T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KULUÇKA ÖNCESİ VE ERKEN EMBRİYONİK DÖNEMDE DÖLLÜ VE DÖLSÜZ TAVUK YUMURTASININ PANDER NÜKLEUSU VE EMBRİYONİK DİSK HÜCRELERİ ÜZERİNDE IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEMELER

Mahmut Küçükkömürcü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. İlhami Çelik

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202042 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Mendel yasasına göre evcil bir kanatlıda erkek ve dişi cinsiyet oranının 1:1 olması beklenir. Et tavukçuluğunda erkek ve dişilerin verim performansı birbirine yakın olduğundan, her iki cinsiyet de besiye alındığı halde, yumurta tavuklarının et verimi oldukça düşük olduğundan günlük-erkek civcivler itlaf edilmektedir. Örneğin, yılda ıskartaya çıkarılan günlük-erkek civciv sayısı, Kuzey Amerika'da 370 milyon, Avrupa'da 420 milyon, sadece Almanya'da 40 milyondur. Dünyada ise bu sayının 7 milyar günlük-erkek civcive ulaştığı bildirilmektedir. Bu durum, günümüz kuluçka sektörünün en önemli sorunlarındandır. Günlük-erkek civcivlerin itlaf edilmesi, yumurta kaynaklı ekonomik kayıplara ve kuluçka sırasında harcanan emek ve enerjinin israf olmasına yol açmaktadır. Aynı zamanda günlük civcivlerin sırf erkek oldukları gerekçesiyle öldürülmesi, önemli bir ahlaki ve etik sorun olup, son yıllarda çokuluslu bir tepki doğurmuştur.

Kuluçka sektörünün diğer bir sorunu da infertil yumurtaların değerlendirilememesidir. İnfertil yumurtaların oranı düşük olsa da sektörün büyüklüğü dikkate alındığında, böyle yumurtaların değerlendirilememesi sonucu büyük bir ekonomik kaybın meydana geldiği açıktır.

Bu problemin üstesinden gelebilmek amacıyla hem etçi ve hem de yumurta verimi yüksek olan çift verimli hatların geliştirilmesi, erkekleri hızlı canlı ağırlık kazanan yumurtacı hatların geliştirilmesi ve yumurta içi (in ovo) -cinsiyet tayini gibi farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Yumurta verimiyle canlı ağırlık kazancı arasında negatif korelasyon bulunduğundan, ilk yaklaşımın başarı şansı sınırlıdır. Canlı ağırlık kazancının iyileştirilmesi yumurta verimini düşürdüğünden, bu yaklaşım da başarılı olamamaktadır. Yukarıdaki nedenlerle son yıllarda in ovo-cinsiyet tayini üzerinde oldukça yoğun çalışmalar yürütülmektedir.

Genel olarak kuluçka sektöründe sadece döllü yumurtaların, özellikle de yumurta tavukçuluğunda sadece dişi embriyolu yumurtaların kuluçkaya konması, enerji, işçilik ve diğer masraflarda önemli oranda tasarruf sağlayacak; aynı zamanda kuluçka makinelerinin verimlilik ve karlılığını da önemli oranda artıracaktır. Bu yolla toplumların etik kaygıları da daha insancıl bir şekilde giderilmiş olacaktır.

Yukarıda açıklanan nedenlerle kuluçka sektöründe kuluçka öncesi veya kuluçkanın ilk birkaç gününde yumurtaya zarar vermeden (non invaziv) in ovo yöntemlerle fertilitenin ve embriyonun cinsiyetinin belirlenmesine acil ihtiyaç vardır. Bu yüzden, kuluçkalık yumurtayı hasara uğratmayan ve kuluçka başarısını düşürmeyen bir embriyo cinsiyet tayini yönteminin geliştirilmesi amacıyla yoğun olarak çalışılmaktadır.

Kanatlılarda cinsiyet kromozomları memeli türlerin aksine dişide heterogametik iken (ZW), erkeklerde homogametiktir (ZZ). Z kromozomu W kromozomundan 2 kat daha iri olduğundan, daha fazla DNA taşımaktadır. Bu nedenle horozların somatik hücrelerinde yaklaşık %2 kadar daha fazla DNA bulunur. Bu özellikten yararlanılarak, kuluçka öncesi veya kuluçkanın erken döneminde civcivlerin cinsiyetlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bilimsel çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada, horoz ve tavukların perifer eritrosit çekirdekleriyle döllü ve dölsüz yumurtaların Pander nükleusu ve blastodisk hücrelerinin hücre çekirdekleri, histokimyasal ve mikromorfometrik yöntemlerle incelenerek, horozlarla tavukların ve döllü yumurtaların DNA içerikleri arasındaki farkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ... ii
İÇİNDEKİLER ... iv
ÖZET ... vi
ŞEKİLLER DİZİNİ ... x
ÇİZELGELER DİZİNİ ... xi
1. GİRİŞ ... 1
1.1. Kanatlılarda genotipik ve fenotipik cinsiyetin belirlenmesi ... 1
1.2. Tavuk embriyosunda fenotipik cinsiyetin belirsiz olduğu indiferent evre ... 3
1.3. Erkek kanatlılarda fenotipik cinsiyetin belirginleşmesi ve testislerin gelişimi ... 5
1.4. Dişi kanatlılarda fenotipik cinsiyetin belirginleşmesi ve sol ovaryumun gelişmesi ... 6
1.5. Kanatlılarda zıt cinsiyet oluşumu (sex reversal) ... 8
1.6. Kanatlılarda günlük civcilerde ve yumurtalarda kuluçka öncesi ve erken kuluçka döneminde *in ovo* uygulanan fertilite ve cinsiyet belirleme yöntemleri 9
1.6.1. Optik spektroskopi yöntemleri ... 10
1.6.1.1. Raman spektroskopisi ... 11
1.6.1.2. Floresans spektroskopisi ... 14
1.6.1.3. Fourier transform-infrared (FT-IR) görüntüleme ve spektroskopisi ... 14
1.6.1.4. VIS/NIR spektroskopisi ... 15
1.6.2. Yumurtada cinsiyet tayini amacıyla uygulanan diğer metotlar ... 15
1.6.2.1. ELISA ile hormon analizleri ... 15
1.6.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri ... 16
1.6.2.3. Yumurtanın morfometrik verileri esas alınarak cinsiyet tayini ... 16
1.6 2.4. Yumurta kokusundaki farktan cinsiyet tayininde yararlanılması ... 17
1.6.2.5. Flow sitometriyle hücrelerde DNA miktarının belirlenmesi ve bu yöntemle cinsiyet tayini ... 18
1.6.2.6. Görüntü sitometrisiyle hücrelerde DNA miktarının belirlenmesi ve bu yöntemle cinsiyet tayini ... 18
2. GEREÇ VE YÖNTEM ... 20
2.1. Perifer kan örneklerinin alınması ve kan preparatlarının hazırlanması ... 20
2.2. Yumurta örnekleri ... 20
2.2.1. Pander nükleusu ve embriyonik disk sahasının izolasyonu ve lamlara alınması ... 20
2.2.2. Boyama işlemleri ... 21

2.2.3. Dijital görüntülerin kaydedilmesi ve görüntü analizi işlemleri 21
2.2.4. İstatistiksel analiz..... 22
3. BULGULAR.....23
5. TARTIŞMA.....27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....32
6. KAYNAKLAR.....35
7. EK.....38
8.ÖZGEÇMİŞ.....39

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kuluçka öncesi ve erken embriyonik dönemde döllü ve dölsüz tavuk yumurtasının Pander nükleusu ve embriyonik disk hücreleri üzerinde ışık mikroskobik incelemeler

Mahmut Küçükkömürcü

Histoloji ve embriyoloji (VET) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2020

Bu çalışmada, horoz ve tavukların perifer kan eritrosit çekirdekleriyle döllü ve dölsüz yumurtaların Pander nükleusu ve blastodisk hücrelerinin hücre çekirdekleri, floresans, histokimyasal ve mikromorfometrik yöntemlerle incelenerek, horozlarla ve tavukların, dölsüz ve döllü yumurtaların DNA içerikleri arasındaki farkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 60 adet döllü ve 30 adet de dölsüz Babcock ırkı yumurtacı tavuk yumurtası kullanıldı. Babcock ırkı 30 tavuk ve 30 horozun kanat venasından heparinli tüplere alınan perifer kan örneklerinden frotiler hazırlandı. Tespit işlemini takiben, frotilerden bir kısmı May grünwald-giemsa ile boyanırken, diğerlerinde Feulgen reaksiyonu ve floresan mikroskobik inceleme gerçekleştirildi.

Dölsüz yumurtaların Pander nükleusu pipetle tüplere alınarak santrifüje edilerek dişi yumurta hücresi çekirdeğinin izolasyonuna çalışıldı. Döllü yumurtalar kuluçkanın 84. saatine kadar kuluçka makinesinde (Prodi HB 175) inkübe edildikten sonra embriyonik disk sahası poly-L-lizin kaplı lamlara aktarıldı. Hazırlanan örneklerin bir kısmı May grünwald-giemsa iale boyanırken, kalan örneklerde Feulgen reaksiyonu gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, horoz ve tavuk eritrositlerinin morfometrik verileri bir birine birbirine oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, horoz eritrosit çekirdeği morfolojik indeksi tavuklarınkinden önemli derecede daha büyüktür

($p<0,05$). Bu durum, horoz eritrositlerinin DNA içeriğinin tavuklarınkinden daha fazla olmasından kaynaklanmış olabilir.

Horoz ve tavukların perifer kan eritrosit çekirdeklerinin renk analiz sonuçlarına göre horoz eritrosit çekirdeklerinin birim alanındaki (1 μm^2) total renk yoğunluğuyla kırmızı ve yeşil renk yoğunlukları tavuklarınkinden fazla olmakla birlikte, bu fark istatistiki açıdan önemli değildi.

Kuluçkanın erken döneminde eritrosit (84. Saat) eritrositler üzerinde yapılan renk analizleri sonuçlarına göre total renk yoğunluğu 1,01-0,92 ve 0,62-0,15 aralıklarında, kırmızı renk yoğunluğu 1,13-0,74 ve 0,71-0,17 aralıklarında, yeşil renk yoğunluğu 0,77-0,42 ve 0,29-0,05 aralıklarında, gri ton yoğunluğu ise 1,01-0,61 ve 0,54-0,15 aralıklarında toplanan ikişer grup oluşturuldu. Erkek eritrositlerinin daha fazla DNA içeriğine sahip olduğu dikkate alındığında iki gruptaki embriyoların erkek, ikinci gruplardakilerin de dişi embriyo olabilecekleri sonucuna varıldı.

Bu çalışmada uygulanan yöntemlerin ve elde edilen bulguların tavuk ve horoz genomları arasında kesin ayrım yapabilmede yeterli olmadığı açıktır. Her ne kadar, erken dönemde yani kuluçka öncesi ve/veya erken kuluçka döneminde cinsiyet tayininde hedefler, sistemin ve ekonominin mantığına da uygun biçimde otomasyona ve embriyoda en az hasarla analiz gerçekleştirmeye uygun olan spektroskopik yöntemlere doğru kaysa, bunlar için kesin ve doğru veri sağlayacak yöntemler yine de sitometrik yöntemlerdir. Bu yüzden, bu konuda daha geniş popülasyonları kapsayan, hiperspektral dijital kameraların da kullanılacağı ve detaylı istatistiksel yöntemler yardımıyla gerçekleştirilecek olan daha detaylı sitometrik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Tavuk eritrositleri, Feulgen reaksiyonu, erke ve dişi genomu.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELCUK UNIVERSTY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Light microscopis investigations on Pander's nucleus and embryonic disc cells of the fertilized and unfertilized chicken egg at preincubation and early incubation periods

Mahmut Küçükkömürcü

Department of Histology and Embryology(VET)

MASTER THESIS / KONYA-2020

In this study, nuclei of peripheral blood erythrocytes and nuclei of both female eggcell nuclei located at Pander nucleus, and nuclei of the blastodics cells were investigated by means of the fluorescence, histochemical ve micromorphometric methods, and it was aimed that whether there was any differences between DNA contents of male and female hen's, fertilized and unfetilized chicken eggs.

For this purpose, 60 fertilized and 30 unfetilized eggs of Babcock layers. Blood smear were prepared from heparinized blood samples taken from wing veins of 30 male and 30 female chickens, via venipuncture. Some of the blood smear were stained with May grünwald-giemsa and in the remaining smears, Feulgen reaction was performed.

From unfertilized eggs Pander nuclei area were taken into plastic tubes and diluted to 5 ml with prewarmed (37°C) physiological saline in order to isolate the female eggcell nuclei. Fertilized eggs were incubated until 84. hour of the incubation period (Prodi HB 175) and embryonic discc cells were isolated and taken onto poly-L-lysine coated glass slides. Some of the samples were stained with May grünwald –giemsa and in the remaining samples, Feulgen reaction was performed.

In this study, morphological parameters of both of the male and females were found to be very close. Nevertheles, morphometric index of the male erythrocyte nucleus was significantly ($p<0,05$) larger than that of the females. This result possibly arisen from the higher DNA content of male erythrocyte nucleus.

Although, the results of the color density analyses of both male and female chicken erythrocyte nuclei showed that total color density, red color density and green color density values in a unit area (($1\ \mu m^2$) of the males were higher than those of the females, the differences between mean values were not statiscally significant.

