

YUMURTA VE ET TAVUKLARININ KARACİĞERLERİNDE GÜMÜŞLEME METODUYLA BOYANAN NÜKLEOLUS ORGANİZER (AgNOR) BÖLGELERİN DAĞILIMININ BELİRLENMESİ *

Mehmet Faruk Aydın¹@

İlhami Çelik²

Determination of the Distribution of Silver-Stained Nucleolar Organizing Regions (AgNORs) in the Livers of Broilers and Laying Hens

Özet: Bu çalışmada, yumurtacı Nick Chick tavuk ırkı ile etçi Hubbard hattının hepatosit çekirdeklerindeki gümüşle boyanan nükleolus organizör bölgelerin (AgNOR'ların) sayıları, lokalizasyonları, büyüklükleri ve alanları, her iki ırkta da embriyonik dönem boyunca ve etçi tavuklarda kuluçka sonrası 6., yumurtacılar ise 32. haftalara kadar belirlenerek; bu parametrelerde oluşan değişiklikler saptanmıştır. Elde edilen verilere dayanılarak, her iki ırkta dönemler arasında, her dönemde yumurtacılar cinsiyetler arasında ve ırklar arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Yumurtacıların (Nick Chick ırkı) hepatositlerinin çekirdek alanı ve çekirdek çapı, kuluçkanın 17. gününde broylerlerden önemli derecede yüksek bulunmuştur. Çıkış gününde broylerin, 6. haftada ise yumurtacıların daha fazla sayıda AgNOR'a sahip oldukları tespit edilmiştir. AgNOR alanı, kuluçkanın 14. günü ile kuluçkadan sonraki 6. haftada broylerde daha fazla iken, kuluçkanın 17. gününde yumurtacılar daha fazladır. Kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde yumurtacılar daha iri AgNOR'lara sahipken, kuluçka sonrası 6. haftada broylerin daha iri AgNOR'lara sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanılarak, büyüme ve yumurta verimi ile hepatosit AgNOR parametreleri arasında direkt bir bağlantının kurulamayacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Broiler, Yumurtacı tavuk, Çekirdek, Çekirdekçik, AgNOR aktivitesi.

Summary: In this study, the number, localization, size and area of the silver staining nucleolar organiser regions (AgNORs) were determined in the livers of both a layer (Nick Chick) and broiler (Hubbard) chickens through the hatching period and afterwards up to either 6th week for broilers or 32th week of age for layers. Comparisons were made for each period between genders of each group, and also between the layers and broilers. The results showed that nuclear area of the layers was significantly higher at the 17th day of hatching period. AgNOR number was higher in broilers on the day of hatch, whereas the layers had higher diameter on the hatch and at the 17th day of hatching period. AgNOR number at the 6th week of post-hatch. AgNOR number was higher in the broilers on the day of hatch, whereas the layers had more AgNORs at 6th week of posthatch area of the layers was higher both at the 14th day of hatch and the 6th week of post-hatch. Both at the 17th day of the hatching period and on the day of hatch, broilers had larger AgNORs, although broilers had larger AgNORs at 6th week of post-hatch. Based on the findings, it is impossible to correlate the growth performance and egg production traits with the AgNOR and nuclear parameters of the hepatocytes investigated in this study.

Key Words: Broilers, Layers, Nucleus, Nucleolus, AgNOR activity.

Giriş

Bir hücredeki kromozomların ribozomal RNA (rRNA) genlerini taşıyan bölgeleri, interfaz aşamasında nükleolusları oluşturmak üzere bir araya gelirler (Schwarzacher ve Wachtler 1993) ve ışık mikroskopuyla çekirdek içinde iri, yuvarlak belirgin cisimcikler halinde görülürler. Kromozomların nükleolusları oluşturan bölgeleri nükleolus organizör böl-

geler (Nucleolar Organizer Regions, NORs) olarak bilinmektedir. Nükleolusların şekil ve yapısal detayları, farklı hücre tiplerinde büyük değişiklikler gösterebilir. Yüksek hızda ribozom üreten hücrelerde nükleoluslar iri ve kompleks yapıya sahipken, düşük aktiviteli hücrelerde genellikle küçük ve daha basit yapıdadırlar. Ama yine de nükleolusların birçok tipinde, elektron mikroskopunda ayırt edilebilen üç temel spesifik yapısal

Geliş Tarihi : 22.03.2005 @: mf_aydin@hotmail.com

* Bu makale, Dr. M. Faruk Aydın'ın Doktora Tezi'nden özetlenmiştir. Araştırma, Harran Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından (Proje No: 280) desteklenmiştir.

1. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ŞANLIURFA
2. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, KONYA

komponent bulunmaktadır (Jordan 1979). Bunlar; fibriler merkezler (fibrillar centers, FC), diffüz fibriler komponent (diffuse fibrillar component, DFC) ve granüler komponent (granular component, GC)'dir.

Fibriller merkezler (FC), elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde, düşük kontrast veren ve 4-8 nm kalınlığındaki ince fibrillerden kurulu bir ağdan oluşurlar. Bu bölgeye sahip olan ve yüksek aktivite gösteren nükleoluslara "yüzük şekilli nükleolus" adı verilir. FC içermeyen çekirdekçiğe sahip olan hücrelere de nadir olarak rastlanmaktadır (Ploton ve ark 1983). FC'ler, belirli şartlar altında gümüş tuzlarıyla boyanırlar (Hernandez-Verdun ve ark 1980, Ellinger ve Wachtler 1980). Diffüz fibriler komponent (diffuse fibrillar component, DFC), elektron mikroskopunda koyu boyanan ve yoğun biçimde paketlenmiş olan ince iplik demetleri halinde gözlenir. DFC'ler genellikle, nükleolonema denen 0,05-0,1 mm genişliğinde bir ağ oluştururlar. Yüzük şekilli çekirdekçiklerde, DFC tek olan FC'yi çevrelerken; kompakt çekirdekçiklerde her bir FC, bunlar arasında uzanan DFC ağının içersine gömülmüştür. DFC'ler, uygulanan tekniğe bağlı olarak gümüş tuzlarına değişen derecelerde affinite gösterirler. Hem FC'ler ve hem de DFC'ler gümüşleme boyamalarından sonra iyi kontrast verdiklerinden, ikisini ışık mikroskopuyla birbirinden ayırt etmek oldukça güçtür (Jordan 1979). Granüler komponent (GC), çapları 10-15 nm arasındaki granüler yapılardan oluşursa da, zaman zaman kısa zincirler de oluşturabilir. GC, çekirdekçiğin periferinde lokalize olmuştur ve bu yüzden genellikle DFC'nin dışında yer alır. GC, gümüşleme metoduyla ya hiç boyanmaz ya da çok zayıf bir şekilde boyanabilir (Pischinger 1926).

