

Bir Siyah Kuğuda (*Cygnus atratus*) PZR ile Cinsiyet Tespiti

Faruk BOZKAYA^{1*}, Osman Yaşar TEL², Bestami YILMAZ³

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Şanlıurfa, Türkiye.

³Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 03.06.2014

Kabul Tarihi: 30.06.2014

Özet: Bu çalışmada, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne getirilen bir siyah kuğunun (*Cygnus atratus*) cinsiyetinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla CHD (chromodomain-helicase-DNA-binding) lokusunun hedef bölgesi iki farklı primer çifti (1237L-1272H ve P2-P8) yardımıyla PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve PZR ürünleri agaroz jel elektorofrezi ile ayrıldı. Her iki primer çifti ile elde edilen PZR ürünleri için agaroz jelde farklı uzunlukta iki bant gözlemlendi. Kuğunun dişi olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Siyah Kuğu, *Cygnus atratus*, cinsiyet, PZR

Identifying the Gender of a Black Swan (*Cygnus atratus*) by Using PCR

Abstract: The aim of the present study was to identify the gender of a black swan (*Cygnus atratus*) which was brought to Harran University Faculty of Veterinary Medicine by using polymerase chain reaction (PCR) technique. Target region of CHD (chromodomain-helicase-DNA-binding) locus was amplified with PCR by using 1237L-1272H or P2-P8 primer pairs and PCR products were separated by using agarose gel electrophoresis. On agarose gel two bands were observed for both primer pairs. The results indicated that the swan was female.

Key words: Black swan, *Cygnus atratus*, gender, PCR

Giriş

Birçok kuş türünde morfolojik olarak cinsiyetin belirlenmesi oldukça zordur. Cinsiyetin belirlenmesi amacıyla kullanılan kloaka muayenesi gibi geleneksel yöntemler incelenen hayvan açısından zararlı olabilmektedir (He ve ark., 2005). Kuşlarda dişiler heterogametik (ZW), erkekler ise homogametiktir (ZZ) (Clinton, 1998). Bu nedenle kuşlarda cinsiyet tayini amacıyla moleküler genetik yöntemler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir çok kuş türünde DNA düzeyinde cinsiyet tayini amacıyla cinsiyet kromozomu üzerinde alan CHD (chromodomain-helicase-DNA-binding) geni markör olarak kullanılmış ve hedef bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (PZR) ile çoğaltılması amacıyla değişik primer çiftleri (1237L-1272H veya P2-P8) tanımlanmıştır (Clinton, 1994; Griffiths ve Tiwari, 1995; Petite ve Kegelmeyer, 1995; Griffiths ve ark., 1996, 1998; Fridolfson ve Ellegren, 1999; Haunshi ve ark., 2008; Bozkaya ve ark., 2013). Yaklaşık 6800 baz çifti büyüklüğünde olan CHD geni bir intron tarafından ayrılan iki exondan oluşur ve 1800 amino asitten oluşan bir proteini kodlar (Griffiths ve Korn 1997; Agate et al. 2004). Bu primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR işleminde incelenen çok sayıda kuş türlerinin erkeklerinde bir, dişilerinde ise iki farklı bant

gözlenmektedir. Bu çalışmanın amacı Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne getirilen bir siyah kuğunun (*Cygnus atratus*) cinsiyetinin CHD lokusunda 1237L-1272H ve P2-P8 primerleri yardımıyla PZR yöntemi ile belirlenmesidir.

Olgu Tanımı

Veteriner Fakültesine getirilen yetişkin bir siyah kuğunun (*Cygnus atratus*) kanat altı venasından bir lanset yardımıyla yaklaşık 50 µl kan örneği EDTA içeren steril bir tüp içerisine alındı. Elde edilen kan örneğinden Bozkaya'nın (2012) bildirdiği yöntem ile DNA izolasyonu yapıldı. Hedef bölge olan CHD lokusunun çoğaltılması amacıyla kullanılan primer çiftlerinin (1237L-1272H ve P2-P8,) baz dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