Results of the color analyses of the erythrocytes at early incubation period (84. hour) revealed that the total coor density accumulated between 1,01-0,92 and 0,62-0,15, the red color density ranged between 1,13-0,74 and 0,71-0,17, the green color density ranged between 0,77-0,42 ve 0,29-0,05 and the gray scale ranged between 1,01-0,61 and 0,54-0,15 ranges. Based on these results, the data were groupped into two groups wihth high and low means, for each color parameter. When regarding the male's nuclei having higher DNA content, it might be concluded that the high color intensity group for each color band has been taken from male embryos.

It is clear that the investigation methods and the obtained results of hte present study are not sufficient to diccriminate male and female genome. Although, current and future trends in gender determination at pre incubation and early incubation perods inclinated to non invasive and light spectroscopic analyses those are mostly non invasive techniques, in accordance with automation and the spirit of the system and the economy, cell cytometric methods are the only methods could supply the correct and precise data for light spectroscopic analyses. Fort his reason, there is need of the further srtudies including large animal population and large number of the eggs, hyperspectral digitalcameras and more detailed statistical analyses.

Keywords: Chicken erythrocytes, Feulgen reaction, male and female genom.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tavukta Feulgenle boyanan dişi (a) ve erkek (b) metafaz kromozomları 1

Şekil 3.1 Horoz perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir 23

Şekil 3.2. Tavuk perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir 23

Şekil 3.3. Feulgen reaksiyonu uygulanan horoz perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir 24

Şekil 3.4. Feulgen reaksiyonu uygulanan tavuk perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir 24

Şekil 3.5. Feulgen reaksiyonu uygulanan preparatta kuluçkanın 84. saatinde kan yapım adacığındaki eritrositler görülmektedir 24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Horoz ve tavukların eritrosit ve eritrosit çekirdeği morfometrik analiz sonuçları 25

Çizelge 3.2. Horoz ve tavukların eritrosit çekirdeğinin birim alanında (1 μm2) tespit edilen renk yoğunlukları 25

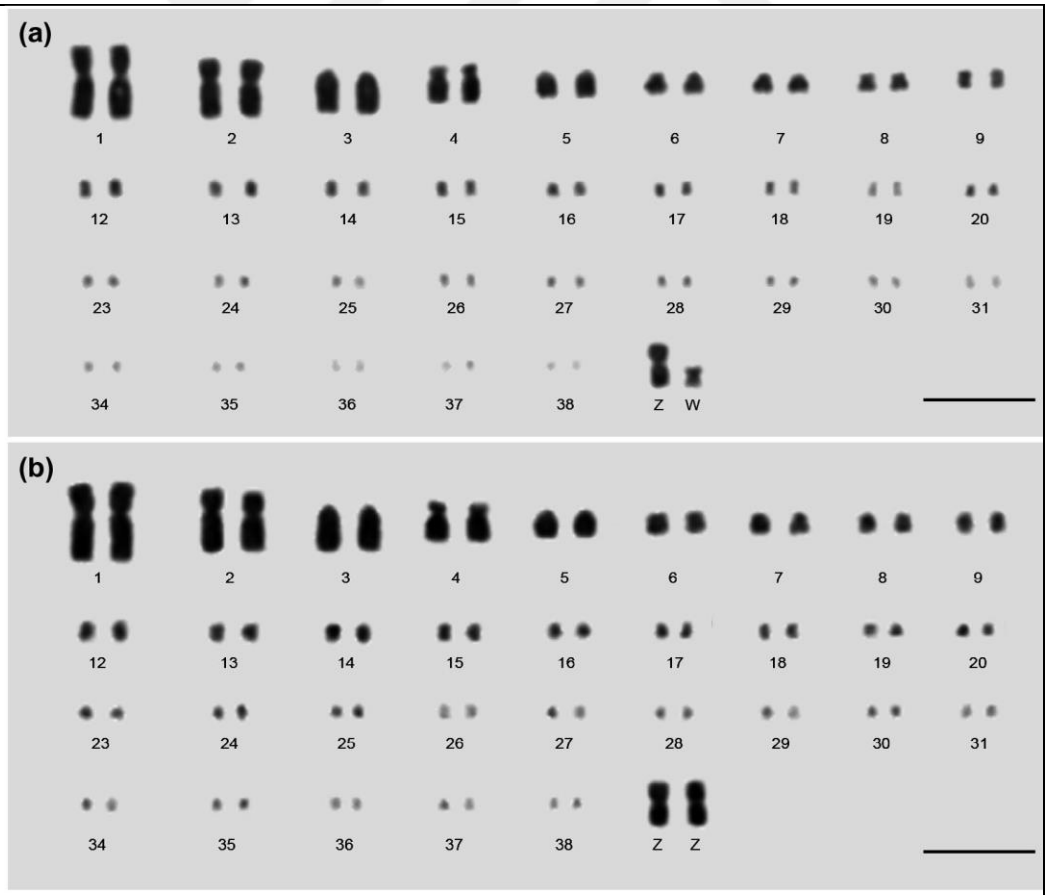
Çizelge 3.3. Kuluçkanın 84. saatinde, kan adacıklarındaki eritrosit çekirdeklerinin renk analizi sonuçları 26

Çizelge 3.4. Kuluçkanın 84. saatinde, kan adacıklarındaki eritrosit çekirdeklerinin renk analizi sonuçları 26

1. GİRİŞ

1.1. Kanatlılarda genotipik ve fenotipik cinsiyetin belirlenmesi

Tavukta mitozun metafaz evresinde 38 çift otozomal kromozom ve ZW gonozomları bulunur (Şekil 1.1). Kromozom uzunluklarına göre 1-4 numaralı kromozomlar ve Z kromozomu makro kromozomlar, 5-9 numaralı kromozomlar ve W kromozomu orta yâda iri-mikro kromozomlar ve 10-38 numaralı kromozomlarsa mikro kromozomlar olarak sınıflandırılmıştır (Bloom ve ark 1993). Daha sonra yapılan sınıflamadaysa 1-10 numaralı kromozomlarla ZW kromozomları grup A, 11-16 numaralılar grup B, 17-32 numaralılar grup C ve 33-38 numaralı kromozomlarsa grup D içinde sınıflanmıştır (Masabanda ve ark 2004). Makro kromozomlar olan 1-10 numaralı kromozomlar (grup A) tavuk haploid genomunun %67,50'sini, 11-16 numaralı iri-mikrokromozomlar (grup B) %12,66'sını, 17-32 numaralı küçük mikro kromozomlar (grup C) %17,32'sini ve 33-38 numaralı mikrokromozomlar (grup D) %2,52'sini oluşturur (Masabanda ve ark 2004).



Şekil 1.1. Tavukta Feulgenle boyanan dişi (a) ve erkek (b) metafaz kromozomları. Her iki cinsiyette de 76 adet otozomal kromozom ve ZZ (erkek) ile ZW (dişi) gonozom bulunmaktadır, Gonozomlar iri kromozomlar olup, Z kromozomu daha iridir (Mendonça ve ark 2016).

Bir canlının genotipik cinsiyeti, zigotun cinsiyet kromozomları tarafından belirlenir. Erkeğin cinsiyet kromozomlarının heterogametik olduğu memelilerin tersine, kanatlılarda dişinin cinsiyet kromozomları heterogametiktir. Dişinin cinsiyet kromozomları (gonozomlar) ZW ile erkeğinkiler ise ZZ ile ifade edilir. Memelilerin çoğunda üreme organlarının gelişimi (bazı bireysel farklılıklar hariç tutulursa), bir hücre zarı proteini olan H-Y proteininin bulunması veya bulunmamasına bağlı olarak belirlenir. H-Y proteini bulunan embriyolarda testisler gelişirken, bulunmayanlarda ovaryumlar gelişir. Kanatlılardaysa durum tersine gelişir. Bu türlerde; dişide, serolojik olarak H-Y antijeniyle çapraz reaksiyon veren H-W antijeni bulunan embriyolarda ovaryum gelişirken, bulunmayanlarda testisler gelişir (Çelik 2018).

ZW gonozomlarıyla genotipik cinsiyetin belirlendiği dişi kanatlıda, başlangıçta indiferensiye durumdaki sol eşey organı (gonad), ovaryuma dönüşür ve pek de açık olmayan bir takım sebeplerle sağ gonad rudimenter olarak kalır. Bununla birlikte, son yıllarda memelilerde H-Y antijeninin, testis gelişimini belirleyici bir faktör olmadığı yönünde görüşler ileri sürülmüştür. Nitekim insanlarda H-Y negatif erkekler olduğu gibi H-Y pozitif dişiler de bulunmaktadır (Çelik 2018).

İn vitro koşullarda, tavuk embriyosunda inkübasyonun 7,5. gününden itibaren üreme hormonlarından östron, östradiol ve testesteron, ovaryumdan salgılanmaya başlar. Testisler ovaryumların yaklaşık iki katı kadar testesteron salgılarken, ovaryumların %50'si kadar hızda östrojen ile %50'sinden daha az hızla östradiol salgılar. Testesteron genellikle, birim ağırlık başına daha az etki potansiyeline sahip olup, etkisi östradiolün 1/1000'i kadardır ve bu yüzden beynin gelişiminde daha az etkilidir. Beynin gelişmesinden muhtemelen östrojenler sorumludur ve böylece hayvan ergin duruma geldiğinde gonadal hormonların etkisine uygun biçimde yanıt verebilir (Çelik 2018).

Kanatlı embriyosunun cinsiyeti, 5. kromozom çiftinden birinin ikinci kutup hücresine (polar cisimciğe), diğerinin de dişi pronükleosuna gitmesiyle belirlenir. Bu kromozom çiftinin bir üyesi, yani W kromozomu sadece dişide bulunan nükleik asit sekanslarını içerir. Bu çiftin diğer üyesi olan Z kromozomu ise bir kopyası

dişide bulunan ve ZW şeklinde ifade edilen genlerle, iki kopyası erkekte bulunan ZZ olarak ifade edilen genleri taşır. Erkek ZZ olduğundan, sadece Z kromozomu taşıyan spermatozoonları üretir. Hâlbuki dişide Z ve W kromozomları bulunduğundan ve bunların herbirinin en azından %50 olasılıkla ovumlara geçmesi söz konusu olduğundan, kanatlıda genotipik cinsiyeti dişi gametlerinin cinsiyet kromozomları belirler. Birinci mayoz sonunda, Z ve W kromozomunun her biri için dişi pronükleusuna geçiş olasılığı %50'dir. Fertilizasyonda Z kromozomu taşıyan dişi pronükleusu daima erkek, W kromozomu taşıyanlarsa sadece dişi civcivler oluşturacaktır. Bu bağıntıdan tavukçuluk endüstrisinde altın rengi tüylü, çubuklu ve çubuksuz tüylü, yavaş ve hızlı tüylenen ırkların geliştirilmesinde yararlanılmıştır (Çelik 2018). Zira bu karakterlerin hepsi de Z kromozomu üzerinde yer alır. Her ne kadar W kromozomu tarafından kodlanan karakterler hakkında az şey bilinmekteyse de, bu kromozom üzerinde bir 1100 baz-çifti ve bir de 700 baz-çifti, sırasıyla 6.000 ve 14.000'er defa tekrarlanmaktadır. Bu iki tekrarlayıcı baz-çifti sıraları W kromozomundaki DNA'nın yaklaşık olarak %50'sini oluşturmaktadır (Çelik 2018).

1.2. Tavuk embriyosunda fenotipik cinsiyetin belirsiz olduğu indiferent evre

Embriyonik gelişme sırasında fenotipik cinsiyetin belirgin olmadığı bir dönem vardır ki, bu dönem, kuluçkanın yaklaşık 96. saati ile 7. günü arasındadır ve cinsiyet bakımından "indifferent" dönem olarak da adlandırılır.

Primordial gonositler, gonadal çıkıntı epiteline yerleşmelerini takiben gonad epitelini şekillendirmek üzere diferensiye olmaya başlar. Kuluçkanın 96. saatine kadar primordiyal gonositlerin sağ ve sol tarafın gonadal epiteli içindeki sayısal dağılımları hemen hemen eşittir. Fakat 96. saatin hemen sonrasında bu hücrelerin yaklaşık %70'i sol, %30'u da sağ tarafın gonad taslağında lokalize olmaktadır. Tavuk'ta (Gallus'ta) hücreler, her iki cinsiyette de aktif olarak sağ taraftan sola göç ederken; bu durum kaz'da (Anas'ta) gerçekleşmez. Bu hücre göçlerinin nedeni belli değildir. Ancak tavukta sol ovaryumun fonksiyonel olması bu durumun bir sonucu olabilir. Bununla birlikte, bu fonksiyonel gelişme döneminde primordiyal germ hücreleri hala, hem erkek hem de dişi gonositlerini oluşturabilme (yani hem erkek ve hem de dişi gametlerine diferensiye olabilme) potansiyellerini korurlar (Çelik 2018).