Nükleolusta; spesifik nükleolar proteinlerin aracılığıyla rDNA'nın transkripsiyonu, işlenmesi, olgunlaştırılarak alt birimlerinin bir araya getirilmesi ve preribozomal partiküllerin sitoplazmaya transportu gerçekleştirilir. Bu proteinlerin önemlileri; RNA Polimeraz I (RPI), DNA Topoizomerazlar: Topoizomeraz I ve Topoizomeraz II, Fibrillerin, Nükleolin (C23), Upstream binding factor (UBF), Ki-67, Ribogranülün, Numatrin (B23) ve AgNOR proteinler'dir.

Çekirdekçiklerin belli bölgelerinin, gümüş tuzlarıyla yapılan boyama işlemleriyle hazırlanan ışık mikroskopik preparatlarda boyandığı uzun zamandır bilinmektedir. Gümüş pozitif reaksiyon veren nükleolar proteinlerin büyük çoğunluğu mitoz sırasında NOR'lara yapışık olarak bulunurlar ve mitotik kromozomlardaki AgNOR'ların gümüşle boyanmasından sorumludurlar. Kimyasal analizler yanında histokimyasal testlerle de (DNAaz, RNAaz ve proteaz uygulamaları) gümüş pozitif materyallerin, asidik proteinlerden oluştuğu gösterilmiştir. Bu proteinlere

AgNOR proteinleri de denmektedir. AgNOR'larda, nükleolar proteinlerden C23, B23, AgNOR-proteini (Hubbell ve ark 1979) ve RPI bulunur (Hoyo ve ark 1993). Gümüşleme yöntemiyle NOR'ların boyanması sırasında aktif olarak transkripsiyon yapan NOR'lar ve bu nedenle de rDNA (Wachtler ve ark 1986) bölgeleri de boyanır ki, bu yüzden AgNOR sayılarının kısmen hücre ploidisini de gösterebileceği ileri sürülmüştür (Trent ve ark 1981).

Türler arasında kromozom sayısı bakımından farklar olduğu gibi NOR içeren kromozom sayısı ve sonuç olarak hücrelerdeki AgNOR sayıları bakımından da farklar vardır. Örneğin, tavuk karyotipi 9 çift makro ve 30 çift de mikrokromozom olmak üzere toplam 78 kromozomdan oluşmakta; NOR sayısı da 2 olup, bunlar 16 numaralı mikro kromozom çifti üzerinde yer almaktadır (Masabanda ve ark 2004). Bir bireyin farklı hücrelerinin AgNOR sayıları arasında da önemli farklar bulunmaktadır. İnaktif hücreler olan spermatozoonlarda AgNOR bulunmamaktadır. Manuelidis (1984), olgun merkezi sinir sistemi hücrelerindeki AgNOR'ların çekirdekte genellikle sabit lokalizasyon gösterdiklerini bildirmişlerdir. İri nöronlarda daima merkezi yerleşimli ve tek bir AgNOR varken, beyinciğin Stratum granulozum'undaki küçük nöronlarda birkaç küçük ve periferik yerleşimli AgNOR bulunmaktadır.

AgNOR'ların şekil, büyüklük, sayı ve yerleşimleri ile bu parametreleri etkileyen faktörler üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır. Severgnini ve ark (2002), kronik alkoliklerin tükrük bezi duktal ve asiner epitel hücrelerinin AgNOR sayıları ve büyüklükleriyle hücre çekirdeği alanının alkol kullanımından etkilendiğini ileri sürmüşlerdir. Garcia-Moreno ve ark (2001), kronik alkolik sıçanlarda beyin hipokampusündeki AgNOR sayısını kontrollerden düşük bulmuşlardır. Cancado ve ark (2001), ortalama AgNOR sayısının, sigara içenlerde önemli oranda daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Mateus ve Taboga (2001), farelerde, hepatositlerdeki nükleus ve nükleolusların alanlarının, açlıkta, önemli derecede arttığı halde, nükleolus sayılarının değişmediğini tespit etmişlerdir. Godoy ve ark (2001), deri yaralanmalarında epiderminin yara sınırına komşu bazal hücrelerindeki AgNOR aktivitesiyle, hücre çoğalmasının bir ölçütü olan çekirdeğe bromodeoksiüridin (BrdU) alımını karşılaştırarak yaralanmadan hemen sonra ve yaralanmayı takip eden 36-70. saatler arasında hücre çoğalma hızlarının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde; Leek ve ark (1991), çoğalan hücrelerde, AgNOR'ların sayılarından ziyade büyüklüklerinin arttığını saptamışlardır.

Canet ve ark (2001), AgNOR alanının çekirdek

alanı içindeki oranının, yani nispi AgNOR alanının, farklı sıcaklıklardan en fazla etkilenen AgNOR parametresi olduğunu tespit etmişlerdir. Yukarıdaki bulgulara dayanarak araştırmacılar (Canet ve ark 2001), hücre siklusu üzerinde etkili olan faktörlerin değerlendirilmesi ve hücredeki ribozom yapım mekanizması üzerindeki çevresel etkenlerin rolünün araştırılmasında nispi AgNOR alanının önemli bir gösterge olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Khanna ve Dutta (2002), enrofloksasinin dozundaki artışa bağlı olarak, myeloid hücrelerdeki AgNOR (mAgNOR) ve trombositlerdeki AgNOR (pAgNOR) sayılarının da arttığını tespit etmişlerdir. AgNOR sayılarının hücrenin maruz kaldığı mekanik stres faktörleriyle değiştiği yolunda da bazı bulgular elde edilmiştir. Nitekim, Hara ve ark (2000), ağız mukozasına aralıklı ve aralıksız basınç uygulamasının, AgNOR sayılarında azalmaya neden olduğunu ve basıncın azaltılmasından sonraki 20. haftada, AgNOR sayılarının eski durumuna döndüğünü tespit etmişlerdir.

rDNA transkripsiyonu ve ribozomal biyogeneziste önemli rol oynayan gümüş-pozitif proteinlerin bir hücredeki miktarı, hücredeki ribozom senteziyle ilişkili olduğundan, AgNOR aktivitesi hücrenin protein sentez aktivitesinin iyi bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Farklı organizmaların hücrelerinin veya bir organizmanın farklı hücrelerinin genomlarında bulunan aktif NOR'ların sayıları arasında belirgin farklılıklar bulunduğu ve NOR sayılarının, hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiğine dair ortak bir görüş bulunmaktadır (Goodpasture ve ark 1976, Mikelsaar ve ark 1977, Alberts ve ark 1989).

