

## Gender Determination of Ten Days Chick Embryo by PCR

Muhammet Kaya<sup>1,a,\*</sup>, Samed Konucuk<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Eskişehir Osmangazi University, 26160 Eskişehir, Turkey

<sup>2</sup>Agricultural Genetic Engineering, Ömer Halisdemir University, Faculty of Agricultural Sciences and Technologies, 51240 Niğde, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 12/11/2018 Accepted : 02/01/2019</p> <p><b>Keywords:</b> Sex Determination Embryo Fowl PCR DNA</p>	<p>Sex of one-day-old chicks are determined by feather characteristics (length or colour) of the breed or line, or vent sexing by highly trained specialist. DNA-based methods are being developed to accurately identify sex in early period of the chick embryos. One of these is the PCR method in which primers are designed according to the sequences of poultry sex chromosomes (ZZ male and ZW female). In this study, <i>Xhol</i> repeat sequence on the W chromosome and specific DNA sequences of the 18S ribosomal gene were amplified by PCR using DNA obtained from amniotic fluid of 10 day old embryos (n=30). On the band image of the gel PCR products, samples generating a single band (256 bp) were determined as male and samples giving two bands (256 and 415 bp) were determined as females. The gender determination in the early stages of the chick embryo can be done accurately and fast by PCR method.</p>

Tavukçuluk Araştırma Dergisi 16(1): 19-22, 2019

## On Günlük Cıvciv Embriyosunda PCR ile Cinsiyet Tayini

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 12/11/2018 Kabul : 02/01/2019</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Cinsiyet belirleme Embriyo Tavuk PCR DNA</p>	<p>Günlük cıvcivlerin cinsiyet ayrımı,ırka özgü tüy rengi veya tüy gelişim hızına bağlı olarak ya da özel eğitilmiş seksörler tarafından kloaktan yapılmaktadır. Cıvciv embriyosunun erken döneminde, cinsiyetin doğru bir şekilde tanımlaması için DNA'ya dayalı yöntemler geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden biri olan PCR tekniğinde kanatlı cinsiyet kromozomlarının dizilerine (ZZ erkek ve ZW dişi) göre dizayn edilen primerler kullanılır. Bu çalışmada 10 günlük embriyo (n=30) amniyotik sıvılarından elde edilen DNA kullanılarak yapılan PCR çalışmasında W kromozomu üzerindeki <i>Xhol</i> tekrar dizisi ve 18S ribozomal gene ait belirli bölgeler çoğaltılmıştır. Araştırmamızda, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez bant görüntüsüne göre tek bant (256 bp) veren örnekler erkek, iki bant (256 ve 415 bp) veren örnekler dişi olarak belirlenmiştir. PCR yöntemi ile embriyonun erken dönemlerinde cinsiyet tespiti doğru ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir.</p>

<sup>a</sup> [muhammetkaya@ogu.edu.tr](mailto:muhammetkaya@ogu.edu.tr) <sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6474-121X> | <sup>c</sup> [skonucuk@gmail.com](mailto:skonucuk@gmail.com) <sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2423-2733>

## Giriş

Tavukçuluk sektöründe, günlük yaştaki civcivlerin cinsiyet ayrımı, ıslah çalışmaları ve üretim işletmeleri bakımından son derece önemlidir. Yumurta tavukçuluğunda yumurta üretimi için dişi civcivlerin büyütülmesi ve etlik piliç yetiştiriciliğinde erkek ve dişilerin ayrı ayrı yetiştirilmesi cinsiyet ayrımının önemini ortaya koymaktadır (Türkoğlu ve Sarıca, 2009). Ticari tavuk yetiştiriciliğinde günlük yaştaki civcivlerde tüy rengine (Yetişir, 2014), tüy gelişim hızına (Yetişir, 2014), ayak rengine göre (Aksoy ve ark., 2002) cinsiyet tayini yapılabildiği gibi özel eğitilmiş seksörler tarafından da (kloaktan) (Göger, 2017) cinsiyet belirlenebilmektedir. Embriyodan cinsiyet ayrımında ise östrojen seviyeleri (Benowitz-Fredericks, 2005) ve cinsiyet kromozomlarının tespiti (Göger, 2017) gibi farklı yöntemler vardır. Erkek civcivlerin belirlenmesinde zahmetli ve zaman alan bir işlem olan karyotipleme analizine alternatif olarak geliştirilen yöntemde, 5 ve 9 gün arasındaki civciv embriyosundan gonad doku hücreleri toplanarak, toplanan bu dokulardan elde edilen DNA'lara Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) uygulaması yapılmaktadır (Clinton ve ark., 2001).

