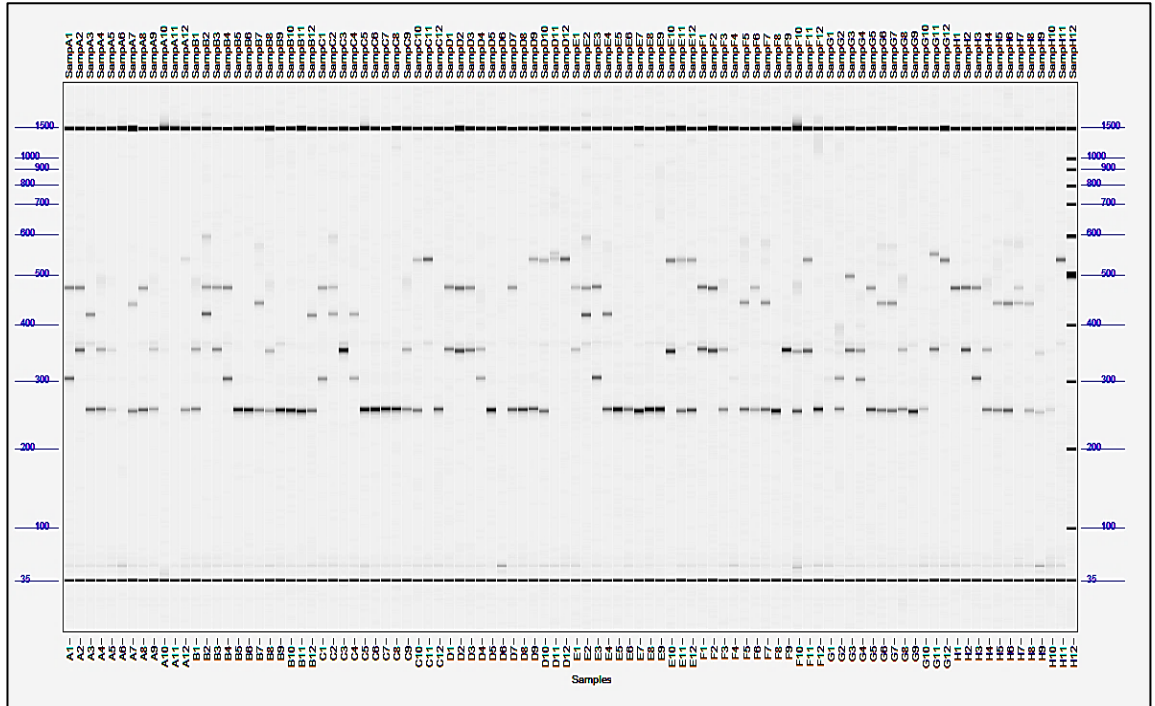
Bu araştırmada kullanılan LEI0258 mikrosatelit lokusuna ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek lokusun polimorfik olup olmadığı hakkında ön bilgiye sahip olunmuştur (Şekil 4.3).



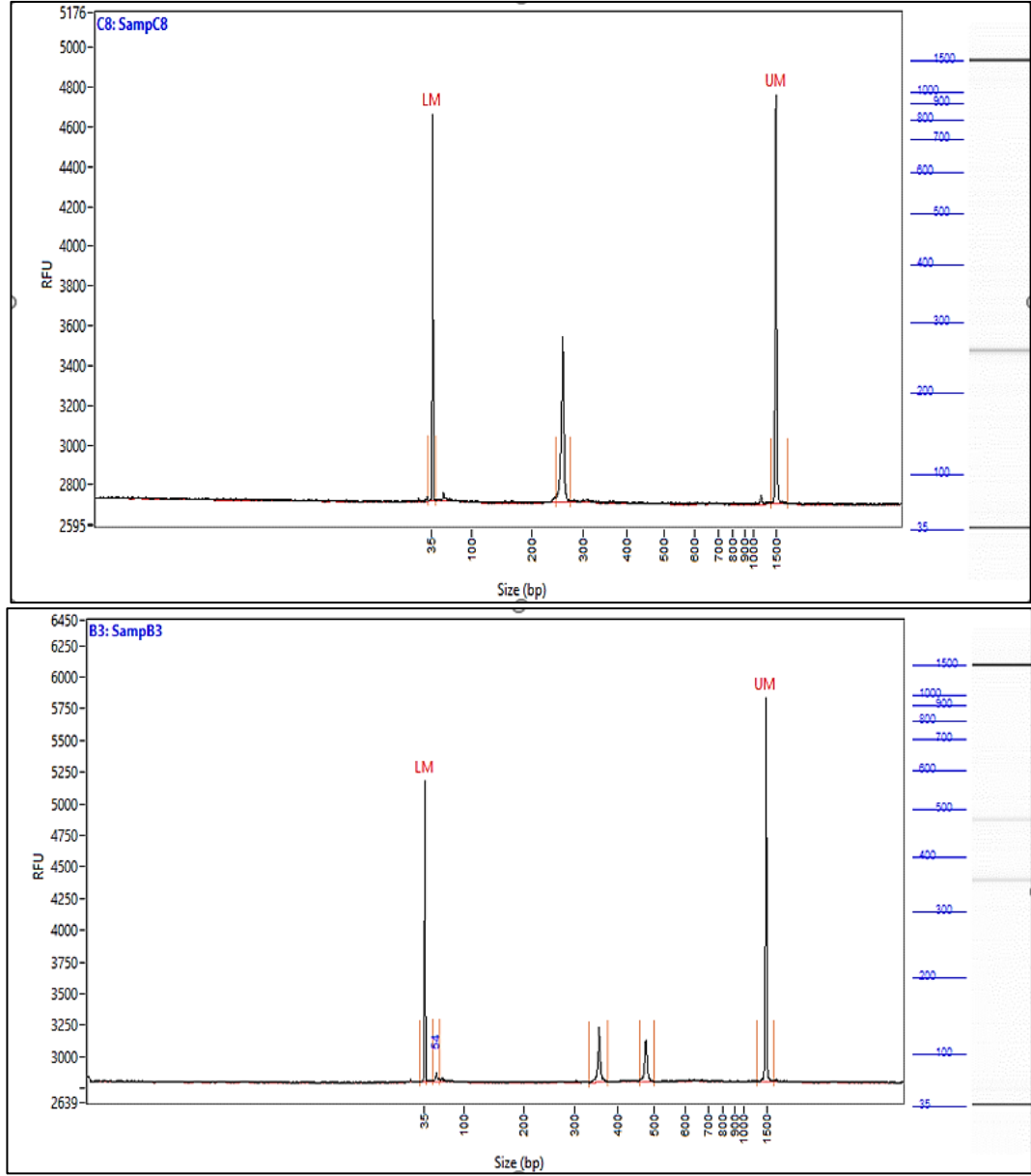
Şekil 4.3. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforez sonrası görüntüsü

4.3. Fragment Analizi

Tekrar bölgelerinden oluşan mikrosatelit bölgeleri içeren PCR ürünlerinin büyüklüklerinin tespit edilmesi için fragment analizi yapılmış ve her bir bireyin fragment uzunlukları tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Fragment analizi sonucunda elde edilen piklere bakılarak bireyin homozigot veya heterozigot genotipe olduğu ve sahip olduğu fragmentin büyüklüğü belirlenebilmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. RIR-I, RIR-II ve Col populasyonlarına ait olan ve yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulan jel görüntüsü



Şekil 4.5. Homozigot (üstte) ve heterozigot (altta) bireylere ait pik görüntüsü

4.4. İstatistik Analizler

4.4.1. Genetik varyasyon

Yapılan bu tez çalışmasında on bir saf tavuk hattında çalışılan LEI0258 mikrosatelit lokusu, bütün populasyonlarda polimorfik bulunmuştur. Toplam 39 allel elde edilmiştir. Allel genişliği on bir populasyon için 205 ile 552 bç.. uzunluğu arasında değişiklik göstermiştir. En düşük allel sayısı Maroon hattında 4 olarak, en yüksek allel sayısı Black hattında 13 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Karşlı (2015) tarafından yapılan ve bu çalışmada kullanılan 6 populasyonun kullanıldığı çalışmada, en düşük allel sayısı değeri BAR-II populasyonunda 4.5 olarak ve en yüksek allel sayısı değeri RIR-I populasyonunda 5.5 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ise BAR-II populasyonu için allel

sayısı 7, RIR-I için ise 6 olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada daha yüksek allel sayısının elde edilmesinin sebebi LEI0258 lokusunun daha fazla mutasyona uğrayarak daha polimorfik olmasıyla açıklanabilir.

Çalışılan on bir saf tavuk hattında LEI0258 lokusu için gözlenen heterozigotluk (Ho) değerleri en düşük Maroon hattında 0.000, en yüksek ise Blue hattında 0.935 tespit edilmiştir. Beklenen heterozigotluk (He) en düşük BAR-II hattında 0.594 olarak, en yüksek ise Black hattında 0.874 olarak saptanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında on bir saf tavuk hattında elde edilen PIC değeri 0.591 ile 0.845 arasında değişmekte olup ortalama 0.728 olarak bulunmuştur. Kullanılan LEI0258 mikrosatelit lokusunun on bir saf tavuk hattındaki genetik varyasyonu belirlemede yüksek seviyede bilgi verici olduğu sonucuna ulaşılabılır.

