



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Mikrosatellit lokuslarının tavuk ve güvercinlerde karşılaştırmalı analizi

Gülseren Yıldız Öz¹, Sema Çakır¹, İsmail Kurhan¹, Müge Doğan², Elif Şahin²,
Mehmet Nizamlıoğlu², Ercan Kurar^{3,4*}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, ²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, ³Genetik Anabilim Dalı, 42075,

⁴Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 42080, Konya, Türkiye

Geliş: 25.09.2014, Kabul: 03.11.2014

*ekurar@konya.edu.tr

Öz

Öz Yıldız G, Çakır S, Kurhan İ, Doğan M, Şahin E, Nizamlıoğlu M, Kurar E. Mikrosatellit lokuslarının tavuk ve güvercinlerde karşılaştırmalı analizi.

Abstract

Oz Yildiz G, Cakir S, Kurhan I, Dogan M, Sahin E, Nizamlioglu M, Kurar E. Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and pigeon.

Eurasian J Vet Sci, 2015, 31, 1, 43-50
DOI: 10.15312/EurasianJvetSci.201518476

Amaç: Bu çalışmanın amacı, tavuk mikrosatellit markörlerinin güvercin (*Columba livia*) genetik çalışmaları için kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 100 adet tavuk mikrosatellit markörü tavuk bağlantı haritalarından seçildi. Güvercin ve pozitif kontrol olarak tavuk DNA'sı kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile spesifik genom bölgeleri çoğaltıldı. PZR ürünleri kapiller elektroforez ile ayrıştırıldı ve allel genotipleri tespit edildi. Pilot bir çalışma ile 24 adet pozitif mikrosatellitin genel populasyon parametrelerinden allel sayısı (Na), gözlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk ile Hardy-Weinberg Dengesi'nden (HWE) sapma değerleri güvercin populasyonunda değerlendirildi.

Bulgular: Toplam 48 mikrosatellit lokusu güvercin DNA'sında (%48) PZR ile yükseltgenmiştir. Pilot çalışma kapsamında 24 lokusun ortalama allel sayısı 2.5 olup allel sayısı 1-5 arasında değişmektedir. Toplam 60 farklı allel tespit edilmiştir. Ho ve He değerleri sırasıyla 0.000-1.000 ve 0.000-0.698 arasında değişmektedir.

Öneri: Genel olarak gözlenen allel sayısı ve polimorfizm değerleri düşük olmasına rağmen, tavuk mikrosatellit lokuslarının güvercin genetik çalışmalarında kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Güvercin, tavuk, mikrosatellit markör, polimorfizm

Aim: The aim of this study is to investigate utilization of chicken microsatellite loci in genetic studies of pigeon (*Columba livia*) populations.

Materials and Methods: A total of chicken 100 microsatellite markers were selected from chicken linkage maps. DNAs of pigeons and a chicken as a positive control were used to amplify specific genomic regions by polymerase chain reaction (PCR). The resulting PCR products were separated by capillary electrophoresis and allele genotypes were determined. In a pilot study, general population parameters including number of allele (Na), observed (Ho) and expected (He) heterozygosities and deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were calculated for 24 positive loci in a pigeon population.

Results: A total of 48 microsatellite loci were amplified (48%) in pigeon DNA and expected PCR products were observed. In the pilot study, alleles numbers varied 1-5 and mean Na was 2.5 for 24 loci. A total of 60 different alleles were determined. Ho and He values were observed as 0.000-1.000 and 0.000-0.698, respectively.

Conclusion: Although Na and polymorphism levels were lower in general, results of this study suggested that chicken microsatellite loci can be used in genetic studies of pigeons.

Keywords: Pigeon, chicken, microsatellite marker, polymorphism





Giriş

Tavuk gen haritalama çalışmalarının başlangıcı (Hutt 1936) eski olmasına rağmen, ilk bağlantı (linkage) haritası (Bidgood ve Somes 1993) yalnızca 44 morfolojik, immünolojik ve biyokimyasal markörü kapsamaktadır. Compton (C), East Lansing (EL) ve Wageningen/Euribrid (WAU) referans popülasyonları ve tavuk bağlantı haritaları oluşturulmuştur (Bumstead ve Palya 1992, Levin ve ark 1994, Groenen ve ark 1998). Ekonomik önemi olan diğer türler ile karşılaştırıldığı zaman, tavuk genom çalışmalarında daha yavaş bir ilerleme gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak, kullanılabilir markör sayısının azlığı ve mikrokromozomlar nedeniyle çok sayıda bağlantı grubunun bulunması gösterilmektedir (Reed ve ark 2000, Kayang ve ark 2002). Uluslararası bir projede C, EL ve WAU bağlantı gen haritalarının verileri birleştirilerek çözünürlük ve kapsamını artırmak için oluşturulan konsensüs gen haritası 1889 markörü kapsamaktadır. Bu markörlerin 350 tanesi genler ile ilintilidir (Groenen ve ark 2000).