Gonad taslaklarında bir yandan epitelin diferensiyasyonu gerçekleşirken, diğer yandan da alttaki mezonefrik mezenşim rete dokusunu şekillenmeye başlar. Rete kordonları ve medulla dokusu indiferensiye, yani cinsiyeti belirlenginleşmemiş gonadlarda mezonefrik mezenşimden gelişir. Bu dokunun gelişmesinde ortaya çıkabilecek olan bozukluk yâda yetmezlikler az gelişmiş gonadların şekillenmesine neden olur (Çelik 2018).

Rete kordonlarının gelişmeye başlamasından kısa süre sonra medulladaki cinsiyet hücresi kordonlarının başlangıç çoğalmaları başlar. Primer cinsiyet hücresi kordonları olarak da bilinen medulla kordonları, kuluçkanın 5,5-6. günlerinde (Hamburger-Hamilton skalası, HH- 27-28. evreler) gonad epitelinde tomurcuk benzeri çıkıntılar halinde ilk kez ortaya çıkarlar ve kuluçkanın 6,5. gününde (HH-29. evrede) epitelden ayrılılar. Cinsiyet hücresi kordonlarında germ hücreleri ile destek hücrelerinin (sustentakular hücreler, cellulae sustentakulares yani Sertoli hücreleri) her ikisi de bulunur (Çelik 2018).

Yaklaşık 7 günlük inkübasyon sonunda (HH 30-31. evreler), gelişmekte olan bir bağ dokusu katmanı yani primer tunika albugineaya, cinsiyet hücresi kordonlarını ve aralarındaki stromayı gonad taslağı epitelinden ayırır. İşte bu tunika albugineaya katmanının oluşumuyla gonad gelişmesinin indifferent evresi de sona erer. Sonraki gelişme olayları embriyonun genotipik cinsiyetine bağlı olarak değişik bir seyir izler.

Bundan sonraki gonad gelişimini yönlendiren genotipik cinsiyet, zigotun gonozomlarının kuruluşuna bağlı olup, kanatlılarda memelilerdekinden farklıdır. Memelilerde erkek heterogametik cinsiyetli iken, kanatlıda dişi heterogametiktir. Kanatlı erkeklerse homogametiktir. Bu durum dişi için ZW, erkek için de ZZ şeklinde ifade edilir. Memelilerde testislerin diferensiyasyonu genellikle serolojik olarak H-Y antijeni şeklinde ortaya konabilen bir hücre zarı proteininin varlığıyla açıklanırken; kanatlılarda ovaryumların gelişmesi serolojik olarak çapraz reaksiyon (cross reaction) veren H-W antijeninin ortaya çıkışıyla başlamaktadır. H-Y ve H-W antijenleri serolojik olarak çapraz reaksiyon verdiklerinden; bu iki antijenin, fonksiyonel bakımdan farklı moleküllerin birbirlerini taklit eden parçaları oldukları düşünülmektedir. Muhtemelen bu iki antijeni kodlayan genler fundamental genler olduklarından, türlerin filogenezisi sürecinde değişmeden kalmış durumdadırlar. Pek çok türde H-Y (H-W) antijen reseptörünün değişmeden kalması nedeniyle, H-

Y (H-W) antijeninin primer cinsiyetin belirlenmesini sağlayan antijen olduğu kabul edilmektedir. Bunu kodlayan genlerin etkisi; genetik bakımdan heterogametik olan indiferensiye gonadın, erkeği heterogametik olan türlerde testis'e, dişisi heterogametik türlerde de ovaryum'a dönüşmesine neden olacak şekilde ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar H-Y antijeninin cinsel diferensiyasyondaki belirleyici etkisi kabul edilmekle birlikte; insanlarda H-Y negatif erkek ve H-Y pozitif dişi bireylere de rastlanmaktadır. Ayrıca son yıllarda H-Y antijeninin testis oluşumunu belirleyici faktör olmadığının ileri sürülmesi, bugüne kadar embriyoda seksüel diferensiyasyon konusunda kabul edilen görüşlerin yeniden gözden geçirilmesini gerekli kılabilecektir (Çelik 2018).

1.3. Erkek kanatlılarda fenotipik cinsiyetin belirginleşmesi ve testislerin gelişimi

Erkeklerde seksüel diferensiyasyon, primer tunika albugineya'nın şekillenmesini takiben gonad taslağı epitelinin gerileyerek, yeni cinsiyet hücre kordonu yapımını sonlandırmasıyla başlar. Bundan sonraki gonad gelişmesi, belirgin biçimde testis şekillenmesine doğru yönlenir.

Memelilerde tunika albugineya'dan çıkan ince dallar cinsiyet hücresi kordonları arasına girerek onları birbirlerinden ayırır. Kordonlarda Sertoli hücreleriyle karışık haldeki primordiyal germ hücreleri çoğalır ve bu destek hücrelerinin dıştan sağladığı destekle kıvrımlar oluştururlar. Bu şekilde, kıvrımlı seyreden tubulus seminiferus kontortuslar şekillenir. Kanatlılarda da benzeri bir gelişme tarzının olduğu kabul edilmektedir. Kuluçkanın l3. gününe (HH-39. evre) kadar primordiyal germ hücreleri tubulus seminiferus kontortuslarda rastgele dağılmışlardır ve bu evreden sonra spermatogonyumları oluşturmaya başlarlar. Yirminci gün (HH-45. evre) öncesinde, yeni oluşan spermatogonyumlar spermatojenik epiteli (epitelyum spermatogenicum) oluşturmak üzere dizilirler ve tubulus epitelinin en alt sırasındaki hücrelerini oluştururlar. Henüz seksüel olgunluğa ulaşmamış olanlarda spermatojenik epitel, sertoli hücreleri arasında uzanan tek katlı bir hücre sırası oluşturur (Çelik 2018).

Testislerde 6,5-11. gün (HH-30-37), ovaryumlarda ise 6,5-14. günler (HH-30-40. Evrelerde) her iki cinsiyetin interstisyel hücrelerinde belirgin morfolojik değişiklikler ortaya çıkar. En belirgin değişiklik, yıldız biçimli mezenşimal

hücrelerin oval şekil kazanmalarıdır. Bu şekil değişikliğinden sonra hücrelerin steroid hormon sentezleme kapasiteleri artar. Kuluçkanın l7. Gününde (HH-43. evre), testisin interstisyel hücrelerinin (cellulae interstitiales, Leydig hücreleri) sayısı artar (Çelik 2018).

Rete testis, indiferent gonad taslağında en erken 3,5-10. günlerde (HH-23-36. Evrelerde) ortaya çıkar; diferensiye olan gonadda ise uzar ve anastomozlar oluşturmaya devam eder. Rete kordonları, organların gelişmesi tamamlandığında rete testisi oluştururlar (Çelik 2018).

1.4. Dişi kanatlılarda fenotipik cinsiyetin belirginleşmesi ve sol ovaryumun gelişmesi

Tek bir primordiyal germ hücresi çoğalmasının gerçekleştiği genotipik olarak erkek embriyoların tersine, genotipik dişilerde gonad epitelinde ikinci bir çoğalma daha gerçekleşir. Bununla birlikte, sağ ve sol ovaryum arasında, daha sonraki gonad gelişmesini de etkileyecek olan bir nispi hücre çoğalması farklılığı da ortaya çıkar (Çelik 2018).

Fenotipik dişi cinsiyet diferensiyasyonunun ilk belirtisi sol ovaryumda ortaya çıkar. İnkübasyonun 8. gününden (HH-34. evreden) önce sol ovaryumun epiteli kalınlaşmaya başlar ve buraya göç eden primordiyal germ hücreleri oogonyumları oluşturmak üzere aktif mayozla bölünmeye başlarlar. Bu ovaryumda alttaki medullar doku, 8. ve 9. günlerde (HH-35. evrede) nispeten daha sıkı olan süperfisiyal ve daha derindeki retiküler katmanlar olmak üzere iki farklı katmana diferensiye olmuş durumdadır. Bu evrede, epitel hücreleri arasındaki oogonyumların oluşturdukları hücre toplulukları epitel hücreleriyle birlikte tomurcuklanmak suretiyle aşağıya, organın kortikal bağ dokusuna doğru girerler. Gelişmenin ilerlemesiyle birlikte 10-11. günlerde (HH-36-37. evreler) oogonyumlar, epitel hücreleriyle sarılı halde epitel örtüsüyle bağlantılarını koparırlar. Böylece sekonder cinsiyet hücresi kordonları, yani kortikal cinsiyet hücreleri kordonları oluşur. İkinci bir bağ dokusu stroması, yani ikincil (sekonder) tunika albugineya l4. günde (HH-40. evre) şekillenmeye başlar. Bu bağ dokusu bölmesi, cinsiyet hücresi kordonlarını birbirinden ayırırken; aynı zamanda da bu hücre kordonlarını hem gonadal epitelden ve hem de ovaryumun medullasından ayırır. Kısa bir süre sonra da (14-15. günler, HH-4l. evre) gonadal epitel ve primer

tunika albugineya regrese olmaya başlar. Gelişmenin bu evresinde, evcil kanatlıların sol ovaryumunda oldukça iyi vaskülarize olmuş olan medulla (medulla ovarii) ile korteks (korteks ovarii) bölgeleri ayırt edilir. Oositler ise kortekste bulunurlar. Daha sonraki dönemlerde ovarvum yüzeyindeki çukurluklar derinleşir ve giruslar haline gelerek korteks dokusunu bölgelere ayırırlar. Giruslara, tavuk geliştikçe bağ dokusu infiltre olur ve ergin ovaryumunda korteks ve medullası arasında oluşan soluk boyanan bölge halindeki ayrılma hattını doldurur. Ergin tavuğun sol ovaryumunda, biri dışta yer alan ve oosit gelişmesinin gerçekleştiği germinal dokuyu içeren korteks, yani zona paranşimatoza ile diğeri içte yer alan ve kan damarlarından zengin olan medulla yâda zona vasküloza olmak üzere iki bölge ayırt edilir (Çelik 2018).

Embriyonik dönemde, zayıf olmakla birlikte sağ ovaryumda da belirgin bir gelişme gözlenir. Medulla bölgesinin gelişmesi bozulmuş olmakla birlikte; kortekste düzensiz ve zayıf bir cinsiyet hücresi kordonları oluşumu gözlenebilir. İkinci cinsiyet hücresi çoğalması evresi gerçekleşmez ya da oldukça zayıftır ve tunika albugineya ekseriya bulunmaz. Kuluçkadan çıkışta sağ ovaryum çoğunlukla bir kalıntı (rudiment) halindedir. Ancak bazen, bilinmeyen bir nedenle sol ovaryum fonksiyonel de olmayabilir. Bunun yerine sağ tarafta hem ovaryum ve hem de testis dokusunu içeren (ovotestis) ve fonksiyonel olan bir yapı gelişmiş olabilir. Bu yapının medullar bölgesi, testisin histolojik yapısına sahipken; korteks ovulasyonla atılabilecek kadar gelişkin folikülleri içerebilir.

Kanatlı genital organlarının gelişmeleri hakkında yukarıda verilen bilgilere rağmen, kanatlı dışı türlerde cinsiyetin belirginleşmesi ile iç ve dış genital organların gelişmesi hakkında son yıllarda yeni görüşler de ileri sürülmüştür; ancak bu yeni açıklamaların kanatlılarda geçerli olup olmadıkları konusu halen tartışmalıdır.

Son yıllarda klasik bilgilerde kabul edildiği gibi primer (medullar) cinsiyet hücresi kordonlarının erkekte tubulus seminiferus kontortusları oluşturdukları, sekonder (kortikal) kordonların ise dişide ovaryum foliküllerini oluşturdukları görüşünün aksine, indifferent gonadda mezenşimin generalize bir organizasyona sahip olduğunu kabul eden alternatif bir görüş de ileri sürülmüştür. Testisler nispeten daha erken diferensiye olurlar ve bu esnada sustentakular Sertoli hücrelerinin primordial germ hücrelerini sarmasıyla oluşan seminifer kordonlar da

şekillenir. İnterstisyumdaki Leydig hücreleri ise blastemanın mezenşimal hücrelerinden diferensiye olurlar. Henüz yeni şekillenen Leydig hücrelerinden salınan testosteron ile Sertoli hücrelerinden salınan anti-Müller kanalı hormonu (anti-Müllerian hormone) da sırasıyla erkeğin dış genital organlarının ve genital kanallarının gelişmesini sağlarlar (Çelik 2018).

Yine son yıllarda ileri sürülen bir diğer görüşe göre ise gonadların embriyonik gelişimi H-Y/H-W antijenin bulunması ya da bulunmamasıyla yönlendirilmektedir. Memelilerde testis gelişimi H-Y antijeninin bulunması durumunda gerçekleşirken; ovaryumların organizasyonu ise H-Y antijeninin bulunmaması durumunda gerçekleşmektedir. Tersine, kanatlı hayvan türlerinde ise ovaryumların gelişimi H-W antijeninin kontrolü altındadır ve H-W antijeni yokluğunda ise testis gelişimi gerçekleşir. Bu yüzden H-Y antijeni varlığında memelide testisi oluşturacak olan mezenşimal hücreler nispeten erken dönemde bir araya gelerek primordial germ hücreleri ile Sertoli hücrelerini içeren tubulus seminiferus kontortusları şekillendirirler. Dişilerde ise genellikle H-Y antijeni yoktur ve ovaryumlar embriyonik gelişmenin geç evresine kadar indiferensiye haldeki generalize durumlarını korurlar. Ovaryumun primer cinsiyet hücresi kordonları da sonunda gelişmeye başlamakla birlikte, oluşumları gecikir ve bunlar hücre gruplarına bölünürler; takiben de primordiyal foliküllerin formasyonu gerçekleşir. Testesteron ve anti-Müllerian hormon da olmadığından, dış genital organ ve genital kanallarının gelişmesi de, dişi yönünde gerçekleşir. Ancak yukarıdaki alternatif görüşlere uymayan bulgular da (özellikle domuzlarda H-Y/H-W anijeni teorisi ile uyuşmayan) elde edildiğinden, gonad diferensiyasyonunda başka faktörlerin de etkili olduğu ileri sürülmektedir. Nitekim Y kromozomunun farklı bir parçasında H-Y antijeninden ayrı bir testis belirleyici faktörün de kodlandığı gösterilmiştir (Çelik 2018).