Çizelge 4.1. Çalışılan on bir saf tavuk hattındaki tanıtıcı istatistikler; birey sayısı (N), allel genişliği (AG), allel sayısı (Na), gözlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk değerleri, polimorfizm bilgi içeriği (PIC)

Populasyon	N	AG	Na	Ho	He	PIC
Blue	31	259-478	8	0.935	0.836	0.801
Brown	30	255-478	10	0.566	0.725	0.694
D-229	29	255-552	10	0.655	0.825	0.786
Black	29	205-471	13	0.689	0.874	0.845
Maroon	25	255-261	4	0.000	0.741	0.674
RIR-II	31	247-357	8	0.419	0.776	0.591
RIR-I	31	249-361	6	0.483	0.780	0.591
Col	32	235-319	8	0.500	0.697	0.685
BAR-I	30	247-447	10	0.666	0.864	0.834
BAR-II	30	247-459	7	0.500	0.642	0.591
L-54	29	205-317	10	0.655	0.736	0.591
Toplam	347	205-552	39	0.527	0.93	0.728

4.4.2. F -istatistikleri (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) ve gen akışı (Nm) değeri

Wright (1965) tarafından geliştirilen fiksasyon indeksleri ya da F istatistikleri (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) populasyonların genetik yapısının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada on bir farklı saf hatta ait LEI0258 lokusunda elde edilen F_{IS} değeri pozitif bulunmuştur. On bir farklı hattın LEI0258 lokusu için ortalama F_{IS} değeri 0.276 olarak tespit edilmiştir. F_{IS} değeri, kapalı sürüler halinde yetiştirilen ve uzun süre seleksiyon uygulanan bu hatlardaki homozigot fazlalığını ya da bir başka ifadeyle heterozigot eksikliğini işaret etmektedir. Bu sonuca göre, hatlarda heterozigot eksikliğinden dolayı Hardy-Weinberg dengesinden pozitif yönde bir sapma olduğu söylenebilir.

Yapılan çalışmada elde edilen ortalama F_{IT} değeri 0.502 olarak belirlenmiştir. Bu değer tüm populasyonların bir arada düşünülmesi ile Hardy-Weinberg dengesinden sapmayı göstermektedir. Bir başka ifade ile tüm hatların bir arada düşünülmesi ile oluşan yeni populasyondaki akrabalı yetiştirme katsayısı olarak ifade edilebilir. Bu çalışmada elde edilen F_{IT} değeri (0.502), Karanlı (2015) tarafından benzer altı saf tavuk hattında bildirilen F_{IT} değerinden (0.493), Kaya (2008) tarafından Denizli ve Gerze populasyonlarında bildirilen F_{IT} değerinden (0.308) yüksektir. Bu yüksek F_{IT} değerinin temelinde uzun dönem uygulanan seleksiyonun etkili olduğu düşünülmektedir.

F_{ST} değeri alt populasyonlardaki genetik farklılaşmanın bir göstergesidir. Hartl ve Clark (2007) F_{ST} değerinin 0.25'ten büyük olması durumunda populasyonlar arasında çok büyük bir genetik farklılaşmanın olduğunu bildirmişlerdir. On bir tavuk hattında yapılan bu çalışmada F_{ST} değeri 0.312 olarak tespit edilmiştir. F_{ST} değeri Karanlı (2015) tarafından benzer altı tavuk hattında yapılan çalışmada 0.295 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre on bir saf hattın genetik olarak yüksek düzeyde farklılaştığı söylenebilir. Bu hatların kökenleri ve yetiştirilme sistemleri göz önüne alındığında bu sonuçların elde edilmesi normaldir. Çünkü bu hatlar farklı genetik kökenlerden gelmektedir. Ayrıca kapalı sürüler halinde yetiştirilen bu hatlarda çeşitli verimler için uygulanan seleksiyon bu farklılaşmayı artırmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen gen akışı (Nm) değeri 0.551 olarak bulunmuştur. Bu değer, üzerinde durulan populasyonlar arasında her 2 generasyonda 1 bireyin göç ettiği şeklinde yorumlanabilir. Bulunan değer, Karanlı (2015) tarafından benzer altı tavuk hattında yapılan çalışmada bulunan Nm değeri (0.674) ile benzerdir. Elde edilen bu sonuç bu populasyonların yetiştirilme şekli ile de uyumludur. Kapalı sürüler halinde kendi içerisinde yetiştirilen bu populasyonlarda Nm değerinin sıfıra yakın olması beklenen bir sonuçtur.

4.4.3. İkişerli F_{ST} değerleri

Çalışılan on bir tavuk hattında en düşük ikişerli F_{ST} değeri Brown ve L-54 hatları arasında (0.034), en yüksek ikişerli F_{ST} değeri Col ve BAR-II hatları arasında (0.329) elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Dolayısıyla Brown ve L-54 hatlarının birbirinden genetik olarak neredeyse hiç farklı olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Çizelge 4.2. Çalışılan on bir saf tavuk hattında ikişerli F_{ST} değerleri

	Blue	Brown	D229	Black	Maroon	RIRII	RIRI	Col	BARI	BARII	L54
Blue	***										
Brown	0.146	***									
D-229	0.097	0.076	***								
Black	0.061	0.077	0.061	***							
Maroon	0.184	0.089	0.096	0.098	***						
RIRII	0.095	0.238	0.165	0.066	0.240	***					
RIRI	0.159	0.246	0.195	0.142	0.238	0.159	***				
Col	0.230	0.288	0.239	0.204	0.281	0.246	0.257	***			
BARI	0.138	0.183	0.154	0.119	0.195	0.167	0.125	0.219	***		
BARII	0.256	0.298	0.266	0.241	0.309	0.279	0.239	0.329	0.163	***	
L-54	0.154	0.034	0.098	0.059	0.141	0.188	0.215	0.215	0.199	0.310	***

4.4.4. Moleküler Varyans Analizi (AMOVA)

Üzerinde durulan on bir saf tavuk hattında görülen genetik varyasyonun kaynağının ne olduğunu belirlemek amacıyla AMOVA analizi yapılmış ve varyans bileşenleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çalışılan on bir saf tavuk hattının AMOVA analizi tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi (SD)	Kareler Toplamı (KT)	Varyans (%)
Populasyonlar Arası	12	77.117	23.44*
Populasyonlar İçi Bireyler Arası	334	156.959	21.53*
Bireyler İçi	347	91.500	55.04*
Genel	693	325.576	100

*p<0.01

Yapılan AMOVA analizi sonuçları incelendiğinde toplam genetik varyasyonun %23.44'ünün populasyonlar arasındaki farklılıktan, %21.53'ünün populasyonlar içi bireyler arasından ve %55.04'ünün bireyler içindeki farklılıktan kaynaklandığı söylenebilir. Hatlar arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olup olmadığının

belirlenmesi için permütasyon test uygulanmış ve yapılan test sonuçlarına göre hatlar arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($p < 0.01$).

4.4.5. Nei'nin genetik uzaklık (D_A) ve genetik benzerlik değerleri

Çalışılan on bir tavuk hattı arasındaki Nei'nin yansız genetik mesafe tahmini ve hatlar arasındaki genetik benzerlikler Çizelge 4.4' de belirtilmiştir. Çalışılan tavuk hatları arasında en uzak genetik mesafe ise BAR-I ile D-229 hatları arasında (6.324) tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek genetik benzerlik Brown ve L-54 hatları arasında (0.881), en düşük ise BARI- ile D-229 hatları arasında (0.001) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan populasyonlar arasındaki genetik mesafe (D_A) ve genetik benzerlik

	Blue	Brown	D229	Black	Maroon	RIRII	RIRI	Col	BARI	BARII	L54
Blue	***	0.389	0.451	0.587	0.148	0.549	0.194	0.018	0.083	0.019	0.326
Brown	0.942	***	0.711	0.686	0.710	0.050	0.003	0.000	0.129	0.075	0.881
D-229	0.795	0.340	***	0.606	0.601	0.195	0.012	0.000	0.001	0.000	0.603
Black	0.532	0.375	0.500	***	0.550	0.662	0.203	0.067	0.092	0.000	0.759
Maroon	1.908	0.342	0.508	0.597	***	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.519
RIR-II	0.599	2.978	1.629	0.411	0.000	***	0.325	0.087	0.076	0.050	0.270
RIR-I	1.637	5.743	4.395	1.591	0.000	1.122	***	0.020	0.332	0.223	0.136
Col	3.989	0.000	0.000	2.698	0.000	2.432	3.907	***	0.000	0.000	0.188
BAR-I	2.487	2.040	6.324	2.382	0.000	2.574	1.101	0.000	***	0.434	0.000
BAR-II	3.939	2.579	0.000	0.000	0.000	2.989	1.498	0.000	0.833	***	0.000
L-54	1.120	0.126	0.505	0.275	0.655	1.308	1.994	1.667	0.000	0.000	***