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal İnsan Genomunu Araştırma Enstitüsü (NHGRI) tarafından tavuk genom projesinin ilk taslağı 1 Mart 2004 tarihinde araştırmacıların kullanımına açılmıştır (Anonim 2004). Tavuk genomunda benzer sayıda gen bulunmasına rağmen memeli hayvanların genomunun yalnızca %40 büyüklüğündedir. Tavuk genomunda tekrar dizilimlerinin oranı az, intronlar nispeten daha kısa bulunmuştur (Burt ve ark 1999, Schmutz ve Grimwood 2004). Tavuk ekonomik önemi yanında, genomunun daha az kompleks yapıda olması, yeterli markör yoğunluğu ve genom bilgisinin mevcudiyeti gibi özelliklerinden dolayı kanatlıların genetik ve biyolojik çalışmaları için iyi bir model organizma olarak kabul edilmektedir.

Mikrosatellitler (Weber ve May 1989), 1-6 baz çifti (bç) tekrar motifleri (yaygın olarak GT/CA) olup prokaryot ve ökaryot genomlarda bulunmaktadır. Motiflerin sayısı bir popülasyonun bireyleri hatta homolog kromozomlar arasında dahi farklı olabilir. Mikrosatellitler yüksek oranda polimorfik olup, ko-dominant özelliğine sahiptir. Tüm genomu 30-40000 bç sıklığında yayılmışlardır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve kapiller elektroforez teknolojisine uygunluğu kolay ve hesaplı genotipleme işlemlerine olanak sağlamaktadır. Mikrosatellit markörler kanatlı ve diğer organizmaların gen haritalama, hastalık ve verimleri kontrol eden kromozom ve genom bölgelerinin tanımlanması, DNA düzeyinde ebeveyn tayini, adli tıp ve filogenetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Özsensoy ve Kurar 2012).

Barış, huzur ve bereketin sembolü olarak kabul edilen güvercin (*Columba livia*), gıda, haberleşme ve sportif amaçlı kullanılmaktadır. Dünyada yaygın olarak bulunan güvercinin insan kültürüne tam olarak ne zaman kazandırıldığı bilinmemektedir (Yılmaz ve Ertuğrul 2012). Ancak farklı fenotipik özelliklere göre çok sayıda (>300) tanımlanmış güvercin ırkı

bulunmaktadır. Farklı renk, iskelet yapısı, fizyolojik ve davranış özelliklerinin genetik düzeyde araştırılmasına gereksinim bulunmaktadır (Anonim 2014). Güvercin genetik çalışmaları oldukça sınırlı olup bu amaç için yeterli mikrosatellit lokusu (Traxler ve ark 2000, Ando ve ark 2011, Mukesh ve Sathyakumar 2011) henüz güvercin genomunda tanımlanmamıştır.

Mikrosatellit markörler tercih edilen markör sistemi olmasına rağmen bazı genetik çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için tüm genomu temsil eden yüzlerce lokusa ihtiyaç bulunmaktadır. Markörlerin geliştirilmesinde mikrosatellit bölgesinin DNA dizilim bilgisine gereksinim vardır. Bu durum, bazı türler için çoğu zaman mümkün değildir. Bu problemin çözümünde filogenetik olarak yakın türlerin markör sistemleri kullanılabilir (Primmer ve ark 1996, Fields ve Scribner 1997, Hanotte ve ark 1997, Petren 1998, Kayang ve ark 2002, Horbanczuk ve ark 2007).

Bu çalışmada, tavuk mikrosatellit DNA markörlerinin güvercin genetik çalışmalarında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Toplam 12 adet güvercin ve pozitif kontrol olarak 1 adet tavuktan K₃-EDTA'lı kan örnekleri alındı. Tam kan örneklerinden 5 µL, 1.5 mL eppendorf tüpüne aktarılarak üzerine 95 µL ddH₂O eklendi ve standart fenol/kloroform yöntemi (Sambrook ve ark 1989) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi %0.8 agaroz jel elektroforez ve 260/280 nm UV'de kontrol edildi.

Mikrosatellit markörleri (Tablo 1) tavuk bağlantı gen haritası ve literatürden (Groenen ve ark 2000, Bulut ve ark 2013) alındı. Her lokus kapiller elektroforeze uygun olarak WELL-RED (D2, D3 ve D4) ile işaretlendi.