Etçi ve yumurtacı tavuklarda embriyonik dönem boyunca ve kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemlerde, AgNOR'ların sayı, büyüklük ve alanları ile çekirdek büyüklüğü ve alanında oluşan değişiklikler üzerinde yapılmış karşılaştırmalı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, yumurtacı Nick Chick tavuk ile etçi Hubbard tavukların hepatosit çekirdeklerindeki AgNOR'ların sayıları, lokalizasyonları, büyüklükleri ve alanları, her iki ırkta embriyonik dönem boyunca ve etçi tavuklarda kuluçka sonrası 6., yumurtacılar da ise 32. haftalara kadar belirlenerek; bu parametrelerde oluşan değişiklikler saptanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal olarak, yumurtacı (Nick Chick) tavuk ırkı ile broyler (Hubbard ırkı) damızlıklardan elde edilen dömlü yumurtalar kullanılmıştır. Bu amaçla, broyler damızlıklara ait toplam 200 adet kuluçkalık yumurta ile yumurtacı damızlıklara ait toplam 200 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı.

Kuluçka işlemlerinden önce tüm yumurtalar hassas teraziyile (Sartorius, PT 120) tartıldı. Fümigasyonla (1 m³ için 42 ml 40%'lık formaldehite 21 g potasyum permanganat ilavesinden sonra oluşan dumanda 20 dakika tutularak) dezenfekte edildi. Kuluçka işlemleri, S.Ü Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki 1000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Gostyn, Poland), optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve % 60-84 nispi nem ortamında), 2 saatte bir kez çevrilerek gerçekleştirildi. Gün aşırı ışıkla muayene edilen yumurtalardaki embriyonik gelişim izlendi ve ölü embriyo içeren yumurtalar ayrıldı.

Embriyonik dönemdeki AgNOR'ların incelenmesi amacıyla; kuluçkanın 11, 14 ve 17. günlerinde her gruptan 10'ar yumurta açıldı. Hamburger-Hamilton Skalası'na (HH-Skalası) (Hamburger ve Hamilton 1951) göre embriyoların gelişme evreleri belirlendi ve takiben embriyolar teraziyle tartıldı. AgNOR'ların incelenmesi amacıyla, açılan embriyoların karaciğerlerinden doku örnekleri alındı. Kuluçkadan çıkıştan sonra ise, broylerlerden kuluçkadan çıkışın ilk günü ile takip eden 1, 4, ve 6. haftalar sonunda 10'ar hayvandan karaciğer doku örnekleri alındı. Yumurtacılar da karaciğer doku örnekleri, kuluçkanın 11, 14, 17. günleriyle kuluçkadan çıkış günü ve kuluçkadan çıkışı takip eden 6, 18 ve 32. haftalar sonunda alındı.

Yumurtadan çıkan broyler ve yumurtacı civcivler ayrı bölmelere alınarak çalışma süresince optimal koşullarda beslendi. Broylerler standart yemle beslenirken, yumurtacılar 0-8. haftalar arasında civciv yemi, 8-18. haftalar arasında piliç büyütme yemi verildi. Bu dönemden sonra yumurta verimi başladığından, yumurtacı yemi verilmeye başlandı ve 32. haftaya kadar devam edildi.

Bu amaçla; alınan doku örnekleri önce %10'luk tamponlu (0.1 M pH 7.4) formol salinde tespit edildi. Takiben, doku örnekleri alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilip, ksilen serilerinden geçirilerek parlatıldıktan sonra parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler; normal histolojik yapının belirlenmesi amacıyla Crossman'ın üçlü boyama yöntemi (Culling ve ark 1985) ve Pappenheim'in panoptik boyama yöntemiyle (Konuk, 1981), AgNOR'ların belirlenmesi amacıyla da gümüşleme boyama yöntemiyle (Ploton ve ark., 1986, Korek ve ark 1991) boyandı.

Jelatin-formik asit solüsyonu, 2 gr jelatin (Merck), 100 ml %1'lik formik asit (Merck) içinde çözdürülerek hazırlandı. Bu işlem; jelatinin formik asitte tamamen çözünmesini sağlamak amacıyla, çözeltinin bir inkübatörde 58-60°C'de ısıtılmasıyla ger-

çekleştirildi. Bu solüsyon oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Gümüş nitrat çözeltisi ise, 50 g kristal gümüş nitrat (Botafarma Laboratuvarı, Ankara, Türkiye) 100 ml distile suda çözülürerek hazırlandı.

Boyama solüsyonu, taze hazırlanan Jelatin-formik asit solüsyonu ile gümüş nitrat çözeltisi kullanımdan hemen önce karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu amaçla; 1 hacim jelatin-formik asit solüsyonuyla 2 hacim %50'lik gümüş nitrat solüsyonu karıştırılarak hazırlanan boyama solüsyonu kullanıldı. Kesitler taze hazırlanan boyama solüsyonunda, oda sıcaklığında (20°C) ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Süre sonunda kesitler distile suda 3 kez yıkandı. Daha sonra kesitler alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek Entellanla (Merck) kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, E-400) ile incelenerek, gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri aynı mikroskoba takılı dijital fotoğraf makinesi (Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 with DS Camera Head DS-5M) ile kaydedildi. Elde edilen görüntülerin analizi, bir görüntü analiz programı (BS200 PRO) kullanılarak gerçekleştirildi.

Her hücrenin çekirdek çapı, çekirdek alanı, AgNOR sayısı, AgNOR çapı ve AgNOR alanı ölçüldü. Elde edilen verilerden, AgNOR alanı/çekirdek alanı oranları (nisbi AgNOR alanı) hesaplandı. Sonuçlar istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek, farklı iki tavuk ırkının incelenen parametreleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.

Elde edilen veriler, bilgisayarda, Standart istatistik programı (SPSS 10.0) yardımıyla istatistiksel yöntemlerle (tek yönlü varyans analizi –ANOVA- ve Tukey testi) analiz edildi. Bir ırkın dokularından farklı dönemlerde elde edilen veriler Tukey testi ile analiz

edildi. İrklar arasındaki ve bir ırkın farklı cinsiyetleri arasındaki farkların analizi ise t-testi ile değerlendirildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

Broylerlerden elde edilen bulgular

İncelenen dönemler boyunca genelde tek olan hepatosit çekirdekleri, her iki ırkta da santral lokalizasyonlu olup oval-yuvarlak şekilli idi. Çekirdekteki AgNOR'lar 1-4 adet arasında değişen sayılarda, genellikle ekzantrik yerleşimli ve en az bir nükleer zarfa komşu durumda lokalize durumda olan, oval-yuvarlak şekilli, kahverengi-siyah lekeler halinde görüldü (Şekil 1). AgNOR'ların şekil ve lokalizasyonlarında, dönemler arasında belirgin farklar gözlenmedi.