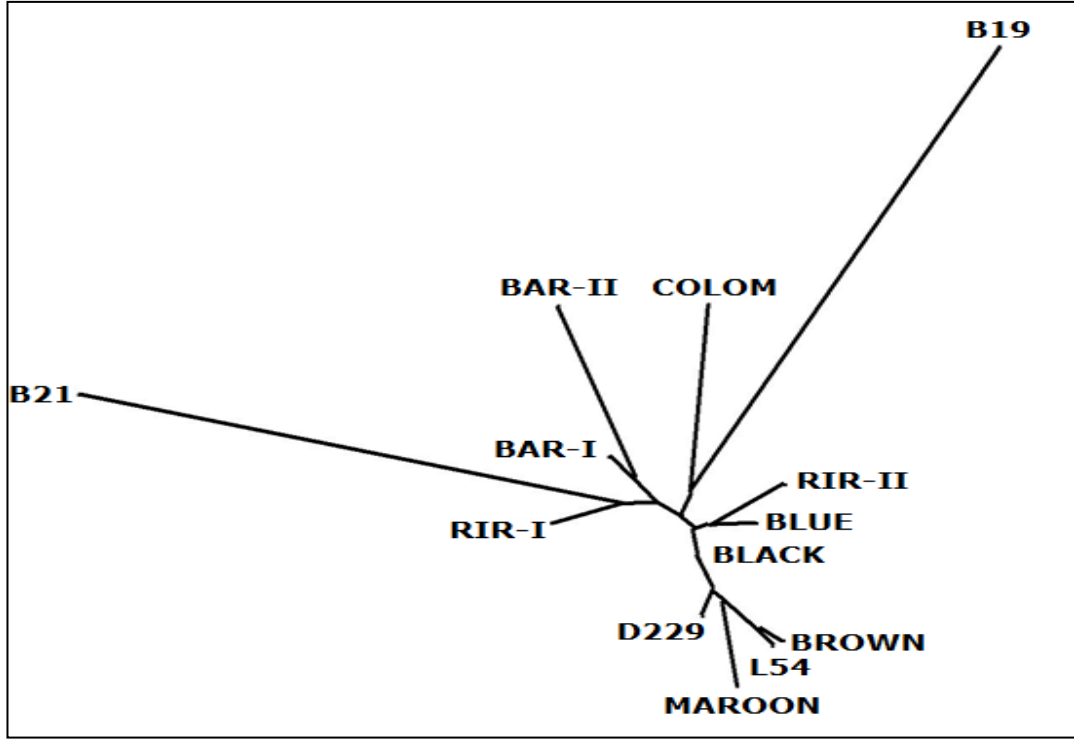
Köşegenin üstündeki değerler genetik benzerliği, altındaki değerler ise genetik mesafeyi göstermektedir.

4.4.6. Kümeleme analizleri

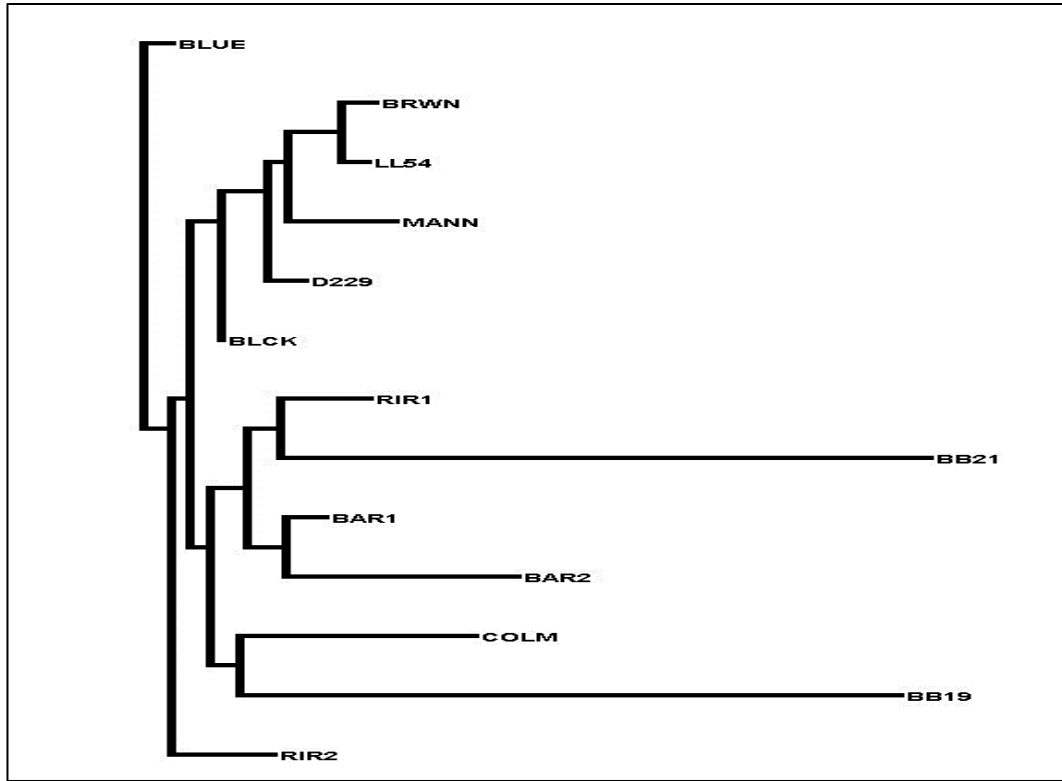
Çalışılan on bir saf tavuk populasyonlarının gruplandırılması ve populasyonlar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için ikişerli F_{ST} , faktöriyel uygunluk (FCA) ve structure yöntemleri kullanılmıştır.

4.4.6.1. İkişerli F_{ST} değerleri kullanılarak yapılan kümeleme analizi

Çalışılan on bir saf tavuk populasyonu ve bu populasyonu oluşturan bireyler ile kontrol grubu olarak kullanılan B19 haplotipi ve B21 haplotipine ait bireylerin ikişerli F_{ST} değerleri ile NJ metodu kullanılarak filogenetik ilişkileri belirlenmiş ve uygun filogenetik ağaç ve dendogram elde edilmiştir (Şekil 4.6-4.7).



Şekil 4.6. Çalışılan tavuk hatlarında ikişerli F_{st} değerlerine göre elde edilen filogenetik ağaç



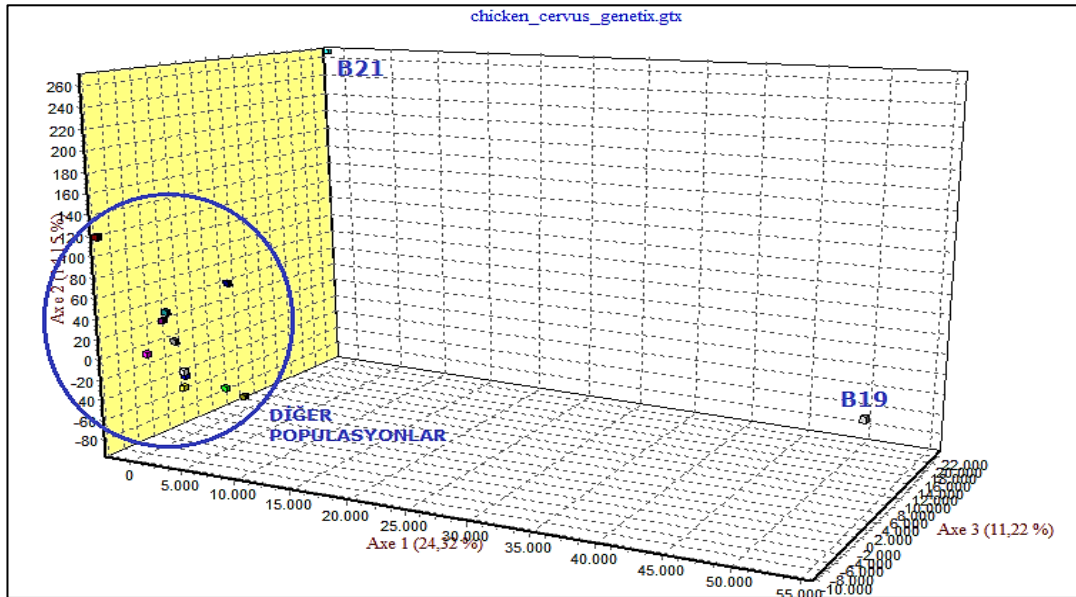
Şekil 4.7. Çalışılan tavuk hatlarında ikişerli F_{st} değerlerine göre elde edilen dendrogram

Şekiller incelendiği zaman görüleceği üzere birbirine en yakın populasyonlar Brown ve L-54 populasyonlarıdır. Daha önceki bölümlerde de değinildiği gibi bu iki populasyon arasındaki genetik farklılaşma katsayısı çok düşük (0.034) ve genetik benzerlik değeri çok yüksek (0.881) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre hem filogenetik ağaçta hem de dendogramda Brown ve L-54 populasyonlarının birbirine en yakın yerde konumlanması beklenen bir durumdur.