Polimeraz zincir reaksiyonunda 1xMg⁺⁺ free PCR buffer (Fermentas), 200 mMol dNTP (Fermentas), 1.5 mMol MgCl⁺⁺, 0.375 U Taq polimeraz (Fermentas), 5 pMol her bir primer çifti (Tablo 1) ve 50 ng template DNA kullanıldı. Her bir PZR reaksiyonu toplam 15 µL hacimde hazırlandı. MJ Research PTC-200 Thermal Cycler ve touchdown PZR (Don ve ark 1991) profili kullanılarak 95°C'de 4 dakika denatürasyon sağlandıktan sonra I. aşamada 16 döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primerlerin ideal bağlanma noktasının sağlanması için 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0.5°C düşürülen ve 30 saniye süren annealing ve 72°C'de 30 saniye elongasyon sağlandı. II. aşamada 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye annealing ve 72°C'de 30 saniye elongasyon olacak şekilde toplam 25 döngü kullanıldı. Tam adenilasyon için örnekler 72°C'de 10 dakika tutuldu.

Farklı işaretli PZR ürünleri birleştirilerek havuz sistemi oluş-



Tablo 1. Çalışmada kullanılan tavuk mikrosatellit lokusları.

Lokus	Kromozom	Primer Dizisi		İşaretleme	Güvercin
		Forward	Reverse		
HUJ0001	1	ctttgtaaacctactgca	tccggcttatacagagcaca	D4	+
GCT0006	1	atttctattcccctctc	ccagaaaacatcaccaac	D3	
MCW0106	1	ggcaactaagtgtggactg	gcagcattcagtggaat	D3	+
ADL0019	1	tgctgctagaccagttaa	tctgctgggattatgtgca	D2	+
ADL0234	1	ctggacgctgaaaaagttc	ccctggggctccctcagcac	D2	+
UMA1.125	1	ccagcatgtgattccaagt	agtgtttccaggggcaagga	D4	
ADL0150	1	atgccaagcattacagaagc	cctgcagcacctttatctct	D3	+
MCW0101	1	gtttgttgatctgtagtctg	ccatattctgtagaaagtagag	D4	
ADL0251	1	tttgcttagggatgatgctg	cgctccacacaggaatgt	D4	+
LEI0217	1	gatgactgagaaaataacttg	aaattactgaggcacaggag	D4	
UMA1.117	1	ttagaatgactggacacag	Tgttctttgagggatgatt	D3	+
UMA1.019	1	acactggcaggcgtgcttag	gcttgaggacaggggctcagg	D2	
LAMP1	1	gcgttgagtgagagagcga	caaccgcggagagcgctat	D2	+
MCW0145	1	actttattccaaattggct	aaacacaatggcaacgaaac	D4	+
ADL0101	1	ccccaaggagaactgattac	gaaaagtgaaaacgaaaca	D3	
ADL0238	1	aaaccaaaacaaagcagac	gctcctcataagcaaatgc	D2	+
MCW0082	2	gatcttaagggaaaagatat	cttttgatgcctctcatttc	D3	
ADL0152	2	agattagtgcagatcatcca	tgtttgccatttcagaagc	D4	
ADL0185	2	catggcagctgactccagat	agcgttacctgtctggttg	D3	+
MCW0065	2	tcagcaacagaagtgaaggcaat	caggcattacttaataacaggc	D2	
LEI0089	2	gatccagggtgcttaaacag	ttagctctgctgtcactgc	D2	
MCW0039	2	cattggactgagatgctactgcag	acatttgctaatggtactgttac	D2	+
BCL2	2	tcgcaccgttaagttacacc	agcatcaaagcgtcgcgttc	D4	
ADL0267	2	aaacctgatcaggaagcat	gttattcaaagccccaccac	D3	
LEI0147	2	tcaggccttgaactcagg	gctattaagatacctcagctc	D4	+
ADL0114	2	ggctcataactcctttttt	gctctacattcctcagtc	D4	
LEI0070	2	tgaggagagcaattagtctgc	ggaaaacaatcactgcctcg	D2	
ADL0146	2	tgcttctacccttctct	gacctgcattgtcagtgacc	D4	
MCW0157	2	gtgtgatgtaggccagatgtc	gtgctgcattctccaatagg	D3	
MCW0169	3	gatcccactgttaagaagt	cctgacctactgagcttga	D4	
MCW0083	3	gccttcaccatctactgt	tacattcagaaggaatgttc	D3	
ADL0370	3	acagatacaactccaag	aatatctatgctgaaatgtg	D4	
ADL0155	3	ggctccgactgaaagcattat	ttaagactgaagccaaccag	D4	
ADL0127	3	gaaccagaattatataaata	ttaacacaaaagaaccaggcag	D4	
ADL0115	3	ggatgagaagaagaaggca	caatgggtggtcaggtaatc	D3	
ADL0306	3	gttactgtatcttgctcat	Tcagtttgacttctctcat	D2	+
GCT0053	3	catcagcatcagcgttgttt	atgtgcacctctcatcaca	D4	+
ROS0305	3	aatagatccctggctacac	tggtcagcaacctcagatgt	D3	+
ADL0203	4	accctccccctcactgc	gctccacctgctcgtgtg	D4	+
MCW0005	4	acctcctgctggcaataaattgc	tcactttagctccatcaggattca	D3	+
ADL0266	4	aatgcattgcaggatgatg	gtggcattcaggcagagcag	D3	
LEI0094	4	gatctcaccgatgagctgc	tctcactgtaacacagtg	D3	
LEI0081	4	acttaccttttctgactgctg	gatcctttcaatgctcatgct	D2	