Etçi tavukların hepatositleri üzerinde yapılan ölçüm sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. En yüksek çekirdek alanı (4.03 µm²) embriyonik dönemin 11. gününde tespit edilmiş olup, Tablo 1'de de görüldüğü gibi çekirdek alanı ve çekirdek çapı çalışma boyunca dalgalı bir seyirle tedricen azalmıştır. Grupların ortalama AgNOR sayıları arasındaki farklar önemsizdir (P<0.05). Ortalama AgNOR alanı ve AgNOR çapı değerleri çalışma boyunca birbirine benzer şekilde, dalgalı bir seyir izlemiştir. AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki oranı, kuluçkanın 11 ve 14. günlerinde yüksek iken, sonraki dönemlerde dalgalı bir seyir izleyerek kuluçka sonrası dönemin 1. haftasında en yüksek seviyeye (%19.30) ulaşmış (Tablo 1) 4 ve 6. haftalarda ise tedricen düşmüştür.

Yumurtacıardan elde edilen bulgular

Yumurta tavuklarının hepatositlerindeki

Tablo 1. Farklı dönemlerde, broylerin hepatositlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, çekirdek çapı, AgNOR sayısı, AgNOR alanı, AgNOR çapı ve AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki oranı ile bu değerlerin istatistiksel analiz sonuçları

Ölçülen parametre N=100	DÖNEMLER						
	KULUÇKA DÖNEMİ			KULUÇKA SONRASI DÖNEM			
	11. GÜN	14. GÜN	17. GÜN	ÇIKIŞ GÜNÜ	1. HAFTA	4. HAFTA	6. HAFTA
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$
Çekirdek alanı (µm ²)	4.03±0.12 ^a	3.96±0.16 ^a	2.43±0.07 ^d	3.24±0.08 ^{bc}	3.47±0.07 ^b	3.52±0.08 ^b	2.95±0.16 ^c
Çekirdek çapı (µm)	2.52±0.04 ^a	2.47±0.06 ^{ab}	2.00±0.05 ^d	2.29±0.04 ^{bc}	2.42±0.04 ^{ab}	2.54±0.05 ^a	2.12±0.03 ^{cd}
AgNOR sayısı (adet)	1.52±0.06 ^a	1.48±0.09 ^a	1.85±0.12 ^a	1.64±0.08 ^a	1.56±0.15 ^a	1.60±0.10 ^a	1.76±0.11 ^a
AgNOR alanı (µm ²)	0.66±0.04 ^a	0.66±0.06 ^a	0.22±0.01 ^c	0.42±0.02 ^b	0.67±0.03 ^a	0.63±0.03 ^a	0.45±0.02 ^b
AgNOR çapı (µm)	1.09±0.03 ^{ab}	1.18±0.05 ^a	0.67±0.03 ^c	0.93±0.03 ^b	1.21±0.07 ^a	1.08±0.03 ^{ab}	0.94±0.04 ^b
AgNOR alanının çekirdek alanındaki oranı (%)	16.37	16.66	9.05	12.96	19.30	17.89	15.25

a-d: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (P<0.05).

AgNOR'ların şekil ve lokalizasyonları broylerinkilerle büyük benzerlik göstermekte olup, AgNOR sayıları 1-6 arasındaydı (Şekil 2). Çekirdek alanı, çekirdek çapı ve AgNOR sayısı, kuluçka sonrası dönemin 32. haftasında en yüksek değerlere sahipti. AgNOR alanı, kuluçkanın 11. gününde en yüksek (0.70 μm^2) seviyede iken, çıkış gününden itibaren önemli derecede ($P<0.05$) düşmüştür. AgNOR çapları kuluçka döneminde kuluçka sonrası dönemlerdekinden önemli derecede ($P<0.05$) daha düşük bulunmuştur. AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki oranı, kuluçkanın 11. gününde en yüksek değer olan % 19.33'ten, 32. haftada en düşük değer olan %6.10'a gerilemiştir (Tablo 2).

Belirlenen parametreler cinsiyetler arasında karşılaştırıldığında; dişilerin çekirdek alanı 32. haftada er-

keklerinden önemli derecede ($P<0.05$) yüksek bulunmuştur. Çekirdek çapı bakımından kuluçkadan sonraki dönemin 6. haftasında erkek ve dişiler arasındaki fark önemsiz ($P>0.05$) iken; 18. haftada erkekler, 32. haftada ise dişilerin önemli ($P<0.05$) derecede iri çekirdeklere sahip oldukları bulunmuştur. AgNOR sayısı, kuluçkanın 18. haftasında her iki cinsiyette birbirine yakın iken; çıkış gününde horozlar, 6 ve 32. haftalarda da tavuklar daha yüksek AgNOR sayısına sahipti. AgNOR alanı, çıkış günü ve 18. haftada her iki cinsiyette birbirine yakın iken, 6. haftada horozlar, 32. haftada ise tavuklar daha yüksek ($P<0.05$) AgNOR alanına sahiptir. Her iki cinsiyetteki hayvanların ortalama AgNOR çapları arasında, çıkış günü ve 18. haftada fark yok iken, 6. haftada horozlar, 32. haftada da tavuklar daha yüksek AgNOR çapına sahipti (Tablo 3).

Tablo 2. Farklı dönemlerde, yumurtacı tavukların hepatositlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, çekirdek çapı, AgNOR sayısı, AgNOR alanı, AgNOR çapı ve AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki oranı ile bu değerlerin istatistiksel analiz sonuçları