Yapılan bu kümeleme analizine kontrol amaçlı olarak Amerika Tarım Bakanlığı (USDA; United State Department of Agriculture), Ziraat Araştırma Servisi (ARS; Agriculture Research Service), Kanatlı Hastalıkları ve Kanser Laboratuvarı (ADOL; Avian Disease and Oncology Laboratory)'ndan temin edilen ve B21 (dayanıklı) ile B19 (duyarlı) haplotiplere ait bireylerden elde edilen sonuçlar da dahil edilmiştir. Hem filogenetik ağaçta hem de dendogramda görüldüğü üzere B21 ve B19 haplotipleri çalışılan populasyonlardan çok uzak yerde konumlanmıştır. Her ne kadar kontrol populasyonları farklı ve uzak bir yerde konumlansa da B21 (dayanıklı) haplotipine en yakın olan populasyon Rhode Island I (RIR-I) hattıdır. Aynı şekilde B19 (duyarlı) haplotipine en yakın populasyon ise Colombian Rock (Col)'tır. Bu sonuçlara göre üzerinde durulan on bir saf hattan Marek Hastalığı'na karşı en dayanıklı olanın RIR-I, en duyarlı olanın ise Col olduğu sonucuna varılabilir.

4.4.6.2. Faktöriyel uygunluk analizi (FCA)

Çalışılan on bir saf tavuk populasyonu ve bu populasyonu oluşturan bireyler ile kontrol grubu olarak kullanılan B19 haplotipi ve B21 haplotipine ait bireylerin arasındaki benzerliğin çok boyutlu bir düzlemde belirlenmesi için faktöriyel uygunluk analizi kullanılmıştır (Şekil 4.8).

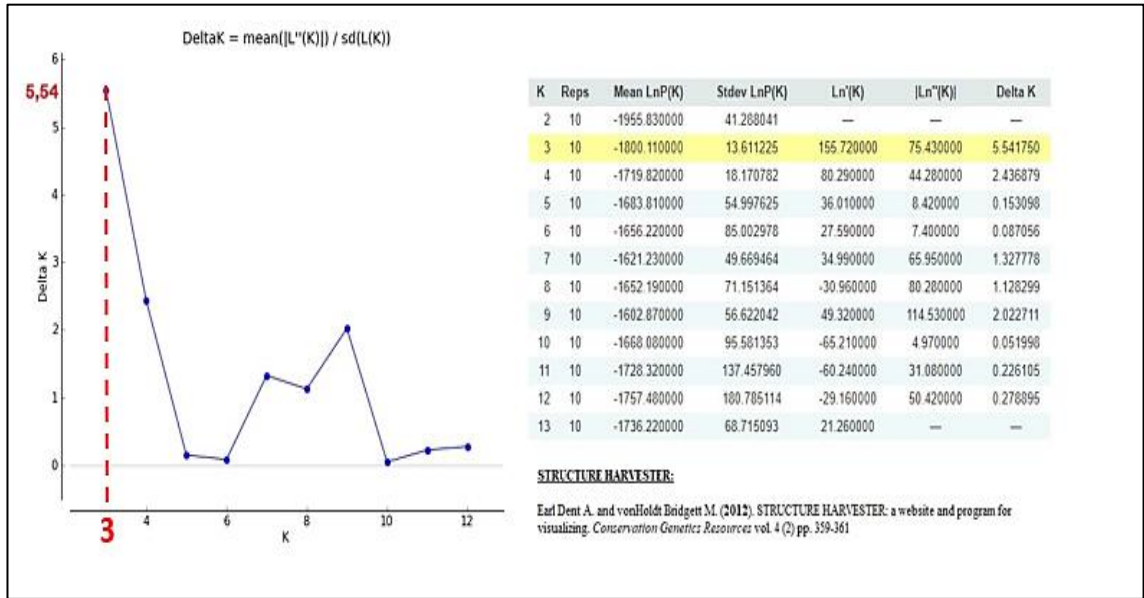


Şekil 4.8. Çalışılan on bir saf tavuk hattı ve kontrol grubu hatlarının (B19-B21) faktöriyel uygunluk analizi tablosu

Faktöriyel uygunluk analizi sonuçları NJ ağacı ve dendogram sonuçlarına benzer sonuçlar vermiştir. B19 ve B21 haplotipleri diğer tüm populasyonlardan farklı yerde konumlanmıştır.

4.4.6.3. Genetik yapı analizi (Structure)

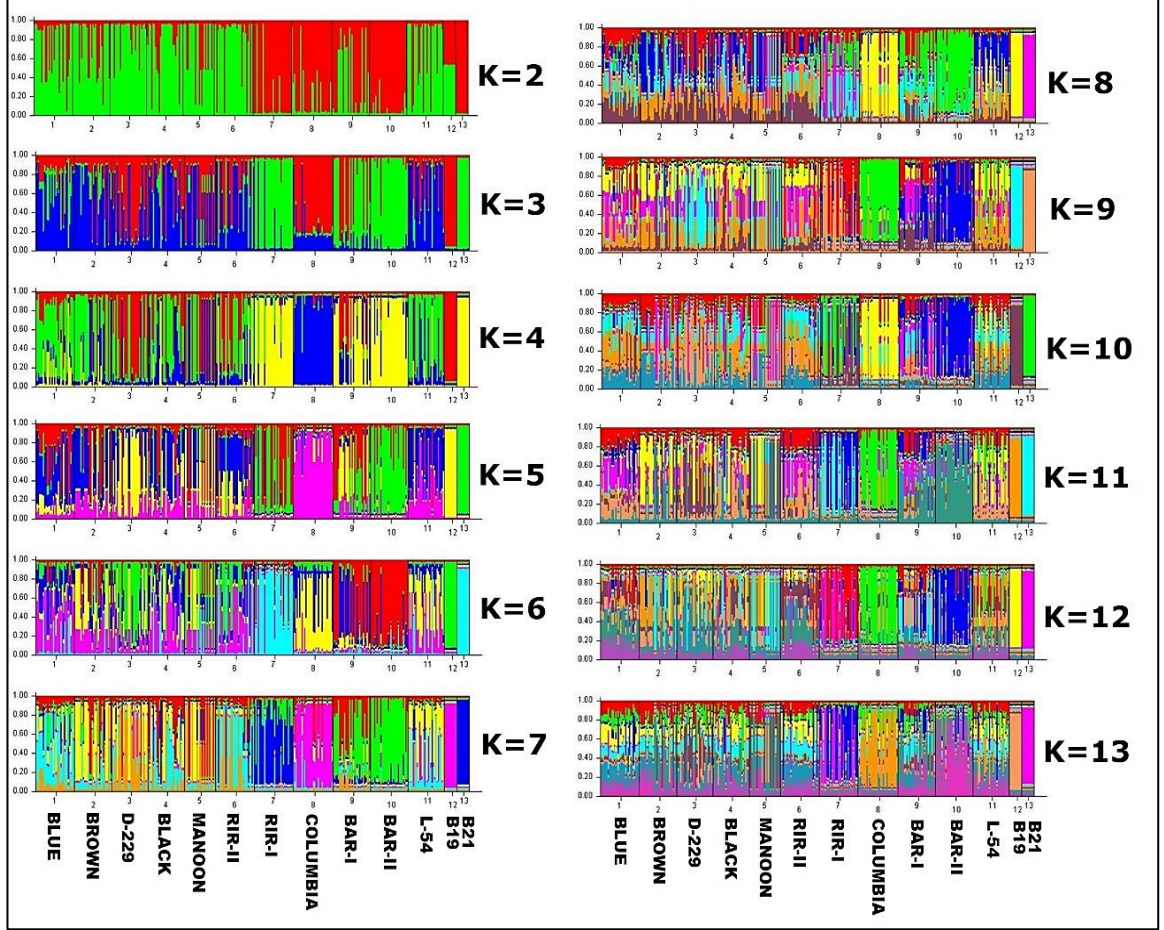
Çalışılan on bir saf tavuk populasyonunun farklılaşması ve sınıflandırılması Bayesian kümeleme analizi kullanılarak STRUCTURE programı ile gerçekleştirilmiştir. Structure yönteminde küme sayısı 2 ile 13 arasında değişen K değerleri için 10.000 tekrarlı bir modeli test etmek için 100 iterasyon yapılarak 100.000 işlem yapılmıştır. En iyi K değerinin tespit edilmesi için web tabanlı bir program olan STRUCTURE HARVESTER (Earl ve Vonholdt 2012) kullanılmıştır. Bu programa göre 2 ile 13 arasındaki K değerlerinde en yüksek ΔK değerinin elde edildiği küme 3 (K=3) olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Structure Harvester programında elde edilen en yüksek ΔK değeri