*D2: Siyah, D3: Yeşil, D4: Mavi





Tablo 1. Çalışmada kullanılan tavuk mikrosatellit lokusları.

Lokus	Kromozom	Primer Dizisi		İşaretleme	Güvercin
		Forward	Reverse		
UMA4.034	4	ggtgattggggagaatgag	agggaggaggggctttactc	D2	
ADL0247	5	ctcttggtgtctgtctgtg	Tgcatgtgtcagtttcag	D4	
MCW0090	5	gatccttctctctctcctg	ccttcaactaaaacattatagag	D4	
ADL0239	5	gaaaaagcagagcagtgctt	gtgatgggaaaatctcagg	D3	
ADL0233	5	gccctttaaaccagactc	gggggaaaaggatgcttagc	D2	+
ADL0298	5	caaggctgggattgatgaaa	tggcgtgtgggtttacaaaa	D2	+
ADL0040	6	ttccccagattacaactt	gccagtatactccagcagc	D4	+
ADL0377	6	atattctgggacatctgtg	gtaggatccgtagttttg	D2	+
ADL0142	6	cagccaataggataaaaagc	ctgtagatgccaaaggagtgc	D2	+
ABR0326	7	gctcacaagaagggtcaca	ccacctctggttctcacc	D4	
ADL0107	7	attatccatccacttgagaa	Tatttttgaacattaccag	D3	
ADL0279	7	catggctgttgctttacata	gtgaacccaatgctctctg	D3	+
ADL0109	7	atctccataacttctctgc	aaaaataaatatctccag	D4	+
ADL0315	7	tccttgggcatgatttcaa	Ctccatgtgtctctttag	D3	+
ADL0169	7	ccacacaaactgcttcata	attccgctccccattagt	D2	
MCW0095	8	gatcaaaacatgagagcgaag	ttcatagcttgaattgcatagc	D2	+
ADL0301	8	tcctccctgaagtcttaca	ggatgcgttttgaagttg	D3	
ADL0191	9	aaaggaaagcctatgtgaat	aaagcaccaagcgagataca	D4	+
MCW0190	9	gtgatcatttctacatgagc	acaacagaactaaacaaata	D3	
ADL0136	9	tgtcaagcccctgtatcac	ccacctcttctctgttca	D3	+
MCW0134	9	ggagacttcatgtgtagcac	accaaaagactggaggcaac	D3	
ADL0209	10	ggttagctccctctccag	tcactccagcttgagacagg	D2	+
ADL0231	10	aaggaaacaaagagaaatcc	actattagcctggggagagc	D4	+
ADL0102	10	ttccacctttcttttatt	gctccactcccttaacc	D3	
ADL0112	10	atctcaaatgtaatgcgtgc	ggcttaagctgaccattat	D2	
ADL0210	11	acaggaggatagtcacacat	gccaaaaagatgaatgagta	D3	+
MCW0230	11	tgcacagaccaagctgcttc	gatcctctgatggctgccg	D4	+
ADL0372	12	cgccccgtttactgatttg	ggcgccgttcaaggaagcac	D4	+
ADL0044	12	aagtggtttattgaagtaga	ctgtgtgttgcgttagtg	D3	+
MCW0332	12	tgggtttgcaacgggacatag	gaacaatggtagagcactgc	D4	+
ADL0147	13	ctggatgaaagcagcagtg	gctgcccgaataaacctcct	D3	+
LEI0251	13	gggttactcttattgtaatgatgc	gatctagaaatggctgactgac	D2	
MCW0104	13	tagcacaactcaagctgtgag	agacttgcacagctgtgacc	D4	+
LEI0098	14	cagttagcagagatttctctac	tgccactgatgctgtcactg	D3	
ADL0263	14	agagtcagaaagtggaagg	ctgttcggtgtgtgttg	D2	+
MCW0080	15	gaaatggtacagtcagttgg	ccgtgatttctaattgacag	D2	+
LEI0258	16	caggcagcagaacttgtaagg	agctgtgctcagtcctcagtcg	D3	
HUJ0002	17	gaatctggatgtcaagcc	atctcacagagccagcagtg	D2	
ADL0202	17	ctgctgttcttccccctca	ctctgctctctgtcctcaa	D4	
MCW0217	18	gatctttctggaacagatttc	ctgcacttgggtcaggttctg	D4	+
MCW0094	19	ggagctggatttctgctaag	gcacagcctttgacatgtac	D2	+
LEI0090	23	tagtgcagccctatggagcg	ggtagtgtgcgttacacgc	D3	
ROS0302	24	cacagacacccccgtacag	acacagcgttggttatgcc	D2	