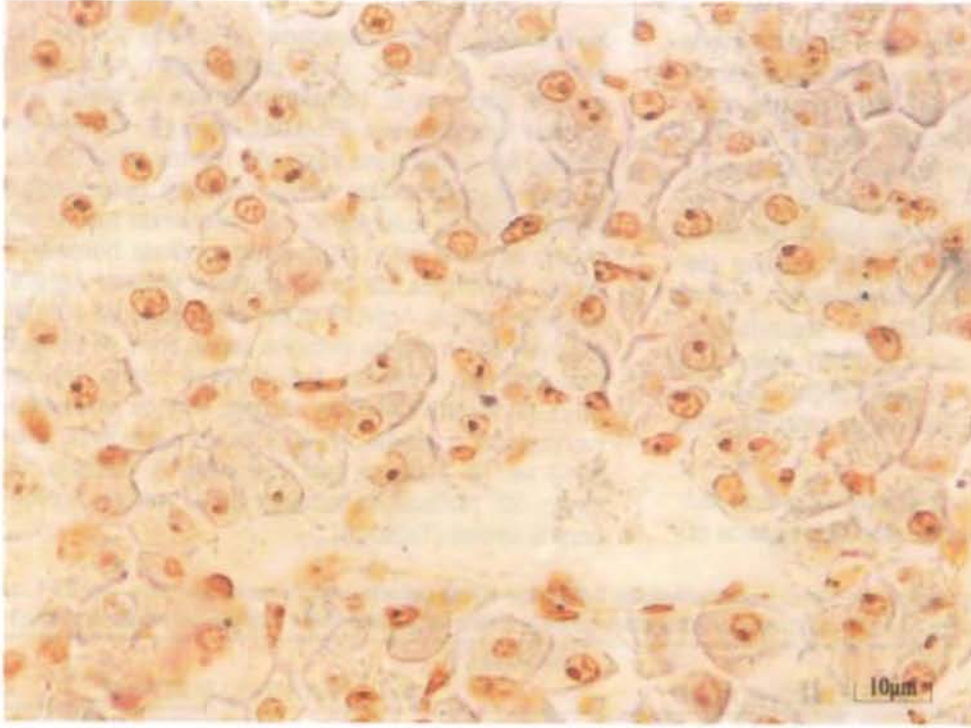
Ölçülen parametre n=100	DÖNEMLER						
	KULUÇKA DÖNEMİ			KULUÇKA SONRASI DÖNEM			
	11. GÜN	14. GÜN	17. GÜN	ÇIKIŞ GÜNÜ	6. HAFTA	18. HAFTA	32. HAFTA
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$
Çekirdek alanı (μm^2)	3.62±0.10 ^{bcd}	3.90±0.13 ^{bc}	4.35±0.15 ^{ab}	3.46±0.13 ^{bcd}	2.71±0.05 ^d	3.13±0.06 ^{cd}	4.91±0.39 ^a
Çekirdek çapı (μm)	2.47±0.03 ^{bc}	2.56±0.05 ^{bc}	2.69±0.06 ^{ab}	2.48±0.07 ^{bc}	2.21±0.04 ^c	2.40±0.03 ^{bc}	2.98±0.15 ^a
AgNOR sayısı (adet)	1.36±0.05 ^c	1.34±0.08 ^c	1.75±0.09 ^c	1.29±0.07 ^c	2.81±0.13 ^b	1.61±0.08 ^c	3.45±0.15 ^a
AgNOR alanı	0.70±0.03 ^a	0.63±0.04 ^{ab}	0.55±0.03 ^b	0.56±0.03 ^b	0.23±0.01 ^c	0.31±0.02 ^c	0.30±0.02 ^c
AgNOR çapı(μm)	1.16±0.03 ^a	1.13±0.04 ^a	1.05±0.06 ^a	1.06±0.03 ^a	0.68±0.03 ^b	0.87±0.03 ^b	0.75±0.03 ^b
AgNOR alanının çekirdek alanındaki oranı (%)	19.33	16.15	12.64	16.18	8.48	9.90	6.10

a-d: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($P<0.05$).

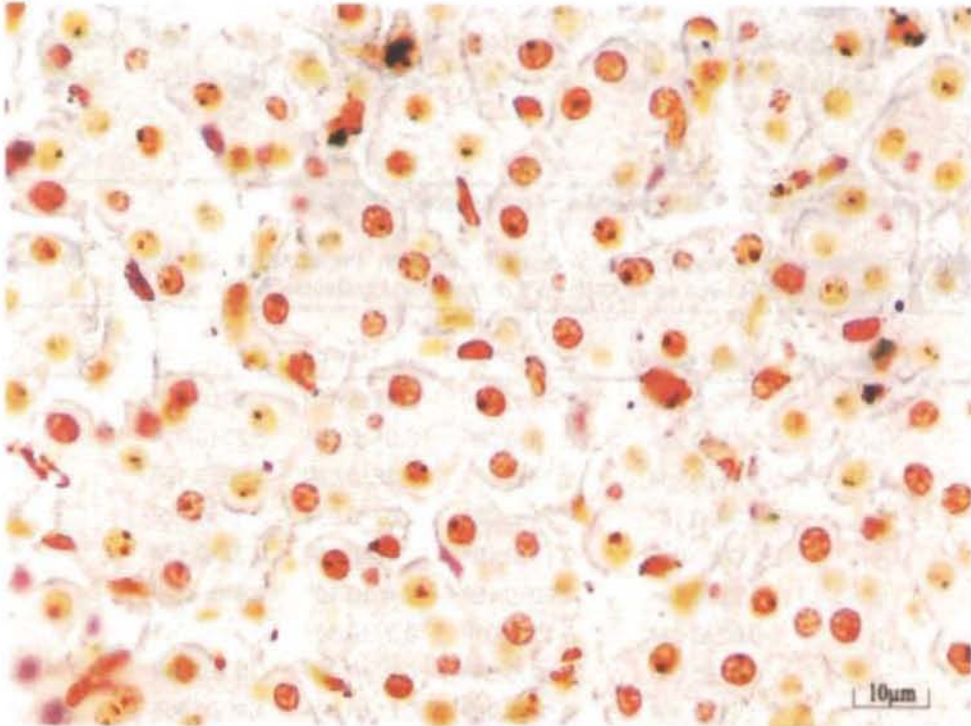
Tablo 3. Yumurtadan çıkıştan sonraki yetiştirme döneminde, erkek ve dişi yumurtacıların hepatositlerinden elde edilen hücre çekirdeği alanı, çekirdek çapı, AgNOR sayısı, AgNOR alanı ve AgNOR çapı değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