1.5. Kanatlılarda zıt cinsiyet oluşumu (sex reversal)

Bu terimle, genotipik cinsiyetin zıttı fenotipik cinsiyetin gelişmesi (sex reversal) kastedilmektedir. Deneysel çalışmalarda, genetik olarak dişi embriyolara indifferent dönemde testis dokusu graftlarının nakledilmesinin, dişide erkek gonad gelişimine yol açtığı gösterilmiştir. Zıt cinsiyet oluşumuna, deneysel olarak nakledilen testis dokusunun anti-Müllerian hormon salgılamasına karşın, genital

organların dişi yönünde gelişimini sağlayan östrojen yanıtının düşük olmasının neden olduğu kabul edilmektedir.

Genetik olarak dişi fakat fenotipik olarak erkek olan zıt cinsiyetli hayvanların gonadlarındaki interstisyel hücre topluluğu önemli oranda azalmıştır. Bu da genetik erkeklerdeki duruma benzer. Dişi gonadında interstisyel hücreler östrojen salgılayan hücreler olduklarından ve aynı zamanda da genetik dişi hayvanlardaki testis oluşumunda primer etkili hücreler olarak görüldüğünden, normal testis gelişiminde de intrinsik kökenli benzer bir mekanizmanın testis diferensiyasyonunu kontrol ettiği kabul edilmektedir. Embriyonik dönemde verilen östrojen, kanatlı embriyolarının ZZ genotipine sahip olan gonadlarında geçici bir dişileşmeye (feminizasyon) neden olmaktadır. Ancak, bu durumda gonadlarda oluşan feminizasyonun H-Y/H-W antijenine bağlı olup olmadığı bilinmemektedir. Bununla birlikte, hem in vivo ve hem de in vitro çalışmalar feminize edilen ZZ gonadlarından alınan hücrelerin H-Y pozitif olmaları, östrojenin H-Y/ H-W antijeninin oluşumunu uyardığını ortaya koymaktadır (Çelik 2018).

1.6. Kanatlılarda günlük civcilerde ve yumurtalarda kuluçka öncesi ve erken kuluçka döneminde *in ovo* uygulanan fertilite ve cinsiyet belirleme yöntemleri

Civcivlerin cinsiyetinin tayini 1935'lerden beri tavukçuluk sektöründe önem arzetmeye başlamıştır (Aun ve Kumaran 2010). Günümüzde günlük-yumurtacı civcivlerde cinsiyet tayini rutin olarak uygulanmaktadır. Bu amaçla uygulanan teknikler arasında; kloakada fallusun gözlenmesi (Cerit ve Avanus 2006), tüylerin özelliğinin incelenmesi, tüy renginin incelenmesi, parmak yastıkçıklarındaki pulların sayısının belirlenmesi ve ultrasonla cinsiyet tayini yöntemleri sayılabilir. Fallusun görsel tespitine dayananan yöntemin hassaslığı kişinin uzmanlığına bağlı olup, ırk ve hatlar arasında ortaya çıkan varyasyonlar da başarıyı kısıtlamaktadır. Günümüzde çok uzman kişilerce yöntemin hassasiyeti %98'lere ulaşmışsa da yüzbinlerce civcivin cinsiyet tayininde %2'lik bir kayıp çok önemli ekonomik zararlara yol açabilmektedir.

İn ovo cinsiyet tayininde fertilite de belirlendiğinden, bugüne kadar kuluçkalık yumurtalarda fertilite tayini üzerinde fazla durulmamıştır. Bununla birlikte, Qiaohua ve ark. (2017) yumurtaya O2 akışının tespit edildiği bir yöntemle

kuluçka öncesi döllü/dölsüz yumurta ayrımı yapabilen bir non invaziv mikro test tekniği (NMT-ETS) geliştirmiştir.

Günümüzde gerek kuluçka öncesinde ve gerekse de kuluçka sırasında cinsiyet tayini amacıyla uygulanan yöntemler:

1.6.1. Optik spektroskopi yöntemleri

Optik spektroskopi yöntemleri, bir örneğin belirli dalga boyundaki ışık ışınlarına verdiği tepkinin belirlenmesi temel esasına dayanır. Örnek atomları, belirli dalga boyundaki ışınları ya abzorbe eder, ya yansıtır ya da onların saçılmasına neden olurlar. Bazı durumlardaysa örnek atomları uyarılarak farklı dalga boylarında ışıma yaparlar. Oluşan bu ışık spektrumu analiz edilerek, incelenen örneğin kimyasal ve diğer pek çok özellikleri hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir. Bu prensip, günümüzde uygulanmakta olan pek çok optik spektroskopi sisteminin belkemiğini oluşturur.

Optik spektrum, biyolojik bir örneğin bileşimi ve yapısı hakkında bilgi taşıması yanında, embriyonun cinsiyeti hakkında da bilgi taşır (Galli ve ark 2017). Vibrasyonal spektroskopik teknikler, hem kuluçkadaki, hem de kuluçka edilmemiş yumurtalarda cinsiyet tayininde uygulanabilmektedir.

Z cinsiyet kromozomu W kromozomunun yaklaşık 2 katı büyüklüğe sahip olduğundan, ZZ (♂) ve ZW (♀) tavuk genotipleri arasında belirgin bir DNA içerik farkı oluşmaktadır. Spektroskopik yöntemlerle in ovo cinsiyet tayininde, 2 adet Z kromozomuna sahip olan erkek kanatlı hücrelerinin dişilerden %2 kadar daha fazla DNA miktarına sahip olmalarından yararlanılmaktadır. Morötesi (UV) Raman spektroskopisi ve Fourier-transform kızılaltı abzorpsiyon spektroskopisi kuluçkadan çıkan hayvanların tüy pulpasından alınan hücre örneklerindeki DNA miktarı farkı belirlenmek suretiyle cinsiyet tayininde uygulanmıştır (Steiner ve ark 2010). Fourier-transform kızılaltı abzorpsiyon spektroskopisi ise kuluçkaya konmamış embriyonik disk hücrelerinin incelenmesiyle cinsiyet tayininde uygulanmıştır (Steiner ve ark 2011).

Optik spektroskopik tekniklerde aydınlatma yada uyarım kaynağı olarak çoğunlukla kırmızı ışığın dalga boyuna yakın dalga boyundaki ışınlar (λ =785 nm) kullanıldığından, bu tekniklere yakın alan-kızılaltı (NF-IR yada NIR) spektroskopisi de denmektedir. Yakın alan kızılaltı dalga boyundaki (NIR, λ =785

nm) ve yaklaşık 200 mW gücündeki lazerin, yüksek sayısal açıklı bir objektifle birlikte kullanılması, saniyeler içinde geri saçılan enerji spektrumunun elde edilmesini sağlar. Ölçüm işlemi, görülebilen band ve NIR bandında şeffaf olan kan damarında hasar veya kanda pıhtılaşmaya neden olmaz. Kalp tarafından yüksek hızda akışa maruz bırakıldığı ve lazerin odağında saniyenin çok küçük bir kesrinden kalan alyuvarlar, termal hasara uğramazlar. Optik spektroskopi yötemelerinin en önemlisi Raman spektroskopisidir.

İn ovo cinsiyet tayininde uygulanan optik metotlar kısmen non invazivdir ve embriyodan örnek almayı ve kimyasal veya genetik analizlerde olduğu gibi beklemeyi gerektirmez, gerçek zamanlı sonuç almayı sağlar. Bu yöntemler aynı zamanda endüstriye de uyarlanabilir.

1.6.1.1. Raman spektroskopisi

Bu yöntem, gerek prensip ve gerekse de sistem bileşenleri bakımından diğer spektroskopik cinsiyet yöntemlerinin temeli olduğundan, üzerinde daha detaylı durulacaktır. İlk kez, Hint fizikçi Chandrasekhara Venkata Raman (1888-1970) tarafından, maddeyle etkileşen ışığın saçılmasındaki prensipleri ortaya konan "Raman etkisi" prensibine göre çalışan optik spektroskopi yöntemidir. Araştırıcı bu buluşuyla 1930 Nobel Fizik Ödülü'nü almıştır (Raman 1928). En basit açıklamayla Raman prensibi, üzerine tek renkli (monokromatik) ışık düşen bir cismin moleküllerinin vibrasyon enerjisine göre oluşan frekans kayması sonucu farklı renkte (frekansta) ışık saçılımı yapmasıdır. Raman prensibinde, bir moleküle çarpıp saçılan fotonlar enerji kazanıp veya kaybederek frekans kayması, yani Raman kayması meydana gelir. Bu durum, saçılan ışığın renginin molekül üzerine düşen ışığın renginden farklı olması sonucunu doğurur (Raman 1928, Horn 2009). Buna "Raman frekans kayması" denir.

Her molekülün spesifik bir Raman kayması, yani renk değişimi vardır ve bu sayede başka hiç bir işlem uygulanmadan dahi incelenen örneklerin kimyasal bileşimine giren maddelerin ve bunların miktarlarının belirlenmesi amacıyla kalitatif ve kantitatif analizler yapılabilmektedir. Raman kayması oldukça zayıf (10 milyar fotonda 1 foton düzeyinde) olduğundan, bu etki çok duyarlı spektrometrelerle belirlenebilmektedir (Horn 2009).

Steiner ve ark (2011) tarafından, kanatlı tüy pulpası hücrelerinden elde edilen DNA'nın spektral özellikleri esas alınarak ergin kanatlılarda morötesi (UV) rezonans Raman spektroskopisi ve kızılaltı (IR) abzorpsiyon spektroskopisi yöntemleriyle cinsiyet tayini yapılmıştır. Sonraki yıllarda IR spektroskopisi, genetik cinsiyet bilgisini taşıyan germinal diskin (diskus embriyonalis) blastoderm hücrelerindeki DNA miktarı esas alınarak, kuluçkaya konmamış yumurtalarda cinsiyet tayini için de uygulanmıştır. Erkek civcivler daha iri olan Z kromozomundan 2 adet taşıdığından, daha fazla miktarda DNA'ya sahiptir ve bu durum embriyonk blastoderm hücrelerinin ve eritrositlerin spektroskopik analizinde tespit edilebilmektedir (Steiner ve ark (0211). Raman spektroskopisi analiz sonuçları PCR sonuçlarıyla uyumludur (Steiner ve ark (0211).

Tavuk embriyosunda kan adacıkları kuluçkanın ilk gününün sonlarına doğru belirir, 2. günde primitif kalbin atımlarıyla kan akımı başlar ve 3. gününde bir dereceye kadar gelişmiş olan vitellüs kesesi dolaşımı, kuluçkanın $31^{1/2}$ gününde (yani, 84±4 saatinde) dolaşım kandaki eritrositlerin spektroskopik analizine imkân sağlar. Vitellüs kesesindeki arter ve venaların dağılımı ikiye dallanmak suretiye gerçekleştiğinden, ağaç dallanması benzeri bir topolojiye sahiptir. Bu da analiz için uygun bir damarın bulunması olasılığını güçlendirir. Yumurta kuluçkanın 31/2 gününde dik (sivri uç aşağı, küt uç yukarı) konuma getirilince damarlaşma sahası yukarı döner ve kabukta açılan bir pencereden damarlarda optik ölçümler yapılabilir. Ölçümler için daima çapı 100 μm'den daha büyük olan damarlar, tercihen de vena vitellina lateralis veya anteriyör/posteriyör vena vitellinalar seçilir. Erken embriyonik gelişme evresinde vitellüs damarlarında akan kanın hızı yaklaşık 1 mm/sn olduğundan, hücrelerin lazeremaruziyet süresi taklaşık 0,05 sn (Machal ve ark 2003) olduğundan, lazer enerjisi önemli termal hasar oluşturmaz.

Kızılaltı spektroskopiyle, döllü yumurtalardan çıkarılan embriyonik disk üzerinde yapılan çalışmalarla cinsiyet ayrımı yapılabilmiş olmakla birlikte; kuluçkaya konmayan yumurtalarda pencere açılarak yapılan işlem embriyonik ölümleri artırmaktadır.

Raman spektroskopisiyle tavuk embriyosunun cinsiyetinin in ovo belirlenmesi için 785 nm dalga boyundaki 185 mili Watt (mW) gücünde lazer ışını kullanılmaktadır. Lazer ışığı, 100 μm kalınlığındaki optik kabloyla mikoskoba aktarılarak 20 büyütmeli ve sayısal açıklığı 0,45 olan uzun çalışma mesafesine

sahip bir objektif mercekle (20X/0,45) embriyonik damar üzerine odaklanmaktadır. Bu sayede damar üzerinde istenen derinlikte 50 µm çapında bir lazer odağı oluşturulabilmektedir. Oluşan Raman spektrumu tekrar objektif mercekten geçerek detektöre ulaşmaktadır.