*D2: Siyah, D3: Yeşil, D4: Mavi



Tablo 1. Çalışmada kullanılan tavuk mikrosatellit lokusları.

Lokus	Kromozom	Primer Dizisi		İşaretleme	Güvercin
		Forward	Reverse		
ROS0314	26	cagctcacatttagcagtc	tttattgatttccaacaa	D3	
LEI0074	26	aaacgtctgccttcagcgag	catcaattagagcgaagcctc	D4	
COL1A1	27	cggaccatgaattggcatt	ttactctctctgtcacgcg	D3	+
ADL0376	27	gccccacggagatggaacac	cctgccctgtgctggaact	D2	
MCW0188	E22	gtgacagcggcagatgga	cgcacagccccactgcaca	D4	+
GCT0037	E26	agccacacagcacacagtc	attggtttctgatggcctg	D3	
GCT0042	E38	gggtttgtcacctcctggt	tagaggcacgggaaggtatg	D2	+
ADL0034	E47	aacttaaaaactcctgctgc	gggaacctgtgggctgaaag	D3	
GCT0004	E50	gtgatgcacacacaactg	cttcttcatctacgctgc	D4	+
ROS0309	Z	gtgccaccaattaacagagg	gatcaggaaaggctgtgaag	D3	
ADL0273	Z	gccatacagacaatagagg	tggtagatgctgagaggtgt	D2	+
MCW0246	Z	tcataaggcagagaattcatc	tttcattcagacaacaaggc	D4	
LEI0121	Z	ttgacgtcctggatagattac	attatccagaactaacatcaac	D3	
LEI0075	Z	ctatgctatcattgaaacacagc	atccagtcgctgtctggtcag	D2	+

*D2: Siyah, D3: Yeşil, D4: Mavi

turuldu ve Beckman Coulter CEQ-8000 Genetik Analiz Sisteminde FRAG-3 metodu kullanılarak kapiller elektroforez ve fragman analizi uygulandı. Fragtest programı kullanılarak markör genotipleri (allel) belirlendi.

Genel populasyon parametrelerinden toplam allel sayısı (Na), gözlenen (Ho) ve beklenen heterozigotluk (He) değerleri ile Hardy-Weinberg Dengesine (HWE) uygunluğun hesaplanmasında GenAlEx6 (Peakall ve Smouse 2006) paket programı kullanıldı.

Bulgular

Tüm mikrosatellit lokusları (100) pozitif kontrol olarak kullanılan tavuk DNA'sında beklenen PZR ürünlerini vermiştir. Güvercin DNA'sı kullanılarak yapılan PZR analizlerinde toplam 48 mikrosatellit lokusunda (%48) beklenen alleller gözlemlendi (Tablo 1). Pilot çalışma kapsamında pozitif mikrosatellit lokuslarından 24 tanesi seçilerek güvercin popülasyonunda genotipler belirlendi ve temel populasyon parametreleri hesaplandı (Tablo 2). İncelenen 24 lokustan 3 tanesi monomorfiktir. En yüksek allel sayısı (5) ROS305 ve GCT0053 lokuslarında gözlemlendi. Ortalama allel sayısı 2.5 olup toplam 60 farklı allel tespit edildi (Tablo 2). Gözlenen heterozigotluk (Ho) değerleri 0.000 (ADL0142, ADL0263, GCT0004 ve LAMP1) ve 1.000 (ADL0279) arasında değişmektedir. Ortalama beklenen (He) heterozigotluk değeri 0.388 olup 0.000 ve 0.698 (GCT0053) arasında değişmektedir. Hardy-Weinberg Dengesi'nden olası sapmaların test edilmesinde ki-kare istatistiği kullanıldı. İncelenen polimorfik lokusların genel olarak HWE'de oldukları, ancak özellikle MCW0332 ve ADL0279 lokuslarının önemli oranda ($P < 0.001$) HWE'den saptıkları gözlemlendi.