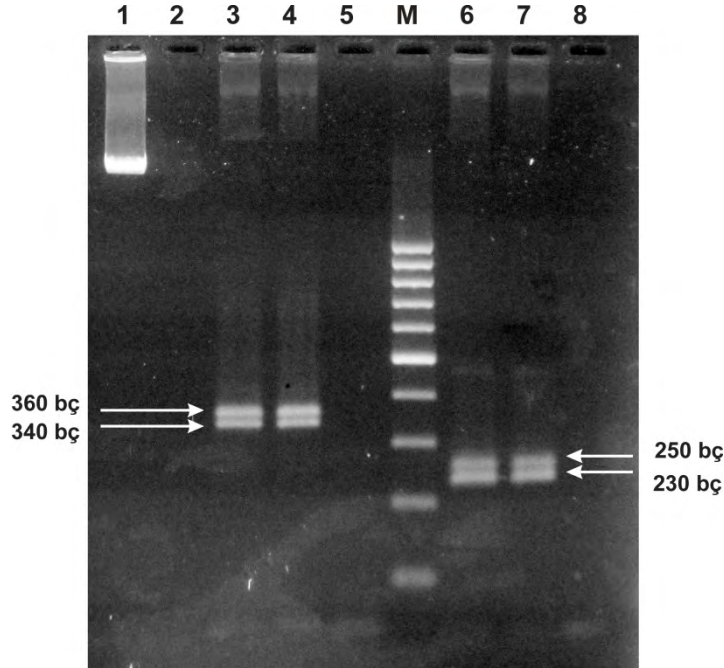
Hedef bölgenin çoğaltılması amacıyla PZR işlemi 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı; 0,4 µM primer, 200 µM dNTP, 3 mM MgCl₂, 2,5 U DNA polimeraz (Thermo Scientific, Espoo, Finland) ve 1X tampon şeklinde hazırlandı. Başlangıçta 94 °C'de 5 dakika daha sonra 10 döngü 94 °C'de 30 sn, 60 °C'den 50 °C'ye her döngüde 1 °C azalacak şekilde 30 sn, 72 °C'de 30 sn ve 25 döngü 94 °C'de 30 sn, 50 °C'de 30 sn ve

72 °C'de 30 sn'lik PCR programı uygulandı. Son zincir uzaması adımı 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde uygulandı. Elde edilen PZR ürünleri %4'lük

agaroz jel elektroforezinde etidium bromid ile boyanarak incelendi.

Tablo 1. PZR işleminde kullanılan primerlerin baz dizisi.

Primer adı	Baz dizisi (5'-3')	Kaynak
1237L	GAGAAACTGTGCAAAACAG	Griffiths ve ark., (1998)
1272H	TCCAGAATATCTTCTGCTCC	
P8	CTCCAAGGATGAGRAAYTG	Ellegren, (1996)
P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	



Şekil 1. 1237L-1272H ve P2-P8 primer çiftleri yardımıyla çoğaltılan PZR ürünlerinin %4'lük agaroz jeldeki görünümü: 1: Kuğu'ya ait genomik DNA, 2: Boş; 3 ve 4: P2-P8 primeri ile elde edilen PZR ürünleri; 5: Negatif kontrol; 6 ve 7: 1237L-1272H primerleri ile elde edilen PZR ürünleri; 8: Negatif kontrol; M: 100 bp merdiven

Tartışma ve Sonuç

İncelenen örnekte CHD geninin hedef bölgesi hem 1237L-1272H hem de P2-P8 primer çiftleri yardımıyla çoğaltıldı. Agaroz jelde, 1237L-1272H primerleri kullanıldığında yaklaşık 230 ve 250 baz çifti, P2-P8 primerleri kullanıldığında ise yaklaşık 340 ve 360 baz çifti uzunluğunda bantlar gözlemlendi (Şekil 1). Bulgular incelenen kuğunun W kromozomu taşıdığını ve dişi olduğunu göstermiştir. He ve ark. (2005), siyah kuğuda (*Cygnus atratus*) CHD lokusunun baz dizisini tespit etmiş ve Z ve W kromozomları üzerindeki CHD lokusları arasında 21 baz çifti büyüklüğünde bir fark olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada elde edilen bantlar arasındaki fark He ve ark. (2005) tarafından bildirilenle uyumlu bulunmuştur. Bu araştırmacılar siyah kuğuda, CHD lokusunda, allel spesifik PZR

yöntemi ile cinsiyetin tespit edilebileceğini bildirmiştir. Ancak 1237L-1272H veya P2-P8 primer çiftleri yardımıyla bir çok kuş türünde cinsiyet tespiti yapılabilmektedir (Jensen et al., 2003; Wang et al., 2007).