Ölçüm için daima büyük (100 µm'den kalın) bir damar, tercihen ana lateral anteriyör/ posteriyör venalar seçilir. Raman spektroskopisinde kuluçkanın 31/2 günündeki yumurtadan DNA sinyalleri, kanatlı eritrositleri çekirdekli olduğundan bu hücrelerden alınır. Cinsiyet bilgisi, embriyonik kana ait olan gerekli bilgileri taşıyan Raman spektrumunun, sınıflandırma yazılımlarıyla analiz edilerek elde edilmektedir. RAMAN spektroskopisinde, 700–800 and 900–1000 cm-1 aralıklarındaki eksi kaymalar nükleik asitlerin fosfodiester bağlarının ve C–C bağlarının gerilme vibrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar (Galli ve ark 2017). Ek olarak 1100 cm-1 de de nükleik asitlerin fosfodioksi gerilme vibrasyon modlarının varlığı bilinmektedir. Proteinlerin amid III bağlarının spektrum aralığıysa 1200–1300 cm-1 arasındadır. Spektrumun 1300 ve 1450 cm-1 aralığındaki farklarınsa lipid ve proteinlerin CHx deformasyon modundan kaynaklandığı kabul edilmektedir. Bu nedenle RAMAN spektroskopisi, sadece erkek embriyo eritrositlerinin yüksek DNA içeriğine sahip olmasından kaynaklanan genetik madde miktarındaki farka dayanarak cinsiyetler arası farkı belirlememekte, aynı zamanda cinsiyetler arasında endokrin farklılaşmanın gerçekleşmediği çok erken dönemde dahi genel cinsiyetlerin kan biyokimyasında oluşan farklığı da belirleyerek de erkek/dişi civciv ayrımı yapabilmektedir. Daha hassas bir değerlendirme yapılarak nükleik asitlere ilişkin bandlar, 724 cm-1'de ve 1071-1193 cm-1 arasında da belirlenmiştir. Raman spektroskopisiyle cinsiyet tespiti duyarlılığının %90 oranında olduğu, sonuçların doğru cinsiyet tayini yapılan ayrı bir bağımsız çalışmadan elde edilen verilerle karşılaştırılarak doğrulanmıştır.

Raman spektreskopisiyle cinsiyet tayininde ortaya çıkan sınıflandırma hataları muhtemelen kan kimyasının kendi içindeki değişkenlerden kaynaklanmakta olup; damar çapındaki, yumurta sarısı ve akından alınan spektrumlar arası farklardan ve lazerin odaklanma pozisyonundan kaynaklanan hataların önemi bulunmamaktadır.

Yöntem, sınıflamada embriyonun cinsel organlarının gelişmesini değil de genetik madde miktarını esas aldığından, kuluçkanın 3,5. günü gibi çok erken

döneminde uygulanabilmektedir. Biyokimyasal veri saniyenin kesri süresinde alınabildiği ve cinsiyeti belirlemeye yönelik matematiksel işlemler derhal yapılabildiğinden, endüstriyel uygulamaya en uygun tekniktir. Galli ve ark (2017) bu tekniğin uygulandığı büyük kuluçkahaneler için geliştirilen otomatik sistemin patentini almışlardır.

Yukarıdaki nedenlerle Raman spektroskopisiyle en erken kuluçkanın 31/2 gününde (84 ± 4 saatinde) %90'a yakın doğrulukla cinsiyet tayini yapılabilmektedir (Galli ve ark 2017, Galli ve ark 2018). Raman ölçümü embriyoya hasar vermeden, yumurta kabuğunda açılan küçük delikten embriyonik kan damarında akan kanda yapılabilmektedir (Steiner ve ark 2011, Galli ve ark 2018).

1.6.1.2. Floresans spektroskopisi

Raman spektroskopisinde zemin floresansı bir bilgi kaynağı olarak kullanılmaktan ziyade istenmeyen veri kirlenmesi olarak kabul edildiğinden, ilk incelelemelerde veri işlemesi sırasında ya uzaklaştırılmış veya baskılanmıştır. Daha sonra yapılan hassas analizlerde, erkek ve dişi cinsiyetlerin zemin floresans şiddeti arasında da önemli farklar tespit edilmiştir. Cinsiyetlerin verileri arasında çok yüksek çakışma da (üstüste binme) görüldüğünden, başlangıçta bu veri cinsiyet tayininde kullanılmamıştır. Fakat spektral floresans metotları son yıllarda hücre özellikleri hakkında yeni bilgiler sağlayacak şekilde sürekli bir gelişim gösterdiğinden, Raman saçılım sinyalleri yanında floresans sinyalleri de tavuklarda cinsiyet tayini amacıyla kullanılmıştır (Galli ve ark 2017, Galli ve ark 2018).

1.6.1.3. Fourier transform-infrared (FT-IR) görüntüleme ve spektroskopisi

Steiner ve ark (2011) kanatlıların DNA'dan zengin tüy pulpasında yaptıkları cinsiyet belirleme çalışmalarında başarılı sonuçlar alınca, aynı yöntemi, kuluçka makinesine konmamış döllü yumurtalardan alınan 10 µg kadar embriyonik disk hücresi numunelerinde cinsiyet tayini amacıyla uygulamışlardır. Yöntem, DNA'daki fosfat gruplarının abzorpsiyon bandlarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Kanatlıda Z kromozomu W kromozomunun yaklaşık 2 katı daha dazla DNA içerdiği ve geri kalan kromozomların tamamı biribirinin aynısı olduğundan, kanatlıda ZZ genotipine sahip olan erkeklerin hücreleri, ZW genotipine sahip olan dişilerinkinden %2 daha fazla DNA'ya sahiptir.

Sistemin çalışma prensibi RAMAN spektroskopisiyle aynı ise de de dikey doğrultuda yapılan odaklamalarla elde edilen sanal odak düzlemlerinden veri alınması ve karmaşık matematiksel Fourier transformasyon işlemleriyle verilerin dönüştürülmesi esasına dayanır. Sistem parazit sinyallerin uzaklaştırılmasını sağlayarak moleküler düzeyde daha hassas ve uzaysal veri elde edilmesini sağlasa da 10 µg ağırlığındaki embriyonik hücre örneğinde çalışılması sistemin başarısını ve uygulamaya sokulması imkânını sınırlamaktadır. Bununla birlikte araştırıcılar (Steiner ve ark 2011), yöntemin blastoderm hücre örneği almadan da analiz yapabilecek şekilde modifiye edilebileğine de dikkat çekmişlerdir. Bu gerçekleştirilse bile, yine de vertikal doğrultuda çok sayıda ölçüm yapılması sinyal elde etme süresini artıracağından ayrı bir sakınca doğurmaktadır.

1.6.1.4. VIS/NIR spektroskopisi

Cinsiyet-spesifik civciv çıkış tüylerinin (down tüyler) rengi, dişilerde kahverengi ve erkeklerde sarı olan seksüel dimorfik tüy rengine sahip olan hatlarda bu yöntem uygulanabilir niteliktedir. Bu yöntemde yumurtalar kuluçkanın 11-14. Günleri arasında halojen ampülle (renk spektrum aralığı 400-1000 nm) aydınlatılarak veriler 400 nm-1,000 nm arası spektrumu algılayabilen ve piksel büyüklüğü 0.78 nm, kayıt süresi 500 msn olan hiperspektral kamerayla kaydedilir. Elde edilen dijital veri istatistiksel yöntemlerle (prinsipal bileşen analizi ve lineer diskriminant analizi) analiz edilerek sonuçlar elde edilir. Yöntem tatamen non invaziv bir yöntem olamkala birlikte, belli hatlarda uygulanabilmesi ve kuluçkanın 14. gününde %97 doğrulukta cinciyet tayini yapılabildiğinden (Göhler ve ark 2016), sadece günlük civcivlerde cinsiyet atyini işlemini ortadan kaldıracak niteliktedir, yaygın pratik önemi ve fazla ekonomik değer kazanması ihtimali zayıftır.

1.6.2. Yumurtada cinsiyet tayini amacıyla uygulanan diğer metotlar

1.6.2.1. ELISA ile hormon analizleri

Embriyonun cinsiyet hormonları allantois sıvısına ve embriyonun idrarına geçtiğinden, bunlarda cinsiyet farklılıkları belirlenebilir (Weissmann ve ark 2014). Allantoisten sıvı örneği alınması kuluçka başarısını nispeten daha az etkilemekte ve ilk çalışmalarda 17. günde alınan örneklerde östrojenlerin belirlenmesinde daha başarılı olunmuştur (Tran ve ark 2010). Bu nedenle kuluçkanın 9. gün+4 saatlik

evresinde bu işlemin gerçekleştirilmesi üzerinde durulmuş ve allantois sıvısında östron sülfatın belirlenmesiyle %86 hassayetine ulaşılmıştır. Bu dönemde hayvanlarda ağrı duyusu tam gelişmemiştir ve kuluçka başarısı olumsuz etkilenmemektedir (Weissmann ve ark 2013).

ELISA yöntemiyle cinsiyet belirlemenin avantajı, embriyoda ağrı duyusu ortaya çıkmadan önce estradiol seviyesinin belirlenmesiyle tavukta kuluçkanın 9. gününde cinsiyetin tayin edilebilmesidir. Bu sayede erken dönemde erkek embriyolar kuluçka makinesinden çıkarılabilir. Embriyoların ağrı duyusu gelişmeden itlaf edilmesi, mevcut uygulama dikkate alındığında çok büyük bir ilerlemedir. Özellikle 9. günden sonraki sonra erkek civcivler için yapılacak giderler tasarruf edileceğinden, kuluçkacılıkta önemli bir tasarruf sağlanmış olur. Günlük-civcivlerin elle cinsiyet tayini için yapılan masraf da ortadan kalktığından, ekonomik fayda daha da büyür ve yetiştiriciliğin etkinliği önemli oranda artar.

1.6.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri

Griffith 1996 yılında uçamayan kanatlılarda cinsiyet tayininde kullanılabilecek PCR pirmerlerini geliştirmiştir (Aun ve Kumaran 2010). Bu primerler kromomodomain helikaz bağlayıcı proteini genini (CHD) tanırlar. Bu protein aslında DNA'nın sarmalleşmesini kontrol eden ATP-bağımlı bir proteindir ve cinsiyete bağlıdır. Yöntemde materyal olarak civiclerde alınan tüy folikül epitel hücrelerinden ekstrakte edilen DNA kullanılmaktadır (Griffiths ve ark 1996, Aun ve Kumaran 2010). Sadece tüy örnekleri üzerinde çalışıldığından, tamamen zararsız olan bu non invaziv metotla 6 günden az sürede 10.000 civcivin cinsiyet tayininin yapılabileceği ifade edilmektedir. Bugün için yöntem pahalıdır, in ovo uygulaması hakkında yeterli bilgi yoktur ve otomasyona uygun olmadığından, çoğunlukla cinsiyet tayininde referans yöntem olarak uygulanabilme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, yöntem doku örneği alınmasını gerektirdiğinden pratik değildir, yumurtada uygulanması güçtür, sonuçların alınması belirli bir zaman gerektirir ve pahalı ekipman, sarf malzemesi ve primerlerin kullanımına ihtiyaç duyar.

Kuluçkaya konmamış ve kuluçkanın erken dönemindeki embriyonik hücre örneklerinde çalışan Aslam ve ark (2012), PCR ile yapılan genetik analizin primer cinsiyet oranının belirlenmesinde en iyiyöntem olduğunu ileri sürmüştür.

1.6.2.3. Yumurtanın morfometrik verileri esas alınarak cinsiyet tayini

Yumurtanın morfolojik geometrik verilerinden, başlıca kuluçkalık yumurta kalite kriterlerinin belirlenmesi yanında diğer pek çok alanda da yararlanılmaktadır. Yumurtanın yumurta şekil indeksi, genişlik ve uzunluk verilerinden yararlanılarak hesaplanır (Çelik 2018). Öte yandan, yumurta büyüklüğü yanında uzunluk, genişlik, hacim ve şekil verileri birçok kanatlı hayvanın yaşam hikâyesinde kuluçkadan çıkış ağırlığı kadar önemlidir. Yumurtanın şekil özellikleriyle civcivin cinsiyeti arasında bir bağıntı olduğunun ortaya konması tavukçulukta pek çok açıdan yararlı olabilir.