Tartışma

"Harita zengini" olarak kabul edilen insan ve ekonomik önemi olan hayvan türlerinin genom çalışmaları iyi düzeydedir ve genom projeleri tamamlanmıştır. Ancak güvercin gibi "harita fakiri" türlerin genom çalışmaları henüz yeterli düzeyde değildir (Womack ve Kata 1995). Karşılaştırmalı teknikler biyolojik çalışmalarda yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Türlerin genomları arasındaki benzerlik ve farklılıkları inceleyen karşılaştırmalı genom analizleri, genom organizasyonu hakkında bilgi vermekte ve genetik bilginin değişimine olanak sağlamaktadır (O'Brien ve ark 1993, Womack ve Kata 1995). Filogenetik olarak yakın türler arasında genetik bilginin paylaşımı genetik çalışmaların hızını olumlu yönde etkilemektedir.

Mikrosatellitler genellikle fonksiyonel olmayan genom bölgelerinde bulunmasına rağmen filogenetik olarak yakın türlerde DNA dizileri korunmuştur. Örneğin, sığır PZR primerleri kullanılarak koyun mikrosatellit bölgeleri yüksek oranda (~%70) başarıyla yükseltgenmiştir. Yaklaşık olarak %60 kadarı enformatif olup koyun genetik çalışmalarında kullanılabilir (de Gortari ve ark 1996, Kappes ve ark 1997, Maddox ve ark 2001).

Mikrosatellit markörlerin kanatlı türleri arasında kullanımı ve karşılaştırmalı analizi farklı çalışmalarda araştırılmıştır (Primmer ve ark 1996, Fields ve Scribner 1997, Hanotte ve ark 1997, Petren 1998, Reed ve ark 2000, Kayang ve ark 2002, Horbanczuk ve ark 2007, Mukesh ve Sathyakumar 2011). Bu yaklaşımın güvercinlerde test edilmesinde, esnek annealing özelliği nedeniyle kullanılan touchdown PZR (Don ve ark 1991) protokolü farklı kondisyonların (T_m , $MgCl^{++}$





Tablo 2. Gözlenen allel sayıları (Na), gözlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk değerleri ile Hardy-Weinberg Dengesinden (HWE) sapma dereceleri.

Lokus	Na	Ho	He	HWE
ADL0142	1	0.000	0.000	-
ADL0147	2	0.444	0.346	ns
HUJ0001	2	0.250	0.500	ns
ADL0315	3	0.417	0.448	ns
MCW0332	3	0.500	0.653	***
ADL306	2	0.500	0.444	ns
LAMP1	1	0.000	0.000	-
LEI0147	2	0.182	0.165	ns
ADL0279	2	1.000	0.500	***
ADL0234	2	0.900	0.495	**
ROS305	5	0.300	0.420	**
ADL109	2	0.667	0.500	ns
ADL0377	4	0.111	0.451	**
ADL0136	3	0.429	0.622	ns
GCT0004	2	0.000	0.444	ns
ADL0238	2	0.167	0.375	ns
MCW0106	2	0.545	0.397	ns
ADL0203	2	0.182	0.165	ns
ADL0263	1	0.000	0.000	-
ADL185	2	0.273	0.351	ns
GCT0053	5	0.636	0.698	ns
ADL0209	3	0.125	0.320	*
ADL0044	3	0.273	0.376	*
MCW0188	4	0.818	0.649	ns
Ortalama	2.5	0.363	0.388	-

ns: Önemi değil,* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

oranı vs) test edilmesi gereksinimini karşılamıştır. Kapiller elektroforez ve multipleks fragman analizi kullanılarak allel genotipleri tespit edilmiştir. Tavuk mikrosatellit markörleri %48 oranında güvercin DNA'sında yükseltgenmiş olup bu sonuçlar diğer çalışmalar ile uyum içerisindedir (Reed ve ark 2000). Pilot bir çalışma kapsamında 24 mikrosatellit lokusu sınırlı sayıda güvercin popülasyonunda test edilmiştir. Ortalama allel sayısı 2.5 olarak gözlenmiştir.