Bu çalışmada, kontrol olarak erkek bir bireye ait örnek bulunmamaktadır. Bununla birlikte bu primer çiftleri kullanılarak yapılan PZR işleminde incelenen çok sayıda kuş türlerinin erkeklerinde bir, dişilerinde ise iki farklı bant gözlenmektedir (Griffiths ve ark., 1996, 1998; Ellegren ve ark., 1996). Sunulan çalışmada kullanılan primer çiftleri kuşlarda cinsiyet tespiti amacıyla başka araştırmacılar tarafından da yaygın olarak kullanılmıştır (Kahn ve ark., 1998; Jensen ve ark., 2003). Ancak CHD lokusunun aynı bölgesini çoğaltmak amacıyla başka primer çiftleri de kullanılabilir (Fridolfson ve Ellegren, 1999).

Sunulan çalışmada kullanılan primerler aynı bölgenin farklı kısımlarına uyumlu olmakla birlikte Z ve W kromozomları arasında aynı uzunlukta fark göstermektedir (Jensen ve ark., 2003). Bu çalışmada kullanılan 1237L-1272H primer çifti ile incelenen aralarında *Cygnus atratus* türünün de bulunduğu 80 kuş türünün %78,75'inde cinsiyet tespiti yapılabildiği bildirilmektedir (Wang ve ark., 2007).

Sonuç olarak çalışmaya konu olan kuğunun dişi cinsiyette olduğu ve 1237L-1272H veya P2-P8 primer çiftlerinden herhangi birisi yardımıyla ve PZR yöntemi ile siyah kuğuda cinsiyetin tespit edilebileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- Agate RJ, Choe M, Arnold AP, 2004: Sex differences in structure and expression of the sex chromosome genes CHD1Z and CHD1W in zebra finches. *Mol Biol Evol*, 21, 384-396.
- Bozkaya F, 2012: DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi. *Harran Univ. Vet. Fak. Derg*, 1, 92-96.
- Bozkaya F, Gürler Ş, Yertürk M, Aydilek N, 2013: Isolation of DNA from embryo and chorio-allantoic membranes and sexing by PCR in Japanese quail. *British Poultry Sci*, 54, 106-111.
- Clinton M, 1994: A rapid protocol for sexing chick embryos (*Gallus g. domesticus*). *Anim Genet*, 25, 361-362.
- Clinton M, 1998: Sex determination and gonadal development: A bird's eye view. *J Exp Zool*, 281, 457-465.
- Ellegren H, 1996: First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag universal sexing of non-ratite birds. *P Roy Soc Lond B Bio*, 263, 1635-1641.
- Fridolfson AK, Ellegren H, 1999: A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol*, 30, 116-121.
- Griffiths R, Korn RM, 1997: A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*, 197, 225-229.
- Griffiths R, Tiwari B, 1995: Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 375, 454.
- Griffiths R, Daan S, Dijkstra C, 1996: Sex identification in birds using 2 CHD genes. *P Roy Soc Lond B Bio*, 263, 1241-1256.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG, 1998: A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol*, 7, 1071-1075.
- Haunshi S, Pattanayak A, Bandyopadhyaya S, Saxena SC, Bujarbaruah KM, 2008: A Simple and quick DNA extraction procedure for rapid detection of sex of chicken and chicken embryos. *J Poultry Sci*, 45, 75-81.
- He PJ, Yu JQ, Fang SG, 2005: Sex Identification of the Black Swan (*Cygnus atratus*) using the Locus-specific PCR and Implications for its Reproduction. *Reprod Domest Anim*, 40, 196-198.
- Jensen T, Pernaesetti FM, Durrant B, 2003: Conditions for Rapid Sex Determination in 47 Avian Species by PCR of Genomic DNA From Blood, Shell-Membrane Blood Vessels, and Feathers. *Zoo Biol*, 22, 561-571.
- Kahn NW, John ST, Quinn TW, 1998: Chromosome specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *Auk*, 115, 1074-1078.
- Petitte JN, Kegelmeyer AE, 1995: Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Anim Biotechnol*, 6, 119-130.
- Wang LC, Chen CT, Lee HY, Li SH, Lir JT, Chin SC, Pu CE, Wan CH 2007: Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with a unified reaction condition. *Zoo Biol*, 26, 425-431.

***Yazışma Adresi:** Faruk BOZKAYA

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Eyyübiye Yerleşkesi, Şanlıurfa, Türkiye
e-mail: farukbozkaya@yahoo.com