Nick beyaz yumurtacı tavuk hattından temin edilen 300 kuluçkalık yumurta üzerinde yapılan uzunluk, genişlik verileri ve bunlardan hesaplanan şekil indeksi, ağırlık ile hacim verileriyle cinsiyet arasındaki bağıntı araştırılmıştır. Yumurta ağırlığının cinsiyetler arasındaki farkı önemsizken; şekil indeksi için $p= 0,001$, yumurta uzunluğu için $p= 0,0018$, yumurta genişliği için $p < 0,01$ ve hacim için $p= 0,004$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler esas alınarak, kuluçka öncesi morfolojik verileri belirlenen yumurtalardan çıkan civcivlerin cinsiyetiyle bu verilerin ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Yumurta genişliği arttıkça, yani yumurta yuvarlaklaştıkça dişi civciv oranı da artmıştır. Sivri şekilli, dar ve uzun yumurtalardan erkek civciv çıkma olasılığı artmaktadır. Uzun yumurtalardan dişi civciv çıkma olasılığı ise azalmaktadır. Bu nedenle, kuluçka öncesinde belirlenen yumurta şekil indeksi ve yumurta hacminin çıkacak civcivlerin cinsiyetinin belirlenmesinde daha önemli bilgi sağladığı ileri sürülmüştür (Dikmen ve Dikmen 2013). Bu yöntemin başarısı sınırlıdır ve düşük oranda doğru sonuç verebilir.

1.6 2.4. Yumurta kokusundaki farktan cinsiyet tayininde yararlanılması

Webster ve ark (2015) tarafından yumurtadan yayılan uçucu maddelerin fertilite, embriyonun cinsiyeti ve embriyonun gelişim sağlığı hakkında önemli bilgiler taşıyabileceği ileri sürülmüştür. Yöntemde yumurtalar kuluçkanın 1-8. günleri arasında özel kutularda belli süre bekletilmekte ve takiben ortam havası, katı faz mikroekstraksiyon fibril (SPME) ile ektraksiyondan sonra gaz kromatografisi, kütle spektrometresiyle (GS-MS) analiz edilmektedir. Analizde 24 uçucu maddenin miktarları belirlenmektedir. Kuluçkanın 1. gününde de farklar tespit edilmiş olmakla birlikte, cinsiyetin belirlenebildiği dönem kuluçkanın 8. günü öncesi günler olarak bildirilmiştir. Dişi embriyo bulunan yumurtaların havasında en fazla bulunan volatil maddeler benzaldehid, fenol, asetofenon, 2-nonanon, 2-

dekanon ve 2-undekanondur. Özellikle volatil ketonlardan hayvan kokusundaki hormonla-bağlı 2-undekanon seviyeleri dişilerde belirgin biçimde daha yüksektir.

1.6.2.5. Flow sitometriyle hücrelerde DNA miktarının belirlenmesi ve bu yöntemle cinsiyet tayini

DNA miktarının tayininde ve cinsiyet tespitinde uygulanan bir başka yöntem de flow sitometridir (Mendonça ve ark 2010). Bu yöntemde DNA içeriği tayininde kanatlı eritrositleri standart olarak kullanılmaktadır.

Genom büyüklüklerinin bilinmesi, kolay temin edilebilmesi, homojen nükleus süspansiyonu hazırlanabilmesi ve uzun süre saklanabilmesi nedeniyle kanatlılarda genom büyüklüğünün flow sitometrik yöntemle belirlenmesinde eritrositler kullanılmıştır. Tavuk alyuvarları, genom büyüklüklerinin bilinmesi, kolay elde edilmesi, nükleus süspansiyonunun homojen olması ve düşük sıcaklıkta uzun süre saklanabilmesi nedeniyle DNA'nın flow sitometrik analizinde iç ve dış standart olarak kullanılmaktadır (Mendonça ve ark 2010). Bu araştırıcılara (Mendonça ve ark 2010, Mendonça ve ark 2016) göre dişi çekirdek genomundaki DNA 2,15 pg iken, erkekte 2,24 pg'dır ve ırklar arasında çok az farklılık gözlenmektedir. Nakamura ve ark (1990), hibrid horozlarda diploid DNA miktarının 2,49 pg iken, tavuklarda 2,43 pg olduğunu bildirmiştir. Cinsiyetler arasındaki farkın Z ve W kromozomlarından kaynaklandığı (Tiersch ve ark 1989) ve tavuklarda Z kromozomunun W kromozomundan 2 kez daha büyük olduğu ve bunun erkek ve dişi diploid DNA miktarında ölçülebilir fark oluşturabileceği ileri sürülmüştür (Masabanda ve ark 2004).

1.6.2.6. Görüntü sitometrisiyle hücrelerde DNA miktarının belirlenmesi ve bu yöntemle cinsiyet tayini

Bitkisel ve hayvansal hücrelerde DNA miktar analizinde uygulanan diğer bir yöntem de dijital görüntülerde uygulanan görüntü sitometrisidir. Bu yöntemde hücre çekirdeği floresan boya veya Feulgen yöntemiyle boyanmakta ve alınan görüntüler dijital görüntü analizi programlarıyla işlenmektedir.

Feulgenle boyanan çekirdekte, bir bazik fuksin molekülü, iki pürin bazından asit hidroliziyle ortaya çıkan iki aldehid grubuyla birleşir (Wieland ve Scheuing 1921). Feulgen boyamada reaksiyonun DNA için spesifik olduğu, reaksiyon

ürününün difüze olmadan DNA bulunan bölgede lokalize olduğu ve renkli ürünün renk yoğunluğunun DNA miktarıyla bağıntılı olduğu kabul edilir ve bu durum, histolojik çalışmalarla ortaya konmuştur (Ris ve Mirsky 1949).

Bu çalışmada, Babcock ırkı tavuk ve horozların perimfer kan eritrosit morfometrik verileriyle, Feulgen reaksiyonuyla DNA içeriklerinin belirlenmesi, yine Feulgen reaksiyonuyla erken kuluçka döneminde alınan embriyonik eritrositlerin DNA içeriklerinin belirlenerek, cinsiyetler arasındaki muhtemel farkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Perifer kan örneklerinin alınması ve kan preparatlarının hazırlanması

Babcock ırkı ve verim döneminin ortasındaki 30 tavuk ve 30 horozun kanat venasından heparinli tüplere alınan perifer kan örnekleri 37ºC'deki serum fizyolojikle 1:1 oranında sulandırılarak, her örnekten altışar froti hazırlandı ve havada kurutuldu.

2.2. Yumurta örnekleri

Bu amaçla, 60 adet döllü ve 30 adet de dölsüz Babcock ırkı yumurtacı tavuk yumurtası kullanıldı.

2.2.1. Pander nükleusu ve embriyonik disk sahasının izolasyonu ve lamlara alınması

Dölsüz yumurtaların Pander nükleusu sahasındaki hücre çekirdeğinin izolasyonu amacıyla sahadaki sarı materyali yaklaşık 3 mm derinliğe kadar Pasteur pipetiyle plastik tüplere alınarak 37C°deki 5 ml'lik serum fizyolojikle çalkalandı ve 3000 devirde 15 dk santrifüje edildi. Her seferinde üstteki kısım atılarak işlem 3 kez tekrarlandı. Son santrifüjden sonra çökelti, serum fizyolojikle 1ml'ye tamamlandı ve pipetle dikkatlice çözdürülerek poly-L-lizin kaplı lamlara aktarıldı. Oda sıcaklığında 3 saat kurumayı takiben örnekler, etil alkol-glasiyal asetik asit-formol solüsyonunda (3:1:1, v/v/v) buzdolabının buzluğunda 1 saat süreyle tespit edildi (Takagi ve ark 2007).

Döllü yumurtalar kuluçkanın 84. saatine kadar kuluçka makinesinde (Prodi HB 175) inkübe edildikten sonra çıkarıldı ve 30 dakika süreyle soğumaları beklendi. Yumurtalar %70'lik etil alkolle dezenfekte edildi. Takiben yumurtalar kırılarak, içerik dikkatlice 10 cm'lik petri kaplarına boşaltıldı. Pander nükleusu sahasını örten yumurta akı dikkatle süzgeç kâğıdına emdirilerek tamamen uzaklaştırılarak disk yüzeyinin açığa çıkması sağlandı. Daha sonra ortasına 0,5 cm'lik delik açılmış olan 2X2 cm'lik Whatman no. 1 filtre kâğıdı, embriyonik disk merkezde kalacak şekilde yerleştirildi ve kâğıdın kenarlarındaki vitellüs membranı uygun bir bistürüyle kesildi. Süzgeç kâğıdı pensle dikkatlice oblik doğrultuda çekilerek embriyonik disk süzgeç kâğıdına alındı (Chapman ve ark. 2001, Aslam ve ark 2012). İçinde tamponlu serum fizyolojik (PBS, 0,1 M pH 7,4) bulunan Petri kabına alınan germinal disk, mikroskop altında, küçük plastik çubuğun ucuna

tutturulan atkuyruğu kılı yardımıyla dikkatlice vitellüs membranından ayrıldı (Aslam ve ark 2012) ve poly-L-lizin kaplı lamlara aktarıldı. Hazırlanan örnekler %10'luk formolde bir gece tespit edildi.

2.2.2. Boyama işlemleri

May grünwald-giemsa boyası için havada kurutulan her kan örneğinden hazırlanan altışar frotiden 2'şer adedi May grünwald-giemsa (Konuk 1981) ile boyandı. Bu amaçla, hazırlanan frotiler önce May grünwaldda 5 dakika, takiben 30 dakika giemsa solüsyonunda boyandı, alkol ve ksilen serilerinden geçirilen preparatlar entellanla kapatıldı.

Her kan örneğinden alınan üçer adet froti ise Feulgen reaksiyonu için kullanıldı. Feulgen reaksiyonu için frotiler %10'lük formolde bir gece tespit edildi. Takiben distile suda 3 kez yıkanan frotiler oda sıcaklığında kurutuldu. Hidrolizasyon için 60 dakika 5 M HCL'de tutulan frotiler, süre sonunda herbirinde 3'er dakika olmak üzere 3 kez distile suda çalkalandı, 12 saat +4°C'de Schiff solüsyonuyla muamele edildi ve takiben %0,5'lik SO_2 solüsyonunda her birinde üçer dakika olmak üzere üçer kez çalkalandı ve distile suda yıkandı. Daha sonra alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek entellanla kapatıldı (Atkin ve ark 1965, Mendonça ve ark 2010, Mendonça ve ark 2016, Naderi 2018).

Bir froti ise floresans mikroskobik inceleme için pH'sı 7,0 olan 0,1 M PBS'de çözdürülen %1'lik akridin oranjla 15 dakika boyandı. Distile suda 3 dakika yıkanan reparatlar 1:1 gliserin-distile su karışımıyla kapatıldı.

Yumurta örneklerinin pander nükleusu ve embriyonik disk sahasından elde edilen materyal de kan frotilerinde gerçekleştirilen işlemlerle may grünwald-giemsa ve feulgen reaksiyonuyla boyandı ve kapatıldı.

2.2.3. Dijital görüntülerin kaydedilmesi ve görüntü analizi işlemleri

May grünwald-giemsa ile boyanan ve Feulgen reaksiyonu uygulanan kan ve yumurta örneklerinden alınan preparatlar ışık mikroskobuyla (Nikon Eclipse E-400 light microscope equipped with DS-5M digital camera head and DS-L1camera control unit (Nikon, Japan), X100 büyütmede incelenerek, her preparatta gerekli görülen beşer bölgenin dijital görüntüsü kaydedildi.

Akridin oranjla boyanan örnekler, Olympus BX51 mikroskobunda, floresan ataçmanıyla incelenerek gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi.

Kaydedilen dijital görüntüler, görüntü analiz programıyla (BS PRO 200) analiz edilerek, eritrositlerin ve eritrosit çekirdeklerinin uzunluk ve genişlikleri, çekirdek alanı ve çekirdeklerin renk analiziyle DNA renk yoğunluğu tespit edildi. Elde edilen renk analizi verilerinden her örnek için DNA total renk yoğunluğu, kırmızı renk yoğunluğu, mavi renk yoğunluğu ve yeşil ton renk yoğunlukları ile yumurta örneklerinde gri ton renk yoğunluk değerleri belirlendi. Her örneğin preparatlarından kaydedilen dijital görüntülerde toplam 100'er eritrosit analiz edildi. Genişlik/uzunlukX100 formülüyle, hem eritrosit çekirdekleri ve hem de eritrositlerin morfolojik indeksleri hesaplandı.

Elde edilen renk analizi verilerinden, her renk için birim alan (1 μm^2) renk yoğunluğu hesaplandı.

2.2.4. İstatistiksel analiz

Verilerin Minitab for Windows, Release 9.2 istatistik programıyla analiz edildi ve grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.

3. BULGULAR

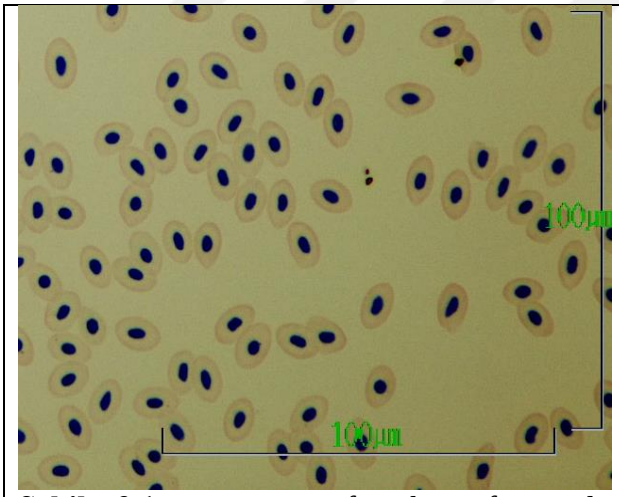
May grünwald-giemsa ile boyanan kan preparatlarındaki eritrositler mekik biçimli çekirdeklere sahip olan mekik biçimli hücreler halinde gözlendi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).