K değerinin 2 ile 13 arasındaki tüm kümeleri için structure analizi yapılmış ve kümeleme görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.10). K=2 olduğunda RIR-I, Col, BAR-II ve B21 populasyonları diğer populasyonlardan ayrılarak farklı bir küme oluşturmuştur. K=3 olduğunda B19 ve B21 haplotiplerine ait grup tamamen birbirinden ayrılmıştır. RIR-I, BAR-I ve BAR-II ayrı bir küme oluştururken diğer populasyonlar heterojenik bir yapı göstermişlerdir. K=4 ve 5 olduğunda ise Col populasyonu diğer tüm populasyonlardan farklılaşırken RIR-I ve BAR-II populasyonları diğer populasyonlardan farklı bir küme oluşturmuştur. K=6 olduğunda Col, RIR-I ve BAR-II populasyonları da birbirlerinden ayrılarak ayrı ya da tek başlarına farklı bir küme oluşturmuştur. K sayısı artırılarak (K=7-13) yapılan structure analizi sonuçlarına bakılarak daha farklı kümelemenin yapılamadığı tespit edilmiştir. Grup sayısı, çalışılan populasyon sayısına yaklaştıkça ve nihayetinde eşit olduğunda (K=13) analizin duyarlılığı artmış ve birbiri içine girmiş olan ve kesin sınırları bulunmayan bir durumun ortaya çıkmasına neden olmuştur. K=13 olduğunda üzerinde

durulan 11 saf hattın herhangi bir sınırı olmayan heterojen bir genetik yapıya sahip olduğu görülmektedir. Col, RIR-I ve BAR-II dışındaki diğer populasyonların tamamının aynı kümede yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.10. Çalışılan tavuk hatlarında Structure kümeleme analizi görüntüsü

5. SONUÇ

Tavuk MHC sistemi ile ilgili bilgilerin ve bu kompleks yapının tavuk immün sistemi üzerindeki etkisi, MHC 'nin immün sistemi kontrolü üzerinde çalışmalar yapılması yolunu açmıştır. MHC bilgisinin tavuk endüstrisinde kullanımında ilk alan, türlerin saflığını koruma ve garanti altına almak için tavuk türüne özgü genetik markerler olarak kullanılabilmesidir. Tavuk B kan grubu içinde bulunan kan grubu antijenleri yani B kompleksi, genetik marker olmak için iyi birer adaydırlar. MHC bilgisinin ikinci kullanım alanı da tavuklardaki belirli özellikleri iyileştirmek için MHC allelik frekanslarını değiştirme çalışmaları yapılabilmesidir. MHC ve hastalık arasındaki ilişkiyi anlamak, popülasyonları hastalık etkenleriyle doğrudan maruz bırakmak yerine, marker seçilimi yoluyla genetik seçim sağlanabilmektedir. Ayrıca, hastalık patojenlerine daha yüksek direnç gösteren genetik stokların üretimiyle hem hayvan sağlığı hem de gıda güvenliği iyileştirilmiş olmaktadır.

Türkiye ticari saf tavuk popülasyonlarının genetik yapılarının tanımlanmasına yönelik yapılan çalışmalara çok yakın bir zamanda başlanmıştır. DNA düzeyinde yapılacak çalışmalarla Türkiye ticari saf tavuk popülasyonlarının genetik yapıları hakkında daha ayrıntılı bilgilere ulaşılmaktadır. Bu nokta itibarıyla, Türkiye ticari tavuk popülasyonlarındaki genetik çeşitliliğin tanımlanması programlarının geliştirilmesi son derece önemlidir.

Bu araştırmada, Türkiye ticari tavuk popülasyonlarından 11 saf hat, LEI0258 mikrosatelit lokusu bakımından tanımlanmıştır. Türkiye'nin damızlık tavuklarını oluşturan bu popülasyonların incelenmesi, Türkiye ticari saf tavuk popülasyonlarının mevcut genetik yapısının güncel bilimsel yöntemlerle analizinde önemli bir fırsat yaratmıştır. Araştırmada, çalışılan ticari saf tavuk popülasyonları: Rhode Island Red I, Rhode Island Red II, Barred Rock I, Barred Rock II, Line-54, Black Line, Blue Line, Brown Line, D-229 Line, Maroon Line ve Colombian Rock hatlarıdır.

Araştırma sonucunda çok fazla sayıda veri elde edilmiştir. Bu veriler genel olarak değerlendirildiğinde Türkiye ticari tavuk popülasyonlarının genetik yapısı ile ilgili olarak çok önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Araştırmanın evrensel boyuttaki etkisi ise Türkiye ticari tavuk popülasyonlarının tanımlanması noktasındaki uluslararası tavuk biyoinformatik veri toplama merkezine katkı sağlanması olarak tanımlanabilir. Çalışmanın bu yönüyle Türkiye uluslararası alanda edilgen konumdan etken konuma gelmiştir. Araştırma sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

- 1) Polimorfik yapıda olan LEI0258 mikrosatelit lokusunun Türkiye ticari tavuk populasyonlarının tanımlanmasında kullanılabilecek etkin marker olduğu sonucuna varılmıştır.
- 2) Türkiye ticari tavuk populasyonlarının tanımlanmasında kullanılan LEI0258 lokusundan hareketle;
 - a) ortalama allel sayısı (N_a) 39,
 - b) etkili allel sayısı (N_e) 16.27,
 - c) gözlenen heterozigotluk (H_o) 0.527,
 - d) beklenen heterozigotluk (H_e) 0.939,
 - e) polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0.728 ve
 - f) homozigotlaşma katsayısı (F_{is}) 0.276 olarak tahmin edilmiştir.
- 3) Türkiye ticari tavuk populasyonlarında toplam %50.2 (F_{IT}) olarak tespit edilen genetik varyansın %27.6 (F_{IS})'sının populasyonlar içindeki, %31.2 (F_{ST})'sinin ise populasyonlar arasındaki farklılıktan kaynaklandığı tespit edilmiştir.
- 4) Türkiye ticari tavuk populasyonları ikili olarak karşılaştırıldığında populasyonlar arasında ortalama olarak %31.2'lik bir genetik farklılığın var olduğu hesaplanmıştır. Buradan hareketle, Türkiye ticari tavuk populasyonlarının çalışılan LEI0258 mikrosatelit lokusu bakımından birbirlerinden ortalama olarak %31.2'lik bir genetik farklılık gösterdiği ifade edilebilir. En düşük ikişerli F_{ST} değeri Brown ve L-54 hatları arasında (0.034), en yüksek ikişerli F_{ST} değeri Col ve BAR-II hatları arasında (0.329) elde edilmiştir.
- 5) Türkiye ticari tavuk populasyonları arasında her 2 generasyonda ortalama olarak 1.0 bireyin göç ($N_m = 0.551$) ettiği tahmin edilmiştir.
- 6) Türkiye ticari tavuk populasyonları verilerin analizinde kullanılan farklı istatistik yöntemlerine göre farklı kümelemeler halinde sınıflandırılmıştır. Bu nedenle kullanılan istatistik yöntemine göre elde edilen sonuçlar ayrı ayrı ele alınmıştır. İkişerli F_{ST} yöntemlerinden yararlanılarak ticari tavuk populasyonları tek ana grupta sınıflanmıştır.
- 7) Genetik yapı analizi (*structure*) yöntemlerinden yararlanılarak Türkiye ticari tavuk populasyonlarında, Col, RIR-I ve BAR-II dışındaki diğer populasyonların tamamının aynı kümede yer aldığı görülmektedir.