Toplam 520 tavuk mikrosatellit markörüne ait primerler kullanılarak 280 tanesi (%54) hindi DNA'sında başarıyla yükseltgenmiştir. DNA dizi analizleri sonucunda mikrosatellit tekrar dizileri hindilerde daha uzun ve kuşatan bölgelerde yüksek oranda varyasyon gözlenmiştir. Pozitif lokuslardan 57 tanesi hindi popülasyonunda (n=12) test edilmiş ve %35'i polimorfik bulunmuştur. Ortalama allel sayısı 1.4/lokus olarak tespit edilmiştir. Genel olarak tavuk mikrosatellitlerinin

%20'sinin hindi genetik çalışmalarında kullanılabileceğini belirtilmiştir (Reed ve ark 2000).

Kayang ve ark (2002) tarafından, bildircin genomundan geliştirdikleri toplam 100 mikrosatellit markörünün tavuk ve beçtavuğunda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Mikrosatellitler %42 oranında tavuk DNA'sında PZR ile yükseltgenmiş olup bunların %57.1'i polimorfik bulunmuştur. Allel sayısı 1-4 arasında değişmektedir ve ortalama allel sayısı 1.9 tespit edilmiştir. Ho ve He değerleri 0000-1.000 ve 0.000-0.720 arasında değişmektedir. Beçtavuğunda amplifikasyon gözlenen 20 lokusun %55'i polimorfiktir. Ortalama allel sayısı 1.9, Ho ve He değerleri sırasıyla 0000-0.450 ve 0.000-0.750 arasında değişmektedir.

Huang ve ark (2005) kaz genomundan 35 yeni mikrosatellit markörü geliştirmiş ve bunların farklı kanatlı türlerinde kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Kaz mikrosatellitleri tavuk (%5.7) ve sülünde (%40) kullanılabilir bulunmuş, ancak tavus kuşu DNA'sında yükseltgenmemiştir. Horbanczuk ve ark (2007) 29 tavuk mikrosatellit lokusunun devekuşu DNA'sında yükseltgenmediğini ve kullanılamayacağını bildirmişlerdir.

Tavuk filogenetik çalışmalarında FAO MoDAD tarafından tavsiye edilen 30 mikrosatellit lokusundan 18 tanesinin güvercinlerde kullanılabileceği belirtilmiştir. Toplam 139 allelin tespit edildiği bu çalışmada ortalama allel sayısı 7.7, Ho ve He değerleri sırasıyla 0.000-0.909 ve 0.000-0.944 arasında değişmektedir (Mukesh ve Sathyakumar 2011). Bu çalışma ile 3 lokus (ADL0112, MCW0104 ve LEI0094) ortak kullanılmıştır. Her iki çalışmada da LEI0094 negatif, MCW0104 ise pozitif bulunmuştur. Ancak, ADL0112 lokusunda bu çalışmada amplifikasyon gözlenmemiş olmasına rağmen, Mukesh ve Sathyakumar (2011) tarafından oldukça polimorfik olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada gözlenen değerler diğer kanatlı türlerinde gerçekleştirilen karşılaştırmalı mikrosatellit analizlerinin sonuçları ile genel olarak uyum içerisindedir. Bu ve benzer çalışmalarda gözlenen monomorfik lokuslar ve nispeten düşük polimorfizm değerleri sınırlı sayıda örneğin kullanılmasından, kullanılan popülasyonların özelliğinden veya primerlerin bağlanma bölgesindeki varyasyonlar nedeniyle olası null allellerden kaynaklanmış (Reed ve ark 2000, Kayang ve ark 2002, Mukesh ve Sathyakumar 2011) olabileceği düşünülmektedir. Farklı kanatlı türler arasında yapılan mikrosatellit lokuslarının karşılaştırmalı analizi farklı sonuçlar vermektedir. Ancak, filogenetik olarak yakın kanatlı türleri arasında daha yüksek oranda kullanılabilirlik gözlenmiştir (Reed ve ark 2000, Huang ve ark 2005).

Öneriler

Bu çalışmanın sonuçları araştırmaya konu olan bazı tavuk



mikrosatellit lokuslarının güvercin genetik çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir. DNA dizi analizi ile lokusların mikrosatellit yapılarının (T, CA, TG, CATG vs) incelenmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Ancak, tüm genom tarama çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için bağlantı gruplarının oluşturulması ve enformatif lokus sayısının artırılması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK TOVAG 1040464 projesi tarafından desteklenmiş ve XII. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresi'nde (6-8 Mayıs 2010, İstanbul) sunulmuştur.