Parametre N=100	Cinsiyet	DÖNEMLER			
		ÇIKIŞ GÜNÜ	6. HAFTA	18. HAFTA	32. HAFTA
Çekirdek alanı (μm^2)	μ	3.66±0.28 ^a	2.72±0.07 ^a	3.11±0.11 ^a	8.84±0.47 ^a
X ±SE	μ	3.15±0.22 ^a	2.73±0.09 ^a	3.31±0.10 ^a	3.25±0.31 ^b
Çekirdek çapı (μm)	μ	3.66±0.28 ^a	2.17±0.06 ^a	2.35±0.05 ^b	3.76±0.12 ^a
X ±SE	μ	2.39±0.14 ^b	2.24±0.05 ^a	2.57±0.07 ^a	2.86±0.22 ^b
AgNOR Sayısı (adet)	μ	1.00±0.01 ^b	3.13±0.19 ^a	1.86±0.16 ^a	3.37±0.17 ^a
X ±SE	μ	1.72±0.14 ^a	2.60±0.18 ^b	1.46±0.13 ^a	2.43±0.32 ^b
AgNOR alanı (μm^2)	μ	0.62±0.04 ^a	0.17±0.01 ^b	0.37±0.05 ^a	0.59±0.04 ^a
X ±SE	μ	0.47±0.09 ^a	0.29±0.03 ^a	0.27±0.02 ^a	0.33±0.04 ^b
Ag NOR çapı (μm)	μ	0.15±0.05 ^a	0.56±0.03 ^b	0.86±0.08 ^a	1.06±0.06 ^a
X ±SE	μ	0.93±0.09 ^a	0.80±0.04 ^a	0.73±0.05 ^a	0.86±0.05 ^b

a-b: Farklı cinsiyetlerin aynı parametrelerinde farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 1. Altı haftalık bir broylerin hepatosit çekirdeklerindeki AgNOR'lar görülmektedir. AgNOR boyası. Büyütme çizgisi: 10 μm.



Şekil 2. Altı haftalık bir yumurtacı horozun hepatosit çekirdeklerindeki AgNOR'lar görülmektedir. AgNOR boyası. Büyütme çizgisi: 10 μm.

Tablo 4. Farklı dönemlerde, broyler ve yumurtacı tavukların hepatositlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, çekirdek çapı, AgNOR sayısı, AgNOR alanı ve AgNOR çapı değerlerinin istatistiksel analiz sonuçları

Parametre	IRK	DÖNEMLER				
		11. GÜN	14. GÜN	17. GÜN	ÇIKIŞ GÜNÜ	6. HAFTA
N=100						
Çekirdek alanı (μm^2)	Broyler	4,03±0,12 ^a	3,96±0,16 ^a	2,43±0,07 ^b	3,24±0,08 ^a	2,95±0,16 ^a
$\bar{X} \pm \text{SE}$	Yumurtacı	3,62±0,10 ^a	3,90±0,13 ^a	4,35±0,15 ^a	3,46±0,13 ^a	2,71±0,05 ^a
Çekirdek çapı (μm)	Broyler	2,52±0,04 ^a	2,47±0,06 ^a	2,00±0,05 ^b	2,29±0,04 ^b	2,12±0,03 ^a
$\bar{X} \pm \text{SE}$	Yumurtacı	2,47±0,03 ^a	2,56±0,05 ^a	2,69±0,06 ^a	2,48±0,07 ^a	2,21±0,04 ^a
AgNOR Sayısı (adet)	Broyler	1,52±0,06 ^a	1,48±0,09 ^a	1,85±0,12 ^a	1,64±0,08 ^a	1,76±0,11 ^b
$\bar{X} \pm \text{SE}$	Yumurtacı	1,36±0,05 ^a	1,34±0,08 ^a	1,75±0,09 ^a	1,29±0,07 ^b	2,81±0,13 ^a
AgNOR alanı (μm^2)	Broyler	0,66±0,04 ^a	0,66±0,06 ^a	0,22±0,01 ^b	0,42±0,02 ^a	0,45±0,02 ^a
$\bar{X} \pm \text{SE}$	Yumurtacı	0,70±0,03 ^a	0,63±0,04 ^b	0,55±0,03 ^a	0,56±0,03 ^a	0,23±0,01 ^b
AgNOR çapı (μm)	Broyler	1,09±0,03 ^a	1,18±0,05 ^a	0,67±0,03 ^b	0,93±0,03 ^b	0,94±0,04 ^a
$\bar{X} \pm \text{SE}$	Yumurtacı	1,16±0,03 ^a	1,13±0,04 ^a	1,05±0,06 ^a	1,06±0,03 ^a	0,68±0,03 ^b

a-b:Farklı ırkların aynı parametrelerinde farklı harfler taşıyan değerler istatistiksel açıdan önemlidir ($P<0.05$).

Yumurtacıların hepatositlerinin çekirdek alanı ve çekirdek çapı kuluçkanın 17. gününde broylerlerden önemli derecede yüksektir. Çekirdek çapı da kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde broylerlerden daha yüksek bulunmuştur. AgNOR sayısı ise, broylerlerde çıkış gününde daha fazla iken, kuluçka sonrası 6. haftada yumurtacılar daha fazla AgNOR sayısına sahiptir. AgNOR alanı, kuluçkanın 14. gününde ve kuluçkadan sonraki 6. haftada broylerlerde daha fazla iken, kuluçkanın 17. gününde yumurtacılar daha fazla AgNOR alanına sahiptir. Kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde yumurtacılar daha iri AgNOR'lara sahipken, kuluçka sonrası 6. haftada broylerler daha iri AgNOR'lara sahiptir (Tablo 4).

Tartışma ve Sonuç

Kanatlılarda metafaz kromozomları üzerinde yapılan ilk çalışmalarda, makro ve mikro kromozomlar olmak üzere iki tip kromozom tanımlanmıştır. İlk yıllarda gerçek kromozom olarak nitelenen makro kromozomlardan ayırmak için mikro kromozomlar "kromozoid" olarak da isimlendirilmiş; daha sonraları ise "mikro kromozom" olarak adlandırılmıştır. Tavuk karyotipi, 9 çift makrokromozom ve 30 çift mikro kromozom olmak üzere toplam 78 kromozomdan oluşmaktadır. Kanatlı genlerinin yaklaşık %50'si mikro kromozomlarda bulunur. Yapılan çalışmalar (Habermann ve ark 2001), fibroblast ve nöronlarda mikro kromozomların çekirdeğin ortasında, makrokromozomların ise periferinde lokalize olduğunu göstermektedir. Tavukta rDNA genleri 16 numaralı kromozom üzerinde bulunduğundan, bu kromozom

çifti NOR kromozomu olarak bilinmektedir. Bu nedenle, diploid bir tavuk hücresinde 2 adet NOR ve 2 adet nükleolus bulunabileceği düşünülebilir (Miller ve ark 1996, Masabanda ve ark 2004).