- 8) Yapılan bu kümeleme analizine kontrol amaçlı olarak Amerika Tarım Bakanlığı (USDA; United State Department of Agriculture), Ziraat Araştırma Servisi (ARS; Agriculture Research Service), Kanatlı Hastalıkları ve Kanser Laboratuvarı (ADOL; Avian Disease and Oncology Laboratory)'ndan temin edilen ve B21 (dayanıklı) ile B19 (duyarlı) haplotiplere ait bireylerden elde edilen sonuçlar da dahil edilmiştir. Hem filogenetik ağaçta hem de dendogramda görüldüğü üzere B21 ve B19 haplotipleri çalışılan populasyonlardan çok uzak yerde konumlanmıştır. Her ne kadar kontrol populasyonları farklı ve uzak bir yerde konumlanırsa da B21 (dayanıklı) haplotipine en yakın olan populasyon Rhode Island I (RIR-I) hattıdır. Aynı şekilde B19 (duyarlı) haplotipine en yakın populasyon ise Colombian Rock (Col)'tır. Bu sonuçlara göre üzerinde durulan on bir saf hattın Marek Hastalığı'na karşı en dayanıklı olanın RIR-I, en duyarlı olanın ise Col olduğu sonucuna varılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abendroth, A. Slobedman, B. Lee, E. Mellins, E. Wallace, M. and Arvin, A.M. 2000. Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *Journal of Virology*, 74, 1900–1907.
- Abendroth, A. and Arvin, A.M. 2001. Immune evasion as a pathogenic mechanism of varicella zoster virus. *Semin. Immunol*, 13, 27–39.
- Ahmed, K.A., Saxena, V. K., Saxena, M., Ara, A., Pramod, A.B., Rajaram, M.L., Dorman, K.S., Majumdar, S. and Rasool, T.J. 2007. Molecular Cloning and Sequencing of MHC Class II Beta 1 Domain of Turkey Reveals High Sequence Identity With Chicken. Blackwell Publishing Ltd, *International Journal of Immunogenetics*, 34, 97–105.
- Akman, N., Kumlu, S., Ertuğrul, M., Özkütük, K., Elibol, O., Aksoy, F., Durmuş, İ. ve Erdoğan, G. 2005. Türkiye’de damızlık üretimi ve kullanımı. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi 825-845, 3-7 Ocak, Ankara.
- Akünel, T. 2009. Farklı ticari yumurtacı hibritlerin sürdürülebilirlik açısından incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Aksoy, E. 1992. Kanatlılarda Marek Hastalığı ve Bursal Lezyonlar. *Etlik Vet. Mikrobiol. Derg.*,7:1-12.
- Aksoy, T. Ertuğrul, O., Atasoy, F., Gürler, M., Erdoğan, M. 1998. Denizli Tavuklarının B Kan Grubu Allelleri Üzerinde Bir Araştırma. Tübitak Proje No: VHAG 1173.
- Aksoy, T. 1999. Tavuk Yetiştiriciliği. Şahin Matbaası, Ankara, 111-121 s.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2008. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Dördüncü Baskıdan Çeviri. Garland Science. Taylor and Francis Group, 1392-1410 s.
- Ambagala, A.P., Solheim, J.C. and Srikumaran, S. 2005. Viral interference with MHC class I antigen presentation pathway: the battle continues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107, 1–15.
- Amills M., Ramiya V., Norimine J. and Lewin H.A. 1998. The major histocompatibility complex of ruminants. *Rev. Sci. Tech. - O.I.E. (Off. Int. Epizoot.)* 17: 108-120.
- Anonim 1. <http://arastirma.tarim.gov.tr/tavukculuk/Menu/48/Tarihce>
Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. [Son erişim tarihi: 20.11.2017]
- Anonim 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=genomes&part=A8671>
[Erişim tarihi: 28.11.2017].
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., Özgür, M. ve Diker, K.S. 1994. İmmunoloji. Medisan yayınevi, Ankara, 9-10; 193-200; 209-216 s.
- Arif, I.A and Khan, H.A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildwife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32 (1): 9-17.
- Bacon, L.D., Witter, R.L., Crittenden, L.B., Fadly, A. and Motta, J. 1981 B Haplotype influence on Marek’s disease, Rous sarcoma and lymphoid leucosis virus-induced tumors in chickens. *Poult Sci*, 60:1132–1139.

- Baigent, S.J. and Davison, F. 2004. Marek's disease virus biology and life cycle In: Davison F, Nair V, editors. Marek's disease an evolving problem, Second edition, London: *Elsevier Academic Press*; 62-77.
- Başkaya, H. ve Minbay, A. 1974. Marek Hastalığı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. 299.
- Baykalcı, Y. ve Şimşek, Ü.G. 2014. Yumurta tavukçuluğunda kullanılan yetiştirme sistemleri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28(2):93-98.
- Belkhir, K., Borsa, P. and Chikhi, L. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Biggs, P.M. 1961. A Discussion on the Classification of the Avian Leucosis Complex and Fowl Paralysis. *Br. Vet. J.*, 117:326-334.
- Biggs, P.M., Jackson, C.A.W. and Powell, D.G. 1973. The epizootiology of marek's disease 2. the effect of supply flock, rearing, house and production house on the incidence of marek's disease. *Avian Pathology*, 2:127-34.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnik, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American J. Human Genetics*, 32:314-331.
- Briles, W.E., Stone, H.A. and Cole, R.K. 1977. Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistance and susceptible chicken lines. *Science*, 165:193-195.
- Briles, W.E. and Briles, R.W. 1982 Identification of haplotypes of the chicken major histocompatibility complex (B). *Immunogenetics*, 15:449-459.
- Bruford, M.W. and Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Op. Genet. Devel.* 3: 939-943.
- Bruford, M.W., Bradley, D.G. and Luikart, G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Genetics*, 4: 2-12.
- Burgoyne, G.H. and Witter, R.L. 1973. Effect of Passively Transferred Immunoglobulins on Marek's Disease. *Avian Dis.*, 17:824-837.
- Butler, J.M. 2005. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2nd Edition). *Elsevier Academic Press*, New York.
- Calnek, B.W. and Witter, R.L. 1972. Marek's Disease. Chapter 15. In: *Disease of Poultry*. Ed.: M.S. Hofstad, B.W. Calnek, C.F. Helmboldt, W.M. Reid and H.W. Yoder, 6th Ed. Iowa State University Press. Ames. 470-502.
- Calnek, B.W. and Witter, R.L. 1991. Neoplastic Diseases In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr HW, editors. Diseases of poultry, ninth edition, Iowa, Iowa State University Press; 1991. p. 342-85.
- Calnek, B.W. and Witter, R.L. 1997. Marek's disease. In *Diseases of Poultry*, 363-413.
- Chazara, O., Juul-Madsen, H.R., Chang, C.S., Tixier-Boichard, M. and Bed'hom, B. 2011. Correlation in chicken between the marker LEI0258 alleles and Major Histocompatibility Complex sequence, *BMC Proc*, Suppl4:S29.

- Chazara, O., et al. 2013. Diversity and evolution of the highly polymorphic tandem repeat *LEI0258* in the chicken *MHC-B* region. *Immunogenetics*, 65:447–459.
- Cheng, H.H. 2003. Selection for disease resistance: Molecular genetics techniques. *In Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology*, Ed: Muir W.M. and Aggrey S.E. CABI Publishing, p: 385
- Cheng, H.H., Zhang, Y. and Muir, W.M. 2007. Evidence for widespread epistatic interactions influencing Marek's disease virus viremia levels in chicken. *Cytogenet. Genome Research*, 117; 313–318.
- Churchill, A.E., Chubb, R.C. and Baxendale, W. 1969. The attenuation, with loss of oncogenicity, of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *Journal of General Virology*, 4; 557–564.
- Crawfords, R.D. 1990. Poultry Breeding and Genetics. *Elsevier Sci*, 1123, USA.
- Çınar, H. 2007. Kanatlı Eti ve Yumurta. *TEAE-Bakış*. 9 (14), Ankara.
- Çiçekgil, Z. ve Yazıcı, E. 2016. Türkiye'de tavuk yumurtası mevcut durumu ve üretim öngörüsü. *TEAD*, 2016; 2(2): 26-34.
- Dalgaard, T.S., Hojsgaard, S., Skjodt, K., Juul-Madsen, H.R. 2003. Differences in Chicken Major Histocompatibility Complex(MHC) Class Ia Gene Expression Between Marek's Disease -Resistant and- Susceptible MHC Haplotypes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 57: 135-143.
- Dalva, K. 2004. Her yerde karşında; nedir bu HLA tiplendirimi. XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu, 23-28 Eylül 2004, Antalya.
- Diker, K.S. 1998. İmmunoloji. Medisan yayınevi. Ankara. 73-85; 105-112 s.
- Durmuş, L., Sarıca, M., Aktan, S., Yıldız, T., Kahraman, Z. Ve Ertaş, S., 2008. Geliştirilmekte olan yerli ticari yumurtacı hibritlerin verim özelliklerinin belirlenmesi, *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 8(1):15-9.
- Earl, D.A. and Vonholdt, B.M. 2012. Structure harvester; a web-site and program for visualizing structure output and implementing the evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4 (2):359-361.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 5: 435-445.
- Emara, M. G., Kim, H., Zhu, J., Lapierre, R. R., Lakshmanan, N. and Lillehoj, H. S. 2002. Genetic Diversity at the Major Histocompatibility Complex (*B*) and Microsatellite Loci in Three Commercial Broiler Pure Lines. *Poultry Science*, 81: 1609–1617.
- Engel, A.T., Selvaraj, R.K., Kamil, J.P., Osterreider, N. and Kaufer, B.B. 2012. Marek's disease viral interleukin-8 promotes lymphoma formation through targeted recruitment of B cells and cd4 cd25 t cells. *J. Virol.*, 86:8536-45.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of cluster of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.

- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2006. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. University of Bern, Institute of Zoology, Switzerland.
- FAO 2013. <http://faostat.fao.org/faostat>. [Erişim Tarihi: 18.11.2017].
- Fatima, S. 2006. Study of genetic variability among Gohilwadi, Surti and Zalawadi Goats using microsatellite analysis. Master of Veterinary Science in Animal Genetics and Breeding. Master's thesis, Department of Animal Genetics and Breeding, College of Veterinary Science and Animal Husbandry Anand Agriculture University, Anand.
- Fulton, J.E., Juul-Madsen, H.R., Ashwell, C.M., McCarron, A.M., Arthur, J.A., O'Sullivan, N.P. and Taylor, R.L. 2006. Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 58, 407–421.
- Fulton, J.E., Lund, A.R., McCarron, A.M., Pinegar, K.N., Korver, D.R., Classen, H.L., Aggrey, S., Utterbach, C., Anthony, N.B., Berres, M.E. 2016. MHC variability in heritage breeds of chickens. *Poultry Science*, 95, 393–399.
- Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempé, P., van Endert, P.M., Tampé, R., Peterson, P.A. and Yang, Y. 1995. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*, 375, 415–418.
- Gao, C., han, L., Han, J., Liu, J., Jiang, Q., Guo, D. and Qu, L. 2015. Establishment of six homozygous MHC-B haplotype populations associated with susceptibility to Marek's disease in Chinese specific pathogen-free BWEL chicken. *Infection, Genetics and Evolution*, 29:5–25.
- Gimeno, I.M., Witter, R.L., Hunt, H.D., Lee, L.F., Reddy, S.M. and Neumann, U. 2001. Marek's disease virus infection in the brain: virus replication, cellular infiltration, and major histocompatibility complex antigen expression. *Vet. Pathol*, 38, 491–503.
- Guillemot, F., Billault, A., Pourquie, O., Behar, G., Chausse, A.M., Zoorob, R., Kreibich, G. And Auffray, C. 1988. A Molecular Map of the Chicken Major Histocompatibility Complex: the Class II β Genes are Closely Linked to the Class I Genes and the Nucleolar Organizer. *The EMBO Journal*. 7: 2775–2785.
- Gün, F.D. 2007. Meme Kanseri Patogenezinde MHC Sınıf-2 Moleküllerinin Rolü. Uzmanlık tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- Gürel, A. ve Yeşildere, T. 1993. Civcivlerde Deneysel Oluşturulan Marek Hastalığında Bursa Fabricius Lezyonları. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 19:183-195.
- Gürel, A., Arun, S.S., Kuşçu, B. ve Yeşildere, T. 2003. Tavuklarda Spontan Marek Hastalığının Histopatolojik ve İmmunoperoksidaz Yöntemle Teşhisi Üzerine Çalışmalar. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, 27:861-872.
- Han, B., Lian, L. Qu, J. Zheng, and N. Yang. 2013. Abundant polymorphisms at the microsatellite locus LEI0258 in indigenous chickens. *Poult. Sci*, 92:3113–3119.

- Hansen, M.P., Zant, J.N. and Law, G.R.J. 1967. Differences in Susceptibility to Marek's Disease in Chickens Carrying Two Different B Blood Group Alleles. *Poultry Sci.* 46: 1268.
- Hartl, D.L. and Clark, A.G. 2007. Principles of Population Genetics, Fourth Edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Haq K. 2012. Investigating the Role of Cytokines in Immunity to Marek's Disease. Master's thesis. The University of Guelph. Ontario.
- Havenstein, G.B., Ferket, P.R. and Qureshi, M.A. 2003. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, 82; 1509-1518.
- Hegde, N.R., Chevalier, M.S. and Johnson, D.C. 2003. Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol.*, 24, 278–285.
- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H., Johnson, D. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*, 375, 411- 415.
- Hillel, J. et al. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*, 35: 533-557.
- Howard, E.B., Jannke, C., Vickers, J. and Kenyon, A.J. 1967. Elevated gamma globulin levels in Marek's disease (neural lymphomatosis) of domestic fowl. *Cornell Veterinary.*, 57(2); 183-194.
- Hunt, H.D., Lupiani, B., Miller, M.M., Gimeno, I., Lee, L.F. and Parcells, M.S. 2001. Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B Complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. *Virology*, 282, 198–205.
- Huson, D.H. and Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23(2):254-67.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium et al. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, 432, 695-716.
- Izadi, F., Ritland, C. and Cheng, K.M. 2011. Genetic diversity of the major histocompatibility complex region in commercial and noncommercial chicken flocks using the LEI0258 microsatellite marker. *Poultry Science*, 90 :2711–2717
- Joukhadar, R. and Jighly, A. 2012. Microsatellites grant more stable flanking genes. *BMC Research Notes*, 5 (556):1- 4.
- Kannaki, T.R., Reddy, M.R., Raja Ravindra, K.S. and Chatterjee, R.N. 2016. Genetic diversity analysis of the major histocompatibility complex (MHC) region in Indian native chicken breeds and pureline chickens using the LEI0258 microsatellite marker. *Indian J. Anim. Res.*, 51(6):998-1001.
- Karslı, T., Karabağ, K. ve Balcıoğlu, M.S. 2013. Çiftlik hayvanlarında DNA teknolojileri ve biyoteknoloji kullanımı. İç Anadolu Bölgesi 1. Tarım ve Gıda Kongresi. Cilt III (Hayvansal Üretim), 46-52, 2-4 Ekim, Niğde.

- Karslı, T. 2015. Ankara Tavukçuluk Araştırma İstasyonu'nda Bulunan Kahverengi Yumurtacı Saf Hatlarda Genetik Varyasyonun Mikrosatelit Markerler Kullanılarak Belirlenmesi. Doktora tezi. Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Kato, S. and Hirai, K. 1985. Marek's Disease Virus. *Adv. Virus Res.*, 30:225-277.
- Kaup B.F. 1921. Paralysis of the Domestic Fowl. *J Am. Assn. of Instructors and Invest. in Poultry Husbandry*, 7;25.
- Kaya, M. 2008. Denizli ve Gerze tavuk populasyonlarındaki genetik çeşitliliğin bazı mikrosatelit markörler kullanılarak belirlenmesi. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Keleş, H. 2007. Tavuklarda Marek Hastalığının patolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle tespiti. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. 2011. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 677s.
- Koca, S. 2014. Beyaz et ihracatı: sorunlar ve hedefler. TUYEM 12.Uluslararası Yem Kongresi, 20-23 Nisan, Kundu, Antalya.
- Köküslü, C. ve Özkul, İ.A. 1977. Ankara, Bursa ve İzmir Yörelerinde Tavuklarda Rastlanan Tümörlerin Tipleri ve Yayılışı. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 14:51-65.
- Köküslü, C. ve Özkul, İ.A. 1978. Tavuk Deri Biopsilerinde Deri, Tüy Follikül Epitelleri ve Otopsi Bulgularının Histopatolojik İncelenmesi ile Marek Hastalığının Teşhisi Üzerinde Araştırmalar. *A.Ü.Vet. Fak. Derg.*, 15:383-397.
- Lamont, S.J. 1989. The Chicken Major Histocompatibility Complex in Disease Resistance and Poultry Breeding. *Journal of Dairy Science*, 72, 1328-1333.
- Lee, L.F., Lupiani, B., Silva, R.F., Kung, H.J. and Reddy, S.M. 2008. Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine*, 26; 1887-1892.
- Lenger, Ö.F. 2011. Türkiye'deki yerli tavuk ırkları ve ticari tavuk tipleri arasındaki, MHC gen bölgesindeki genetik farklılıkların belirlenmesi. Doktora tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar.
- Li, X.X., Han, L.X. and Han, J.L. 2010. No Specific Primer Can Independently Amplify the Complete Exon 2 of Chicken BLB1 or BLB2 Genes. *International Journal of Poultry Science*, 9 (2): 192-197.
- Lima-Rosa, C. AdV., Canal, C.W., Fallavena, P.R.V., Freitas, L.Bd. and Salzano, F.M. 2005. LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Genet. Mol. Biol.*, 28:386-389.
- Liu, K. and Muse, S.V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21(9):2128-29.
- Liu, H.C., Niikura, M., Fulton, J. and Cheng, H.H. 2003. Identification of chicken stem lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E, alias SCA2) as a putative Marek's disease resistance gene via a virus-host protein interaction screen. *Cytogenet. Genome Research.*, 102; 304-308.