Civciv embriyosunda genital sırt (genital ridge) 3,5 günlük yaşta gözükmeye başlarken 5,5 günlük yaşta testis veya yumurtalık oluşmaya başlar. Ancak embriyoların morfolojik olarak cinsiyetlerinin belirlenmesi 7,5 - 8. güne kadar mümkün değildir (Chue ve Smith, 2011). Kanatlılarda homogametik cinsiyet (ZZ) erkek, heterogametik cinsiyet (ZW) ise dişidir. Kanatlı gonad gelişimi morfolojik olarak memelilere benzer olsa da memelilerde *Sry* geni gibi cinsiyet farklılaşmasından sorumlu olan bir gen kanatlılarda tespit edilememiştir

Bu nedenle embriyo ve civcivlerde erken yaşta, kesin sonuçlar verecek cinsiyet ayrımı yöntemleri dişilerde bulunan W kromozom DNA dizilerine dayanan PCR protokolleri kullanarak geliştirilmiştir (Clinton ve ark., 2001; Chue ve Smith, 2011). Griffiths ve ark. (1998) tarafından bildirilen yöntemde W kromozomunda yer alan CHD (chromo-helicase-DNA-binding)-W ve Z kromozomunda yer alan CHD-Z gen bölgesinde yapılan PCR işlemi sonuçlarına göre günlük yaştaki civcivlerde cinsiyet ayrımı yapılmaktadır. Bu metoda göre birçok kanatlı türünde korunmuş olan CHD-W ve CHD-Z genlerine özgü dizayn edilen primer çiftleri ile PCR işleminde çoğaltılan PCR ürünlerinin büyüklükleri agaroz jelde belirlenerek, bant büyüklüklerine göre cinsiyet ayrımını gerçekleştirilmektedir. Clinton ve ark. (2001), W kromozomda yer alan *XhoI* geninin 415 baz çifti (bç) bir ürünü ile 18S ribozomal geninin 256 bç'lik bir ürünü çoğaltmak için PCR protokolü dizayn ederek dişi ve erkek embriyoları başarıyla cinsiyetlerini ayırmışlardır. Kalina ve ark. (2012) günlük civcivlerde cinsiyet ayrımı yapmak için W kromozomuna ve mitokondri sitokrom b (CYTB) genine özgü iki primer çifti kullanarak yaptığı PCR çalışmasında cinsiyetleri doğru olarak tespit etmişlerdir. Günlük civcivlerin gonadlarından alınan mesajcı RNA (mRNA) kullanarak qRT-PCR (kantitatif Real Time-PCR) yöntemi ile civcivlerin cinsiyetleri başarıyla belirlenmiştir (Wan ve ark., 2017). Ayrıca embriyoların W kromozomuna ve CR1 (common repeat sequence) genine özgü problemler kullanarak yapılan FRET (Fluorescent

Resonance Energy Transfer- Floresans Rezonans Enerji Transferi) tekniği ile cinsiyet ayrımı yapılmıştır (Clinton ve ark., 2016).

Bu çalışmanın amacı civciv embriyolarında erken dönemde (10 günlük embriyolarda) PCR ile cinsiyetin hızlı ve güvenli bir şekilde belirlenebildiğini göstermektir.

## Materyal ve Yöntem

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen çalışmada Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden (ATAE) temin edilen 30 adet dömlü tavuk yumurtasından izole edilen genomik (g) DNA'lar araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Kuluçkanın 10. gününde embriyoların gelişimi sonlandırılarak yumurtanın allantoik sıvısından alınan örneklerden (0,25 ml) Fenol-Kloroform yöntemi kullanılarak gDNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen gDNA'ların saflık ve miktarları spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 1000) ile kontrol edilmiştir. Araştırmada laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan ergin 4 horoz ve 4 tavuktan alınan kan örnekleri de kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır. Elde edilen gDNA'lar  $bdH_2O$  içinde çözündürülerek PCR çalışmaları yapılabildiği kadar  $-20^{\circ}C$  de saklanmıştır.