Schmid ve ark (1982), NOR'ların gümüşle boyanma özelliklerinin ribozomal RNA genlerinin transkripsiyonal aktivitesinin bir göstergesi olduğunu ileri sürmektedirler. Bu nedenle, farklı dokuları oluşturan hücrelerin AgNOR sayıları da farklılık göstermektedir. Nitekim, Zaczek ve ark (1992), sağlıklı sıçanların sindirim kanalı epitel hücrelerinin AgNOR parametrelerini inceledikleri çalışmalarında, farklı sindirim kanalının farklı bölgelerindeki AgNOR sayıları ile bunların alanları ve çekirdek alanı AgNOR alanı oranları arasında önemli farklar tespit etmişlerdir. Araştırmacılar (Zaczek ve ark 1992), AgNOR parametrelerinin epitelin proliferasyon aktivitesiyle ilişkili olduğunu, hücrenin lokalizasyonuna bağlı olarak tipik özellikler gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bir nükleustaki AgNOR sayısı ve her bir AgNOR'un alanının, çekirdek alanıyla bağıntılı olduğu da saptanmıştır. Bir organizmanın farklı benzer hücrelerinin veya farklı organizmaların hücrelerinin genomlarında bulunan aktif NOR'ların sayıları arasında belirgin farklılıklar bulunduğu ve aktif NOR sayılarının hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiğine dair ortak bir görüş bulunmaktadır (Goodpasture ve ark 1976, Mikelsaar ve ark 1977, Alberts ve ark 1989).

Tavuklarda, AgNOR'ların normal dokulardaki sayıları, lokalizasyonları büyüklükleri ve çekirdek büyüklüğü ile AgNOR parametreleri arasındaki ilişkiler hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Su ve Delany

(1998), büyüme performanslarının geliştirilmesi yönünde seleksiyona tabi tutulan etçi tavuk ırkları üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar (Su ve Delany 1998), hem saf hatlar içinde ve hem de bu hatlar arasında NOR sayıları ile tiplerinde önemli farklılıklar olduğunu ve bu NOR tiplerinde farklı sayılardaki farklı nükleolus oluşturma kapasitesine sahip olan rRNA genlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Ticari broyler saf hatları; ana ve baba tarafı olmak üzere iki ayrı hat halindeki popülasyonlara uygulanan seleksiyon kriterleri çerçevesinde, önce grantparentler elde edilmesi, bunların da farklı kombinasyonlar halinde çaprazlanması suretiyle elde edilirler. Üreticilere satılan ticari hatlar ise dört genotipik kökenli grandparentin kombinasyonu ile elde edilir. Böylece özel bakım besleme ve üretim teknikleri uygulanmak suretiyle hızlı büyüyen ve daha iri etçi tavuklar elde edilir. Su ve Delany (1998), inceledikleri 13 yüksek verimli broyler hatında, hücrelerin nükleolus büyüklüğünde yüksek oranda polimorfizm bulunduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar (Su ve Delany 1998), broylerde aynı hat içindeki hayvanlarda ve hatlar arasında rRNA geni kopya sayısındaki varyasyona bağlı olarak yüksek oranda nükleolus büyüklüğü polimorfizmi bulunan bireylerin bulunması nedeniyle, ticari broyler hatlarında çok sayıda NOR tipinin bulunduğunu ve bunlarda da farklı sayıda rRNA genleri ve nükleolus oluşturma kapasitesi bulunduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada, karaciğerde ortalama hücre çekirdeği alanı kuluçkanın 17. gününde, yumurtacı tavuklarda $4,35 \mu\text{m}^2$ iken, broylerde $2,43 \mu\text{m}^2$ olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel öneme sahiptir ($P < 0.05$). Diğer dönemlerde, çekirdek alanında ırklar arasındaki farklar önemsizdir ($P > 0.05$). Yumurtacı tavukların çekirdek çapı, kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde broylerlerinkinden önemli derecede ($P < 0.05$) daha yüksektir. AgNOR sayısı, çıkış gününde broylerde daha fazlayken, 6. haftada yumurtacılar da daha yüksek değere sahiptir ($P < 0.05$). Kuluçkanın 14. günü ve kuluçkadan çıkıştan sonraki 6. haftada broylerler daha yüksek AgNOR alanına sahipken, kuluçkanın 17. gününde yumurtacılar daha yüksek AgNOR alanına sahiptir ($P < 0.05$). Kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde yumurtacılar broylerden daha iri AgNOR'lara sahipken, kuluçkadan çıkıştan sonraki 6. haftada broylerler daha iri ($P < 0.05$) AgNOR'lara sahiptir (Tablo 4).

In vitro ve in vivo çalışma sonuçları, broylerde protein sentez ve yıkım hızındaki den-

genin, protein yapımı yönünde değişmiş olduğunu göstermektedir (Klasing ve ark 1987). Hücresel düzeyde büyüme ve protein sentez hızının artması, sitoplazmik ribozomların sayılarının artmasını gerektirir. rDNA genlerinin transkripsiyonunun ve ribozom yarılanma ömrünün artışının, hücredeki ribozom düzeylerinin artışında önemli katkıları vardır (Larson ve ark 1991). Bununla birlikte, tek yönlü seleksiyon yapılan sürülerde özel bir organ sistemi (broylerde kas dokusu hücrelerinde ve yumurtacıların ovidukt) hücrelerindeki rDNA kopya sayısında artış olup olmadığı hakkında yeterli deneysel veri bulunmamaktadır. Sunulan bu çalışmada, et veya yumurta verimleri bakımından geliştirilmiş olan 2 farklı tavuk ırkının verim özelliği bakımından önemli olan hücrelerinin (göğüs ve bacak kası kas telleri) hücre çekirdeği ve AgNOR parametreleri bakımından, düzenli ve ayırd edici farklılıklar tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, gerek embriyonik gerekse de kuluçka sonrası dönemlerde, farklı dokuların incelenen parametreleri arasında önemli farklar da bulunmaktadır.

Elde edilen bulgulara dayanılarak aşağıdaki sonuçlara varılmıştır;

Yumurtacıların hepatositlerinin çekirdek alanı ve çekirdek çapı kuluçkanın 17. gününde broylerlerden önemli derecede yüksektir. Çekirdek çapı da kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde broylerlerden daha yüksek bulunmuştur. AgNOR sayısı ise, broylerde çıkış gününde daha fazla iken, kuluçka sonrası 6. haftada yumurtacılar daha fazla AgNOR sayısına sahiptir. AgNOR alanı, kuluçkanın 14. gününde ve kuluçkadan sonraki 6. haftada broylerde daha fazla iken, kuluçkanın 17. gününde yumurtacılar daha fazla AgNOR alanına sahiptir. Kuluçkanın 17. günü ve çıkış gününde yumurtacılar daha iri AgNOR'lara sahipken, kuluçka sonrası 6. haftada broylerler daha iri AgNOR'lara sahiptir.