- Lwelamira J, Kifaro GC, Gwakisa PS, Msoffe PLM 2008. Association of LEI0258 microsatellite alleles with antibody response against newcastle disease virus vaccine and body weight in two Tanzania chicken ecotypes. *Afr J Biotechnol*, 7:714–720.
- Marek, J. 1907. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Huhnern. *Dtsh. Tierarztl. Wschr.*, 15:417-421.
- McConnell, S.K.J, Dawson, D.A., Wardle, A. and Burke, T. 1999. The isolation and mapping of the 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. *Animal Genetics*, 30:183-189.
- McElroy J. P., et al. 2005. Microsatellite markers associated with resistance to Marek's disease in commercial layer chicken. *Poult. Sci.* 84:1678–1688
- Meydan, H. 2007. Türkiye’de Yetiştirilen Siyah Alaca Sığır Irkında Lökosit Adhezyon Yetersizliği (BLAD; Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency)’nin PRC-RFLP Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Meydan, H., Yildiz M.A., Dodgson J.B., Cheng H.H., 2011. Allele-specific expression analysis reveals CD79B has a cis-acting regulatory element that responds to Marek’s disease virus infection in chicken. *Poultry Science*, 90, 1206–1211.
- Meydan, H. 2012. Tavuklarda Marek Hastalığının SNP genetik markerlerinden yararlanılarak araştırılması. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Mısırlıoğlu Z. 2009. Marek Hastalığı ve Düşündürdükleri. Hayvancılık Haber. <http://www.hayvancilikhaber.com/yazar/2009-z-misirlioglu-marek-hastaligi-edusundurdukleri.html>. [Erişim tarihi: 24.10.2017].
- Mızrak, C., Göger, H., Boğa, A.G. ve Durmuş, İ. 2007. Türkiye’de yumurtacı damızlık ve hibrit üretim çalışmaları. AB Kriterlerine Uyum Sürecinde Türkiye Tavukçuluğu Sempozyumu, 143-152, E.Ü. Ziraat Fakültesi, İzmir.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesk, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3):1215.
- Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman J.W. and Sedmak, D.D. 1998. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/ Stat pathway. *J. Exp. Med.*, 187, 675–683.
- Miller, M.M., Bacon, L.D., Hala, K., Hunt, H.D., Ewald, S.J., Kaufman, J., Zoorob, R. and Briles, W.E. 2004. Nomenclature for the Chicken Major Histocompatibility (B and Y) Complex. *Immunogenetics*, 56: 261–279.
- Miller, M.M. 2005. Mapping MHC Genes Linked with Resistance to Tumors Induced by Marek’s Disease Virus Infections. International Workshop on Animal Genome November 9, 2005.
- Minbay A. 2002. Marek hastalığı, In: İzgür M, Akan M, editors. Kanatlı hayvan hastalıkları, Medisan Yayınları, 1. Basım. Ankara, 2002, 195-200.
- Minvielle, F., Kayang, B.B., Inoue-Murayama, M., Miva, M., Vignal, A., Gourichon, D., Neau, A., Monvoisin, J.L. and Ito, S. 2005. Microsatellite mapping of QTL

- affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail. *BMC Genomics*, 6 (87):1-9.
- Morrow, C. and Fehler, F. 2004. Marek's disease: a worldwide problem In: Davison F, Nair V, editors. Marek's disease an evolving problem, Second edition, *London, Elsevier Academic Press*; 49-61.
- Nair, V. and Payne, L.N. 1995. Molecular pathogenesis of Marek's disease recent developments. *Avian Pathology*, 24:597-609.
- Nair, V. 2004. Evolution of Marek's disease- A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *The Veterinary Journal* .175-183.
- Nair, V, Jones, R.C. and Gough, R.E. 2008. Herpesviridae, In: Pattison M, McMullin PF, Alexander DJ, editors. Poultry disease, Saunders Elsevier, Sixth Edition, 258-67.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*,106:283-292.
- Nei, M. 1977. F-istatistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41(2):225-233.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York.
- Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, pp:103-111.
- Nikbakht, G. and Esmailnejad, A. 2015. Chicken major histocompatibility complex polymorphism and its association with production traits. *Immunogenetics*, 67:247-252.
- Osterrieder, N., Kamil, J.P., Schumacher, D., Tischer, B.K. and Trap, S. 2006. Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature Rev. Microbiology*, Vol. 4; pp.283-294.
- Owen JP, Delany ME, Cardona CJ, Bickford AA, Mullens BA. 2009. Host inflammatory response governs fitness in an avian ectoparasite, the northern fowl mite (*Ornithonyssus sylviarum*). *Int J Parasitol*, 39: 789-799.
- Öztürk, A.K. ve Türkoğlu, M. 2012. Türkiye'de organik tavukçuluk. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 52 (1): 41-50.
- Pamukçu, A.M. ve Başkaya, H. 1952. Leucosis Complex. I. Ankara'da Tavuklarda Görülen Visceral Lymphomatosis Olayları. Tarım Bakanlığı Tavukçuluk Enstitüsü Yayınları, No, 11, Araştırmalar: 2. Yeni Matbaa, Ankara, 1-31 s.
- Passarge, E. 1995. *Color Atlas of Genetics*. (Second Edition). Thieme Press., New York.
- Pritchard, J.K., Matthew, S. and Donnelly, P. 2000. Inference og populations structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2): 945-959.
- Report of the AAAP. 1967. Sponsored leukosis workshop. *Avian Dis.*, 11:694-702.
- Salomonsen, J., Sorensen, M.R., Marston, D.A., Rogers, S.L., Collen, T., Hateren, A.V., Smith, A.L., Beal, R.K., Skjødt, K. and Kaufman, J. 2005. Two CD1 Genes Map

- to the Chicken MHC, Indicating that CD1 Genes are Ancient and Likely to have been Present in the Primordial MHC. *PNAS*, 102:24,8668-8673.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Schat, K.A., Calnek, B.W., Fabricant, J. and Abplanalp, H. 1981. Influence of oncogenicity of Marek' disease virus on evaluation of genetic resistance. *Poultry Science*, 60; 2559-2566.
- Schat, K.A., Chen, C.L., Calnek, B.W. and Char, D. 1991. Transformation of t-lymphocyte subsets by marek's disease herpesvirus, *J. Virol*, 65:1408-13.
- Schat, K.A. and Xing, Z. 2000. Specific and non-specific immune responses to Marek's disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 24;201-221.
- Schlotterer, C. and Harr, B. 2001. Microsatellite instability. In: Encyclopedia of Life Sciences. *Nature Publishing Group*, 1-4.
- Schou TW, Permin A, Juul-Madsen HR, Sorensen P, Labouriau R, Nguyen TL, Fink M, Pham SL. 2007. Gastrointestinal helminths in indigenous and exotic chickens in Vietnam: association of the intensity of infection with the major histocompatibility complex. *Parasitology* ,134:561-573.
- Sharma, J.M., Witter, R.L. and Burmester, B.R. 1973. Pathogenesis of Marek's Disease in Old Chickens: Lesion Regression as the Basis for Age-Related Resistance. *Infect. Immun.*, 8:715-724.
- Shiina, T., Hosomichi, K. and Hanzawa, K. 2006. Comparative Genomics of the Poultry Major Histocompatibility Complex. *Animal Science Journal*, 77: 151-162.
- Snell, G.D. 1981. Studies in Histocompatibility. *Science*. 213: 172-178.
- Solinac, R. et al. 2010. Integrative mapping analysis of chicken microchromosome 16 organization. *BMC Genomics*, 11:616.
- Şengör, E. 2015. Türkiye'de Beyaz Et Üretimini Tarihi. BESD-BİR Yayınevi, Ankara.
- Tadano, R. Kinoshita, K. Mizutani, M. and Tsudzuki, M. 2014. Comparison of microsatellite variations between Red Junglefowl and a commercial chicken gene pool. *Poultry Science*, 93 (2): 318-325.
- Temiz, N. 2005. Akdeniz Bölgesinde HLA (Human Leucocyte Antigens) Tipleri ve Sıklığının Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş.
- Teneva, A. 2009. Molecular markers in animal genome analysis. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25 (5-6): 1267-1284.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu). 2016. Hayvancılık İstatistikleri Veri Tabanı http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002 [Erişim tarihi: 20.11.2017].
- The Taxonomicon. 2006. <http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/TaxonTree.aspx?id=214571&tree=0.1> [Erişim tarihi: 17.11.2017].
- The Taxonomicon. 2013. <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=214571>. [Erişim tarihi: 15.11.2017].

- Trgovcich, J., Johnson, D. and Roizman, B. 2002. Cell surface major histocompatibility complex class II proteins are regulated by the products of the $\gamma(1)$ 34.5 and U(L)41 genes of herpes simplex virus 1. *J. Virol.*, 76, 6974–6986.
- Van Der Walle N. and Winler-Jenius E. 1924. De neuritis epizootie bij kippen de Barneveld in 1921. *Tijdscher. Voor verg. Jeneesk.* 10; 34.
- Wang, H., Ma, T., Chang, G., Wan, F., Liu, X., Liu, L., Xu, L., Chen, J. and Chen, G. 2014. Molecular Genotype Identification of Different Chickens: Major Histocompatibility Complex. *The Open Access Journal of Science and Tech.*2:7.
- Weber, J. L. and May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed by the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388-389.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6):1358-1370.
- Witter, R.L., Sharma, J.M., Solomon, J.J. and Champion, L.R. 1973. An age related resistance of chickens to Marek's disease Some preliminary observations. *Avian Pathology*, 2:43-54.
- Witter, R.L. and Schat, K.A. 2003. Marek's disease In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E., editors. *Diseases of poultry*, eleventh edition, Iowa, Iowa State University Press, 407-65.
- Witter, R.L., Calnek, B.W., Buscaglia, C., Gimeno, I.M. and Schat, K.A. 2005. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype philosophy and methodology. *Avian Pathology*,34:75-90.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations, Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1997. POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Yavuz, O. 2014. Konya ve Afyon bölgesindeki ticari tavuk işletmelerinde Marek Hastalığının histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. Doktora tezi. Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Zekerias, B., Ter Huurne, A.A.H.M., Landman, W.J.M., Rebel, J.M.J., Pol, J.M.A. and Gruys, E. 2002. Immunological Basis of Differences in Disease Resistance in the Chicken. *Vet. Res*, 33: 109–125.

ÖZGEÇMİŞ

BEGÜM EVCI

begumevci1@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2016-	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Avrasya Üniversitesi
2011-2015	Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Trabzon