### PCR Çalışması

Araştırmada, W kromozomu üzerindeki *XhoI* tekrar dizisinin 415 bç'lik

(F: 5'CCCAAATATAACACGCTTCACT 3';  
R:5' GAAATGAATTATTTTCTGGCGAC 3')

ve 18S ribozomal gen üzerindeki 256 bç'lik

(F: 5' AGCTCTTTCTCGATTCCGTG 3';  
R: 5' GGGTAGACACAAGCTGAGCC 3')

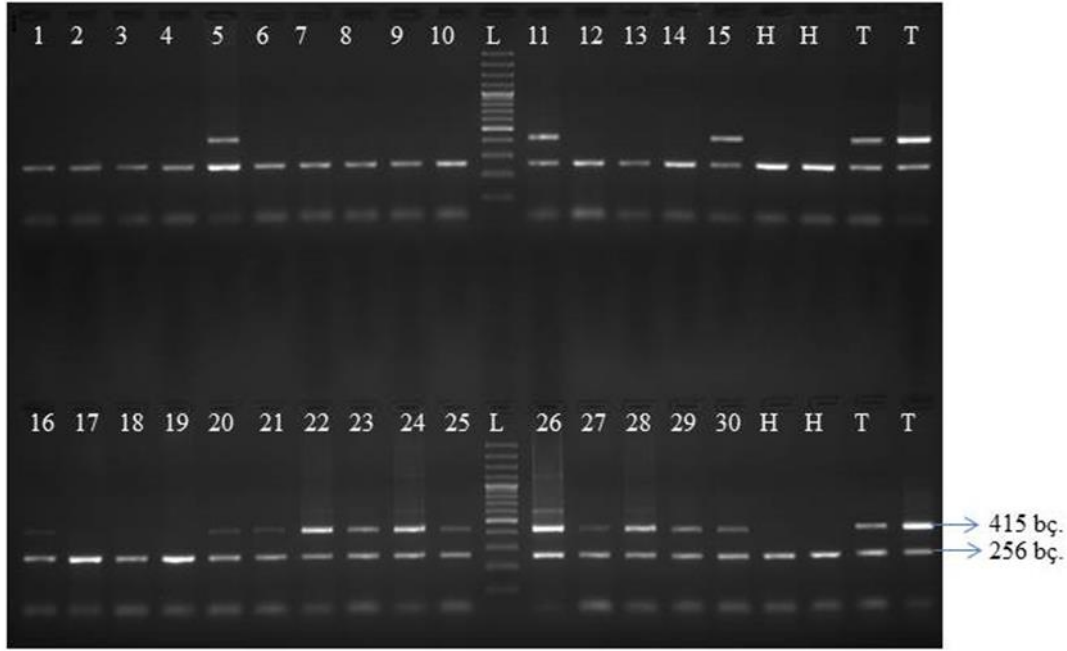
bölgeler Clinton ve ark. (2001) dizayn ettiği primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiştir. PCR karışımı, 25 µl toplam hacim içerisinde 1 U Taq DNA Polimeraz (Fermentas), 10 X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH. 8,8), 2,5 mM  $MgCl_2$ , 200 µM dNTP (Fermentas), *XhoI* primerlerin her birinden 1 µM, 18S primerlerin herbirinden 0,5 µM ve 1 µl DNA (50-100 ng) içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR şartları;  $94^{\circ}C$ 'de 3 dakika ilk denatürasyon, 30 döngü  $94^{\circ}C$ 'de 30 sn,  $56^{\circ}C$ 'de 30 sn ve  $72^{\circ}C$ 'de 30 sn ve son olarak,  $72^{\circ}C$ 'de 5 dakikalık son uzama olacak şekilde uygulanmıştır. PCR ürünleri görüntülenmesinde %1,5 agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jel, RedSafe ile boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenerek PCR ürünlerinin büyüklükleri belirlenmiştir.

## Bulgular

ATAE kuluçkahanesinde 10 günlük gelişiminde olan 30 adet dömlü tavuk yumurtasının allantoik sıvısından alınan örneklerden elde edilen gDNA'lar ile yapılan multipleks PCR işlemi sonucunda 415 bç ve 256 bç

uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1). Kanatlılarda erkekler homogametik (ZZ) ve dişiler heterogametik (ZW) olduğundan 256 bç büyüklükteki band (18S ribozomal gen) her iki cinsiyette görülmekte, 415 bç büyüklüğündeki band (W kromozomu üzerindeki *XhoI* tekrar dizisi ürünü) ise sadece dişilerde görülmektedir

(Clinton ve ark., 2001). Bu bilgilere dayanarak Şekil 1’de verilen band görüntüsüne göre embriyoların cinsiyet tayini yapılmış, kontrol için kullanılan ergin tavuk ve horoz örneklerinde de aynı görüntü tespit edilerek, cinsiyetler teyit edilmiştir.