Yukarıdaki sonuçlar, dikkate alınmak suretiyle yumurtacı ve broyler ırkı tavukların verim özellikleri ve incelenen parametreler arasında direkt olarak bağlantı kurulması imkanı bulunmamakla birlikte, özellikle kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemde hayvanların verim kayıtları yanında AgNOR parametrelerini içeren çalışmaların birlikte yürütülmesinin yararlı olacağı kanaatine varılmıştır. Çalışma sonucunda ayrıca, incelenen iki tavuk ırkının farklı dönemlerdeki çekirdek ve AgNOR parametreleri hakkında daha sonra yapılacak olan çalışmalar için de temel veriler sağlanmıştır.

Kaynaklar

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD (1989) Molecular biology of the cell. Garland Publishing. Newyork. London.
- Cancado RP, Yurgel LS, Sant'Anna M (2001) Evaluation of the nucleolar organiser region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol*, 37,5: 446-454.
- Canet V, Montmasson MP, Usson Y, Giroud F, Brugal G (2001) Correlation between silver-stained nucleolar organiser region area and cell cycle time. *Cytometry*, 43:110-116.
- Culling CFA, Allison RT and Barr WT (1985) Cellular pathology techniques. Butterworths and Co Ltd, London.
- Ellinger A and Wachtler F (1980) Über eine methode zur darstellung des nucleolus im licht- und electronmikroskop. *Mikroskopie*, 36: 330-335.
- Garcia-Moreno LM, Conejo NM, Pardo HG, Gomez M, Martin FR, Alonso MJ, Arias JL (2001). Hippocampal AgNOR activity after chronic alcohol consumption and alcohol deprivation in rats. *Physiol and Behav*, 72,1-2: 115-121.
- Godoy APR, Godoy MR, Meissner C, Oehmichen M (2001). Proliferative activity of epidermal basal cells after wounding - AgNOR counts compared with bromodeoxyuridine reactivity in rats. *Exp ToxicolPathol*, 53,1: 65-69.
- Goodpasture C, Bloom SE, Hsu TC and Arrighi FE (1976) Human nucleolus organizers: the satellites or the stalks. *Am J Hum Genet*, 28:559-566.
- Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, Von Hasse J, Bauer K, Weinberg J, Cremer C, Cremer T, Solovei I (2001). Arrangements of macro- and micro chromosomes in chicken cells. *Chromosome Res*, 9:569-584.
- Hamburger V and Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88, 1: 49-92.
- Hara T, Sato T, Mori S, Shirai H, Maruo Y ve Minagi S (2000) Argyrophilic nucleolar organiser regions (Ag-NORs) in mucosal epithelium under experimental denture bases in rats. *J Oral Pathol*, 29:33-38.
- Hernandez-Verdun D, Hubert J, Bourgeois CA, Bouteille M (1980) Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. *Chromosoma*, 79,3:349-62.
- Hoyo E, Kanitakis J, Euvrard S and Thivolet J (1993) Proliferation characteristics of cutaneous squamous cell carcinomas developing in organ graft recipients. Comparison with squamous cell carcinomas of nonimmune compromised hosts by counting argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions. *Arch Dermatol*, 129:324-327.
- Hubbell HR, Rothblum L I and Hsu TC (1979) Identification of a silver binding protein association with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. *Cell Biol Int Rep*, 3:615-622.
- Jordan EG (1979) The nucleolus at Weimar. *Nature*, 281, 529-530.
- Khanna A and Dutta J (2002) Effect of enrofloxacin on AgNOR counts in chick bone marrow nuclei. *Indian J Exp Biol*, 40, 3:345-348.
- Klasing KC, Calvert CC, and Jarrell VL (1987) Growth characteristics, protein synthesis, and protein degradation in muscles from fast and slow-growing chickens. *Poult Sci*, 66:1189-1196.
- Konuk T (1981) Pratik fizyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları 378, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Korek BG, Martin H and Wenzelides K (1991) A modified method for the detection of nuclear organizer regions (AgNORs). *Acta Histochem*, 90:155-157.
- Larson DE, Zahradka P and Sells BH (1991) Control points in eukaryotic ribosome biogenesis. *Biochem. Cell Biol*. 69:5-22-.
- Leek RD, Alison MR, Sarraf CE (1991) Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J Pathol*, 165, 1:43-51.
- Manuelidis L (1984) Active nucleolus organisers are precisely positioned in adult central nervous system cells but not in neuroectodermal tumour cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 43,3: 225-241.
- Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PCM, Vignal A, Fillon V, Walsh PS, Cox H, Tempest HG, Smith J, Habermann F, Schmid M, Matsuda Y, Ferguson-Smith MA, Croijmans RPMA, Goenen MAM, Griffin DK (2004). Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: The first complete avian karyotype. *Genetics*, 166:1367-1373.
- Mateus RP, Taboga SR (2001) Long-term starvation effects on *Mus musculus* hepatocyte nuclear phenotypes. *Caryologia*, 54,1: 73-81.
- Mikelsaar AV, Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG and Schnedl W (1977) Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man. *Hum Genet*, 37:73-77.
- Miller M M, Goto R M, Taylor R L, Zoorob R, Auftray C, Briles R W, Briles W E, Bloom SE (1996) Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR micro chromosome and evidence for high frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Procc Natl Acad Sci USA*, 93:3958-3962.
- Pischinger A (1926) Die lage des isoelektrischen punktes histologischer elemente als ursache ihrer verschiedenen färbbarkeit. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 3, 167-197.

Ploton D, Bendayan M and Adnet JJ (1983) Ultrastructural localization of Ag-NOR proteins and nucleic acids in reticulated nucleoli. *Biol Cell*, 49:29-34.

Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F and Adnet JJ (1986) Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolus organiser region at the optical level. *Histochem J*, 18: 5-14.

Schmid M, Loser C, Schmidtke J, Engel W. (1982) Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma*, 86,2:149-79.

Schwarzacher HG and Wachtler F (1993) The Nucleolus. *Anat Embryol*, 188:515-536.

Severgnini M, Ferraris ME, Carranza M (2002) Nucleolar organizer regions (NORs) evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholics. *J Oral Pathol Med*, 31,10: 585-589.

Su MH and Delany ME (1998) Ribosomal RNA gene copy number and nucleolar size polymorphisms within and among chicken lines selected for enhanced growth. *Poult Sci*, 77,12:1748-1754.

Trent JM, Carlin DA and Davis JR (1981) Expression of silver stained nucleolar organizing regions (Ag-NORs) in human cancer. *Cytogenet Cell Genet*, 32:31-38.

Wachtler F, Hopman AHN, Wiegant J and Schwarzacher HG (1986) On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new nonautoradiographic in situ hybridization method. *Exp Cell Res*, 167:227-240.

Zaczek M, Maciejowski J, Gil K, Szot W, Chlap Z. (1992) Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in the normal epithelium of different parts of the digestive tract in rats. *Acta Pathol Jpn*, 42, 8:573-578.