Feulgen reaksiyonu uygulanan preparatlarda ise eritrosit çekirdekleri mor renkli mekik biçimli gözlendi. Hücre sınırları belirgin değildi (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

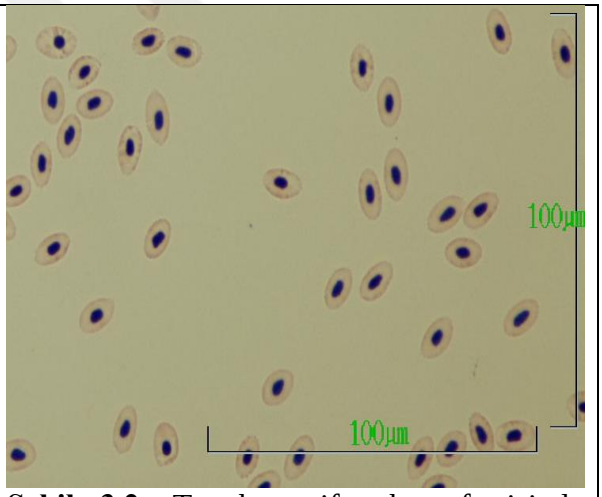
Döllü yumurtalardan alınan örneklerde kan adacıklarında gözlenen eritrositler mekikten ziyade oval biçimli ve mor renge boyanmış çekirdeklere sahipti (Şekil 3.5).

Akridin oranjla boyanan örneklerde görüntü analiz için uygun ve yeterli kalitede floresan mikroskobu görüntüsü elde edilemedi.

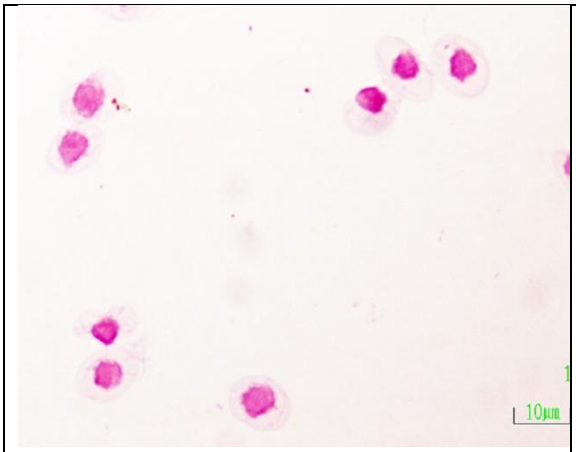
Dölsüz yumurtaların Pander nüklusu bölgesinden alınan örneklerde dişi oosit çekirdeği izole edilemedi.



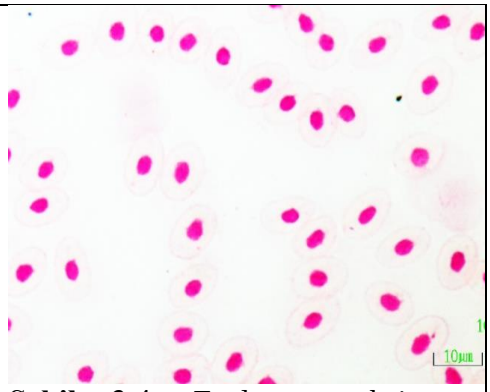
Şekil 3.1 Horoz perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir. May grünwald-giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.



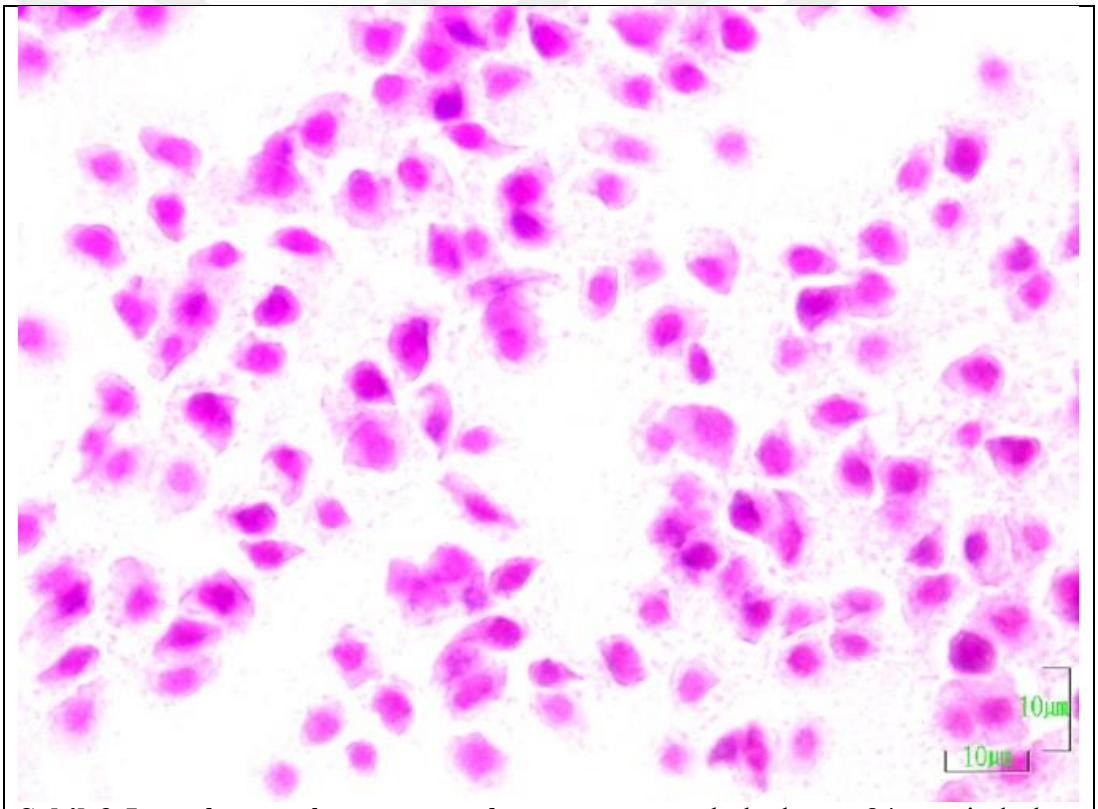
Şekil 3.2. Tavuk perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir. May grünwald-giemsa. Büyütme çizgisi: 100 µm.



Şekil 3.3. Feulgen reaksiyonu uygulanan horoz perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir. Feulgen reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.4. Feulgen reaksiyonu uygulanan tavuk perifer kan frotisinde eritrositler görülmektedir. Feulgen reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.5. Feulgen reaksiyonu uygulanan preparatta kuluçkanın 84. saatinde kan yapım adacığındaki eritrositler görülmektedir. Feulgen reaksiyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.

Elde edilen sonuçlara göre horoz ve tavukların eritrositlerinin morfometrik verileri bir birine birbirine oldukça yakındır. Bununla birlikte, horoz eritrosit çekirdeği tavuklarınkinden önemli derecede ($p<0,05$) daha uzun ve daha geniştir. Aynı zamanda horozlarda eritrosit çekirdeğinin morfolojik indeksi daha büyüktür ($p<0,05$). Grupların ortalama değerleri arasındaki fark önemli olmamakla ($p>0,05$) birlikte, tavukların eritrosit çekirdek alanı horozlarınkinden daha büyüktür (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Horoz ve tavukların eritrosit ve eritrosit çekirdeği morfometrik analiz sonuçları.

n=30		Uzunluk (µm) X±SS	Genişlik (µm) X±SS	Morfolojik indeks	Alan µm²
Horoz	**Eritrosit**	11,08±0,8	7,53±0,6	67,01±0,6	-
	Nükleus	4,81±0,4*	3,59±0,5*	74,61±0,4*	1371,27±749
Tavuk	**Eritrosit**	11,4±1,4	7,48±1,9	65,01±1,6	-
	Nükleus	4,58±0,6	3,25±0,4	70±0,6	1873,12±678,8

* Aynı sütundaki ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel öneme sahiptir ($p<0,05$).

Horoz ve tavukların perifer kan eritrosit çekirdekleri üzerinde yapılan renk analiz sonuçlarında, horoz eritrosit çekirdeklerinin birim alanındaki (1 µm2) total renk yoğunluğu ile kırmızı ve yeşil renk yoğunlukları tavuklarınkinden fazlaydı. Bununla birlikte, her iki cinsiyetin total renk yoğunlukları yanında farklı renk yoğunlukları arasında önemli fark bulunmadı ($p>0,05$, Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Horoz ve tavukların eritrosit çekirdeğinin birim alanında (1 μm^2) tespit edilen renk yoğunlukları.

n=30	Total renk yoğunluğu X±SS	Kırmızı yoğunluğu X±SS	Yeşil yoğunluğu X±SS	Mavi yoğunluğu X±SS
Horoz	0,204±0,24	0,341±0,33	0,131±0,28	0,242±0,04
Tavuk	0,197±0,22	0,270±0,26	0,136±0,12	0,200±0,16

Çizelge 3.3. Kuluçkanın 84. saatinde, kan adacıklarındaki eritrosit çekirdeklerinin renk analizi sonuçları.

N=30	Total renk yoğunluğu X±SS	Kırmızı yoğunluğu X±SS	Yeşil yoğunluğu X±SS	Gri yoğunluğu X±SS
Ortalama	207,38±15,1	253,41±1,0	129,28±62,6	213,85±43,5
Birim alan (1 μm^2)	0,37±0,24	0,45±0,24	0,21±0,17	0,38±0,21

Kuluçkanın erken döneminde eritrosit maturasyonu henüz tamamlanmadığından, 84. saate kadar inkübe edilen döllü yumurtaların eritrositleri üzerinde morfometrik analizler yapılmadı. Yapılan renk analizlerinde, eritrosit çekirdeklerinin ortalama ve birim alan renk yoğunlukları arasında büyük bireysel farklar gözlendi (Çizelge 3.3). Birim alandaki (1 μm2) total renk yoğunluğunun 1,01-0,15, kırmızı renk yoğunluğunun 1,13-0,17, yeşil renk yoğunluğunun 0,77-0.05 ve gri ton yoğunluğunun 1,01-0,15 arasında dağılım gösterdiği bulundu. Bireysel farkların dikkate alınmasıyla yapılan değerlendirmede, her renk yoğunluğu için elde edilen verilerin, grup ortalamaları arasındaki farkların önemli olduğu ($p<0,05$) iki grupta toplandığı dikkati çekti. Buna göre total renk yoğunluğu sonuçları 1,01-0,92 (Total renk-I. grup) ve 0,62-0,15 aralıklarında (Total renk-II. Grup), kırmızı renk yoğunluğu 1,13-0,74 (Kırmızı-I. grup) ve 0,71-0,17 (Kırmızı-II. grup) aralıklarında, yeşil renk yoğunluğu 0,77-0,42 (yeşil-I. grup) ve 0,29-0,05 (Yeşil II. grup) aralıklarında, gri ton yoğunluğu ise 1,01-0,61 (Gri I. grup) ve 0,54-0,15 (Gri-II. grup) aralıklarında toplandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Kuluçkanın 84. Saatinde, kan adacıklarındaki eritrosit çekirdeklerinin renk analizi sonuçlarına göre yapılan sınıflamaya göre oluşturulan gruplar.

Total renk yoğunluğu X±SS		Kırmızı yoğunluğu X±SS		Yeşil yoğunluğu X±SS		Gri yoğunluğu X±SS	
I. grup 3 örnek	II. grup 27 örnek	I. grup 3 örnek	II. grup 27 örnek	I. grup 3 örnek	II. grup 27 örnek	I. grup 3 örnek	II. grup 27 örnek
1,01-0,92*	0,62-0,15	1,13-,74*	0,71-0,17	0,77-0,42*	0,29-0,05	1,01-0,61*	0,54-0,15

* Bir rengin I. grubunun birim alan renk yoğunluğu, aynı rengin II. grubununkinden önemli derecede ($p<0,05$) yüksek bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Kuluçkalık yumurtaların erken dönem cinsiyet tayininde günümüzde iki yaklaşım takip edilmektedir. Bunlardan ilki, yumurtalar kuluçkaya alınmadan cinsiyetin belirlenmesi ve ikincisi de kuluçka makinesine konan yumurtalarda cinsiyet tayinidir. Bu amaçla uygulanan çalışmalarda farklı 2 yöntem oldukça yaygınlık kazanmıştır. Bunların ilkinde cinsiyet, optik spektroskopik analizlerle; ikincisindeyse kuluçkaya konmamış döllü yumurtalardan yâda kuluçkanın belli günlerindeki alınan embriyonik hücre veya kan örneklerinin incelenmesiyle yapılmaktadır.

Bu yöntemlerde cinsiyetin belirlemesinde erkek ve dişi embriyoların kanındaki androjenik ve östrojenik hormon seviyeleriyle hemoglobin düzeyleri arasındaki farklar, hücrelerin DNA miktarının tayini ve polimeraz zincir reaksiyonuyla (PCR) kromozomlardaki dişiye özgü XHO 1 tekrarlayıcı eleman veya CHD-1 genlerinin bulunup bulunmadığının embriyonik analiz edilmesi, üylerin bazı dalga boylarındaki ışınları abzorbe etme özellikleri, embriyoların kuluçka sırasındaki vücut sıcaklık değişimleri arasındaki farklar, yumurtadan salınan koku moleküllerinin tespitinden yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, yukarıda sayılan metotlar henüz saha koşullarında test edilmemiş ve ticari bir uygulama ortaya konulamamıştır (Çelik 2018).