Şekil 1. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

Kanatlılarda erkekler (ZZ) ve dişiler (ZW) olduğundan sadece 256 bç büyüklükteki banda sahip örnekler erkek; 256 bç ve 415 bç büyüklüğündeki bantlara sahip örnekler dişi olarak tespit edilmiştir. (L: DNA marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus-SM0243); 1-30 Embriyo örnekleri; H: Kontrol horoz DNA; T: Kontrol tavuk DNA); bç: baz çifti)

Figure 1. Agarose gel image of PCR products

## Sonuç ve Tartışma

Memelilerdeki *Sry* geni gibi cinsiyet farklılaşmasından sorumlu olan bir gen kanatlılarda hala belirlenememesine rağmen kanatlılarda erkeklerin ZZ ve dişilerin ZW kromozomlarına sahip olmalarına dayalı PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde W kromozom DNA dizilerine karşın Z kromozom veya diğer kromozomlarda bulunan DNA dizileri kullanılmaktadır. Bu dizilere göre tasarlanmış primerler kullanarak yapılan PCR sonucunda dişi ve erkek örneklerden alınan DNA’lardan farklı büyüklükteki PCR ürünleri çoğaltılır. Embriyo ve civcivlerde cinsiyet tayini için yapılan PCR çalışmalarında araştırmacıların bazıları W kromozomuna karşın Z kromozomu dizisini kullanırken (Griffiths ve ark., 1998) başka araştırmacılar mitokondriyel dizisini (Kalina ve ark., 2012) veya 18S ribozomal dizilerini (Clinton ve ark., 2001; Wan ve ark., 2017; Turkyilmaz ve ark., 2010) tercih etmişlerdir. Çalışmamızda PCR sisteminin çalıştığını göstermek ve yüksek kopya sayısından dolayı W kromozom dizilerine karşın S18 dizilerine göre yapılmış primerler tercih edilmiştir.

Bu çalışmada embriyonun allantoik sıvısından alınan dokularda kullanılarak PCR yöntemi ile cinsiyet tayini yapılmıştır. Bu amaçla yapılan daha önceki çalışmalarda;

5,5 günlük embriyonun allantoik sıvısından (Clinton ve ark., 2001), 6 ve 12 günlük embriyo ile günlük civcivlerin gonad dokularından (Wan ve ark., 2017), embriyonun blastodermal hücrelerinden (Naito ve ark., 2003) ve 7 günlük embriyonun yumuşak dokularından (Minematsu ve ark., 2004) alınan doku örnekleri kullanılmıştır. Türkiye’de kanatlılarda cinsiyet belirlemek için PCR yöntemini kullanarak daha önce yapılan tek çalışmada günlük civcivler öldürülerek koryoallantoik membran (KAM)’dan örnek olarak PCR çalışmaları yürütülmüş ve morfolojik olarak steromikroskop altında günlük civcivlerin cinsiyetlerini belirlemişlerdir (Turkyilmaz ve ark., 2010). Bu çalışma Türkiye’de tavukların embriyonik döneminde cinsiyet tayini yapılan ilk çalışmadır.

Embriyonun allantoik sıvısından alınan 0,25 ml örneklerden DNA izole edilerek yapılan çalışmamızda başarılı sonuçlar alınmıştır. Clinton ve ark. (Clinton ve ark., 2001) embriyodan aldıkları allantoik sıvısını seyrelterek ve Haunshi ve ark. (Haunshi ve ark., 2008) embriyo yumuşak dokularından aldıkları örnekleri alkalın yöntemle hazırladıkları solüsyonla yaptıkları PCR çalışmalarında benzer sonuçlar almışlardır. Yapılan çalışmalar (Clinton ve ark., 2001; Haunshi ve ark., 2008)

daha az doku örneğinden DNA izole etmeden de PCR çalışmasından sonuç alınabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada tavuk embriyolarının cinsiyetini belirlemek için yapılan PCR yöntemi diğer kanatlılar içinde kullanılabilir. Kalina ve ark. (2012) yetişkin tavuk, hindi, sülün ve kaz da Griffiths ve ark. (1998) tavuk, hind bülbülü, güvercin, kırlangıç, baykuş örnekleri ile yaptığı PCR çalışması ile cinsiyet ayırımı gerçekleştirmişlerdir.

Modern kuluçkahanelerde çok sayıda embriyoların hızlıca ve doğru olarak cinsiyetlendirilmesi için, PCR uygun bir teknik olduğu görülmektedir. Bu tekniğin büyük ticari işletmelerde kullanılabilmesi için yumurtadaki embriyolara zarar vermeden örneklerin alınması ve PCR reaksiyonlarının kapsamlı bir saflaştırma ve şablon DNA'sının nicelleştirilmesi olmaksızın gerçekleştirilebilmesi arzu edilir.