Kaynaklar

- Ando H, Kaneko S, Suzuki H, et al., 2011. Genetic diversity of the Japanese Wood Pigeon, *Columba janthina*, endemic to islands of east Asia, estimated by newly developed microsatellite markers. *Zool Sci*, 28, 891-896.
- Anonim 2004. <http://www.nhgri.nih.gov/11510730>. Chicken genome assembled. Erişim tarihi; 15.09.2014.
- Anonim 2014. Pigeon genetics at the University of Utah. http://biologylabs.utah.edu/shapiro/shapiro_lab/pigeons.html. Erişim tarihi; 15.09.2014.
- Bidgood JJ, Somes RGJ, 1993. Genemap of the chicken (*Gallus gallus*), in: Genetic maps, Ed; O'Brien S, 6th edition, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, USA, pp: 4.333-4.442.
- Bumstead N, Palya J, 1992. A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 13, 690-697.
- Bulut Z, Kurar E, Ozsensoy Y, et al., 2013. Determination of chromosomal regions affecting body weight and egg production in Denizli X White Leghorn F2 populations. *Eurasian J Vet Sci*, 29, 30-38.
- Burt DW, Bruley C, Dunn IC, 1999. The dynamics of chromosome evolution in birds. *Nature*, 402, 411-413.
- de Gortari MJ, Freking BA, Kappes SM, et al., 1996. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Anim Genet*, 28, 274-290.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, et al., 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acid Res*, 19, 4008.
- Fields RL, Scribner KT, 1997. Isolation and characterization of novel waterfowl microsatellite loci: Cross-species comparisons and research applications. *Mol Ecol*, 6, 199-202.
- Groenen MA, Crooijmans RP, Veenendaal A, et al., 1998. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 49, 265-274.
- Groenen MA, Cheng HH, Bumstead N, et al., 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Res*, 10, 137-147.
- Hanotte O, Puch A, Maucher C, et al., 1997. Nine novel chicken microsatellite loci and their utility in other Galliformes. *Anim Genet*, 28, 308-322.
- Horbanczuk JO, Kawka M, Sacharczuk M, et al., 2007. A search for sequence similarity between chicken (*Gallus domesticus*) and ostrich (*Struthio camellus*) microsatellite markers. *Anim Sci Pap Rep*, 4, 283-288.
- Huang Y, Tu J, Cheng X, et al., 2005. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genet Sel Evol*, 37, 455-472.
- Hutt FB, 1936. Genetics of fowl. VI. A tentative chromosome map. *Neue Forsch Tierzucht Abstam (Duerst Festschrift)* pp: 105-112.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, et al., 1997. A second generation map of the bovine genome. *Genome Res*, 7, 235-249.
- Kayang BB, Inoue-Murayama M, Hoshi T, et al., 2002. Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and quinea fowl. *Genet Sel Evol*, 34, 233-253.
- Levin I, Santangelo L, Cheng H, 1994. An autosomal genetic linkage map of the chicken. *J Hered*, 85, 79-85.
- Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, et al., 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genom Res*, 11, 1275-1289.
- Mukesh, Sathyakumar S, 2011. Eighteen polymorphic microsatellites for domestic pigeon *Columba livia* var. *domestica* developed by cross species amplification of chicken markers. *J Genet*, 90, 86-89.
- O'Brien SJ, Womack JE, Lyons LA, et al., 1993. Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nat Genet*, 3, 103-112.
- Özsensoy Y, Kurar E, 2012. Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları. *J Cell Mol Biol*, 10, 11-19.
- Peakall R, Smouse PE, 2006. GenA1Ex6: Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 6, 288-295.
- Petren K, 1998. Microsatellite primers from *Geospiza fortis* and cross-species amplification in Darwin's finches. *Mol Ecol*, 7, 1782-1784.
- Primmer CR, Moller AP, Ellegren H, 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol Ecol*, 5, 365-378.
- Reed KM, Mendoza KM, Beattie CW, 2000. Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. *Genome*, 43, 796-802.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition, Volume 2, Cold-Spring Harbor, New York, USA, pp: 9.16-9.19.
- Schmutz J, Grimwood J, 2004. Fowl sequence. *Nature*, 432, 679-680.





Traxler B, Brem G, Muller M, et al., 2000. Polymorphic DNA microsatellites in the domestic pigeon, *Columba livia* var. *domestica*. *Mol Ecol*, 9, 365-378.

Weber JL, May PE, 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase cha-

in reaction. *Am J Hum Genet*, 44, 388-396.

Womack JE, Kata SR, 1995. Bovine genome mapping: evolutionary inference and the power of comparative genomics. *Curr Op Gen Develop*, 5, 725-733.

Yılmaz O, Ertuğrul M, 2012. Tarihte güvercin yetiştiriciliğinin önemi. *J Agric Fac HRU*, 16, 1-7.