Kuluçkadaki civciv embriyolarının cinsiyeti 7,5 günlük ve sonrası günlerde embriyonik gelişmenin sonlandırılmasından sonra gonadların morfolojik muayenesiyle belirlenebilirken PCR yöntemi ile daha erken dönemlerde embriyoya zarar vermeden alınan az miktardaki doku örneği ile cinsiyet belirlenebilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada PCR yöntemiyle 10 günlük embriyolarda cinsiyet belirlendiği gibi yapılan çalışmalarda 5,5 günlük (Clinton ve ark., 2001), 6 günlük (Wan ve ark., 2017), 7 günlük (Minematsu ve ark., 2004), 12 günlük embriyonun (Wan ve ark., 2017) ve günlük civcivlerde (Clinton ve ark., 2001; Kalina ve ark., 2012; Wan ve ark., 2017; Turkyilmaz ve ark., 2010; Haunshi ve ark., 2008) cinsiyet tayini yapılabileceği gösterilmiştir.

## Kaynaklar

**Aksoy, F.T., Atasoy, F., Onbaşilar, E.E., Apaydin, S., 2002.** Denizli Irkı Günlük Civcivlerde Tüylene Özelliklerinden Yararlanarak Cinsiyeti Belirleme Olanaklar. Turk J Vet Anim Sci, 26: 567-575.

**Benowitz-Fredericks, Z.M., Kitaysky, A.S., Wingfield, J.C., 2005.** Steroids in Allantoic Waste: An Integrated Measure of Steroid Exposure in Ovo. Annals of the New York Academy of Sciences, 1046(1): 204-213.

**Chue, J., Smith, C.A., 2011.** Sex determination and sexual differentiation in the avian model. FEBS J, 278(7): 1027-34.

**Clinton, M., Haines, L., Belloir, B., McBride, D., 2001.** Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol. Br Poult Sci, 42(1): 134-8.

**Clinton, M., Nandi, S., Zhao, D., Olson, S., Peterson, P., Burdon, T., McBride, D., 2016.** Real-Time Sexing of Chicken Embryos and Compatibility with in ovo Protocols. Sex Dev, 10(4): 210-216.

**Göger, H., 2017.** Civciv Cinsiyetini Kuluçkadan Çıkmadan Önce veya Günlük Yaşta Belirleme Yöntemleri. Tavukçuluk Araştırma Dergisi 14(1): 13-19.

**Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., Dawson. R. J., 1998.** A DNA test to sex most birds. Mol Ecol 7: 1071-1075.

**Haunshi, S., Pattanayak, A., Bandyopadhyaya, S., Saxena, S.C., Bujarbaruah, K.M., 2008.** A Simple and Quick DNA Extraction Procedure for Rapid Diagnosis of Sex of Chicken and Chicken Embryos. J Poult Sci 45: 75-81

**Kalina, J., Mucksová, J., Yan, H., Trefil, P., 2012.** Rapid sexing of selected Galliformes by polymerase chain reaction. Czech J. Anim. Sci., 57(4): 187-192.

**Minematsu, T., Misato, S., Yumiko, T., Atsushi, T., Yukio, K., 2004.** Simplified DNA Extraction Methods for Sexing Chick Embryos. J Poult Sci 41: 147-154.

**Naito, M., Sano, A., Kasashima, T., Nakamichi, H., Haumi, T., Matsubara, Y., Kuwana, T. A., 2003.** A Simple Method for Sexing Chicken Embryos at Stage X. J Poult Sci 40: 226-230.

**Turkyilmaz, M.K., Karagenc, L., Fidan, E., 2010.** Sexing of newly-hatched chicks using DNA isolated from chorio-allantoic membrane samples by polymerase chain reaction in Denizli chicken. Br Poult Sci, 51(4): 525-9.

**Türkoğlu, M., Sarıca, M., 2009.** Tavuk genetiği ve ıslahı., Tavukçuluk Bilimi, Yetiştirme, Besleme ve Hastalıklar, Edi.: M. Türkoğlu and M. Sarıca, p: 317-352. Bey Ofset Matbaacılık, Ankara.

**Wan, Z., Lu, Y., Rui, L., Yu, X., Li, Z., 2017.** Sexing chick mRNA: A protocol based on quantitative real-time polymerase chain reaction. Poult Sci, 96(3): 537-540.

**Yetişir, R., 2014.** Cinsiyete Bağlı Tüylene Genleri (k+, K) ve Günlük Yaşta Cinsiyet Ayırımına İmkan Veren Ebeveyn Soylar Geliştirme, Ulusal Kümes Hayvanları Kongresi, Elazığ.