Yumurtanın germinal diskindeki hücre çekirdeklerinin DNA içeriğinin boyanması, ilk yıllarda Feulgen ve Rossenbeck reaksiyonunun modifiye bir şeklinin yumurta sarısı kesitlerine uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Demalsy ve Callebaut 1967). Bununla birlikte, yöntemdeki bazı zorluklar dikkate alınarak Gomori'nin hematoksilen boyasının bu amaçla kullanıma daha uygun olduğu ileri sürülmüştür (Emanuelsson 1965). Geçen zaman zarfında Feulgen reaksiyonunun uygulanmasında da bazı iyileştirmeler yapılmıştır. Schiff solüsyonunun SO_2 konsantrasyonunun artırılması, yöntemin duyarlılığını artırdığından çözeltideki SO_2 konsantrasyonu artırılmıştır (Elftman 1969). Öte yandan, Schhiff solüsyonundan çıkan kesitlerin çeşme suyunda en az 30 sn çalkalanmasının da SO_2 konsantrasyonunun artırılması kadar etkili olduğu belirlenmiştir (Demalsy ve Callebaut 1967). Takiben, yöntem, floresans mikroskopta inceleme yapmayı sağlayacak şekilde modifiye edilmiştir (Kasten 1960, Ploem 1967). Bununla birlikte son yıllarda Naderi (2018), Feulgen reaksiyonunun bazı hatalı sonuçlar

verebileceğini ve hematoksilen-eozinle kombine edildiğinde daha detaylı sonuç verdiğini ileri sürmüştür. Bu araştırıcı (Naderi 2018) frotilere 5M HCL ile 15 dakika hidroliz uygulamış ve distile suda 3 dakika yıkamayı takiben de 90 dakika Schiff solüsyonunda inkübe etmiş ve kesitleri 10 dakika yıkadıktan sonra da %1'lik metil greenle çekirdek boyası uygulamıştır.

Erken dönemlerde DNA'nın floresan mikroskopta incelenmesi amacıyla akriflavin, akridin sarısı ve korifosfin de florokrom olarak kullanılmıştır (Callebaut ve Sijens 1967). Akridin turuncusu (acridine orange) da A-T baz çiftine bağlanan iyi bir DNA boyasıdır. Öte yandan, Schhiff solüsyonundan çıkan kesitlerin çeşme suyunda en az 30 sn çalkalanmasının da SO_2 konsantrasyonunun artırılması kadar etkili olduğu belirlendi (Demalsy ve Callebaut (1967).

Son yıllarda DNA içeriğinin belirlenmesinde şelat oluşturan ethidiyum bromür ve propidyum iyodür, A-T baz çiftlerine bağlanan DAPI ve G-C baz çiftlerine bağlanan mitramisin gibi floresan boyalarla boyanan hücre çekirdeklerinin flow sitometrik analizi yöntemi yaygın olarak uygulanmaktadır (Akins 1994). Bu amaçla oldukça duyarlı onlarca florokrom geliştirilmiştir.

Feulgen reaksiyonunda tespit işlemi, nükleus ve kromozom bütünlüğünü koruyarak kromatine stabilite kazandırdığından çok büyük önem arzeder (Mendonça ve ark 2010). Bu yöntemde diğer bir önemli ve hatta en kritik aşama da hidrolizdir. Kullanılan HCL'nin konsantrasyonu, ortam sıcaklığı ve hidrolizin süresi sonucu çok önemli derecede etkilemektedir.Mendonça ve ark (2016), Feulgen reaksiyonu için kan frotilerinin %70'lik etil alkolde -20ºC'de 24 saat tespiti takiben %4 formaldehidde 60 dakika tekrar tespit edilmesini, 5M HCL'de oda sıcaklığında 10-60 dakika hidrolizini ve Schiff solüsyonunda 12-24 saat boyanmasını, takiben frotilerin 3 kez, her birinde 3'er dakika olmak üzere %0,5'lik sulu SO_2 çözeltisinde çalkalanmasını önermiştir. Bu çalışmada, optimum Feulgen reaksiyonu yönteminin belirlenmesi için yapılan ön çalışmalarda daha önceki araştırıcıların (Dondero ve ark 1954, Atkin ve ark 1965, Mendonça ve ark 2010, Mendonça ve ark 2016, Naderi 2018) yöntemleri denendi ve en uygun yöntemin, kan ve yumurtadan hazırlanan örneklerin %10'lük formolde bir gece tespit edilmeyi takiben distile suda 3 kez yıkanıp oda sıcaklığında kurutularak 60 dakika 5 M HCL'de hidrolizden sonra 12 saat +4°C'de Schiff solüsyonuyla boyandığı ve

takiben %0,5'lik SO_2 solüsyonunda intensifiye edildiği metot olduğu sonucuna varıldı.

Bu çalışmada uygulanan aspirasyon ve santrifügasyonla, Pander nükleusu bölgesindeki dişi genetik materyali taşıyan hücre çekirdeği izole edilemedi. Bunun nedeni muhtemelen çekirdek zarfının oldukça zayıf yapıya sahip olması ve işlemler sırasında genetik materyalin harap olması ve dağılması olabilir. Sarı globülleri de izolasyonda ve Feulgen reaksiyonunun gerçekleşmesinde büyük sorunlar yaratmaktadır. Callebaut ve Sijens (1967), yumurta sarısındaki embriyonik diski Heidenhain'in modifiye ettiği Susa tespitinde 1 gün tespit etmiş, bölgeyi sarıdan ayırarak aldığı örneği, takip işleminden sonra parafinde bloklamış ve alınan 6 µm kalınlığındaki kesitleri 60°C'deki 1N HCL'de 7 dk hidrolize etmiş, distile suda yıkadıktan sonra Schiff solüsyonunda oda sıcaklığında 90 dakika inkübe etmişlerdir. Pander nükleusundaki dişi yumurta hücresi çekirdeğinin izolasyonu amacıyla Callebaut ve Sijens (1967) tarafından tanımlanan yukarıdaki yöntemim uygulanması mantıklı olacaktır.

Feulgen reaksiyonunda kullanılan bazik fuksinin bu iş için uygun olması gerektiği, aksi takdirde farklı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir (Schulte ve Withkind 1988). Bu çalışmada Sigmanın CAS 632-99-5 numaralı bazik fuksin boyası kullanılmıştır. Schiff solüsyonunda kullanılan bazik fuksin solüsyonunun hazırlanması da önem arz etmektedir. Bu çalışmada, Schiff solüsyonu Dondero ve ark'na (1954) göre hazırlandı. Kısaca, 200 ml kaynar suya 1 gr bazik fuksin ilave edilip eritildi. Sıcaklık 50ºC'ye getirilip solüsyon süzüldü ve süzüntüye 2 gr aktif kömür ilave edilerek iyice çalkalandı ve bir gece buzdolabında bekletildikten sona Whatman N0:1 süzgeç kağıdıyla süzüldü. Bu solüsyona oda sıcaklığında 20 ml 1N HCL asit takiben de 2 gr Na2S206 ilave edildi. Araştırıcılar (Dondero ve ark 1954) bu Schiff solüsyonunun buzdolabında bir ay bozulmadan saklanabileceğini bildirmişlerdir.

Boyanma yoğunluğu farklı boyama işlemleri arasında farklılık gösterir. Bu fark, tespit ve boyamadaki ufak farklılardan kaynaklanabilir (Atkin ve ark 1965). Feulgen yöntemiyle boyanan aynı türün farklı dokularında DNA içeriği bakımından hafif farklar bulunmaktadır. Bu fark, Feulgen boyamasından kaynaklanacabileceği gibi hücrelerin polimorfiziminden de kaynaklanabilir. Polimorfizm kaynaklı boyanma farkı %10'dan azdır. Bu bulgu biyokimyasal bulgularla da

desteklenmiştir. Feulgen boyanmasındaki fark DNA'dan kaynaklanabileceği gibi nükleer protein gibi diğer bileşenlerden de kaynaklanabilir (Atkin ve ark 1965).

DNA miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk çalışmalarda insan ağız mukoza epitel hücreleri karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır (Atkin ve ark 1965). Güvercin, tavuk, kanarya ve muhabbet kuşu birbirine yakın DNA miktarına sahiptir (Atkin ve ark 1965). Mandel ve ark (1950) insan, sığır, koyun, domuz ve köpeklerin lökosit nükleusunda hemen hemen aynı miktarda DNA bulunduğunu tespit etmiştir. Schmidt ve Thannhauser (1945) her nükleusta 7,0 X 10^9 mg DNA bulunduğunu tespit etmiştir.

Araştırıcılar tarafından flow sitometriyle belirlenen erkek ve dişi genom miktarları arasındaki küçük farklar bulunmakla birlikte, tavukta diploid DNA miktarı 2,15 pg, horozdaysa 2,24 pg olarak hesaplanmıştır ve bu da horozdaki DNA miktarının %4,2 kadar daha fazla olduğunu göstermektedir (Mendonça ve ark 2016). Bununla birlikte, Nakamura ve ark (1990) tarafından erkek ve dişi arasındaki fark, önceki araştırıcılarınkinden daha düşük (%2,7) bulunmuştur. Mendonça ve ark (2016), metafazik Z kromozomunun W'den %200 daha fazla DNA içerdiğini ileri sürmüştür. Bu araştırıcılar erkek ve dişi genomları arasında erkek lehine hesapladıkları %4,2 fazlalığın Z ve W kromozomlar arasındaki DNA miktar farkından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Farklı kanatlı türleri, her ne kadar bu türler arasında memelilerdekinden daha fazla farklılıklar olsa da, total genetik madde içeriği bakımından üniform bir grup oluşturur. Aves sınıfındaki kanatlılar plasentalı türlerinkinin sadece yarısı kadar genetik içeriğe sahiptir (Atkin ve ark 1965).

Feulgen yöntemiyle boyanan aynı türün farklı dokularında DNA içeriği bakımından hafif farklar bulunmaktadır. Bu fark, Feulgen boyamasından kaynaklanacabileceği gibi hücrelerin polimorfiziminden de kaynaklanabilir. Polimorfizm kaynaklı boyanma farkı %10'dan azdır. Bu bulgu, biyokimyasal bulgularla da desteklenmiştir. Feulgen boyanmasındaki fark, DNA'dan kaynaklanabileceği gibi nükleer protein gibi diğer bileşenlerden de kaynaklanabilir (Atkin ve ark 1965). Feulgenle boyanma yoğunluğu farklı boyama işlemleri arasında farklılık gösterebilir. Bu fark, tespit ve boyamadaki ufak farklılardan kaynaklanır (Atkin ve ark 1965). Bu çalışmada yukarıdaki olumsuzluklar ve hücreler arasında hücre çekirdeği alanları arasındaki farklar da dikkate alınarak,

elde edilen total renk yoğunluğu ve her renk bandı için bulunan renk yoğunlukları verilerinden yararlanılarak birim alandaki (1µm2) renk yoğunlukları ayrı ayrı hesaplanarak değerlendirilmiştir. Bu sayede bir yandan farklı renk bandlarındaki abzorbans farklılıkları dikkate alınırken; aynı zamanda da birim alandaki yoğunluklar belirlenerek belirli bir standardizasyonun temin edilmesi amaçlanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İn ovo cinsiyet tayini tavukçuluk sektörünün hem maddi ve hem de insani en önemli sorunlarındandır. Bu nedenle bazı batılı ülkeler, sorunu çözmek için belli takvimler belirlemişler çok büyük bütçeli araştırmalar yürütmektedir.

İn ovo cinsiyet belirlemede uygulanan optik spektroskopi metotları, yumurtayla mekanik temas olmadan gerçekleştirilebildiği ve in situ uygulanabildiğinden yumurtadaki embriyoya zarar vermemektedir. Bu metotlar kontaminasyon riski taşımadan, doku veya sıvıların kimyasal veya genetik analizlerinde olduğu gibi sonuç beklenmeden gerçek zamanlı cinsiyet tayini imkânı sağlar. Bu yüzden, yumurtadan alınan örneklerin incelendiği hormon veya DNA analizleri esasına dayanan in ovo cinsiyet tayini standart yaklaşımlarına karşı açık şekilde daha avantajlıdır. Bu yüzden optik spektroskopi metotları, endüstriye aktarılma bakımından diğer cinsiyet tayini imkânı veren hormon ölçümleri ve DNA analizi gibi hepsi de yumurtadan örnek alınmasını gerektiren in ovo cinsiyet belirleme yöntemlerine göre açık bir üstünlüğe sahiptir.

Daha da önemlisi, optik spektroskopi embriyonun dış uyarımlara tepki vermeye, yani ağrı duyusunun gelişmeye başladığı kuluçkanın 7. gününden önce gerçekleştirilebildiğinden, hayvan refahına da katkıda bulunur. Ek olarak, erken dönemde yapılacak cinsiyet tespiti, istenmeyen erkek civcivlerin kuluçkası için harcanacak olan enerjinin tasarruf edilmesini ve kuluçka makinesinin performansının artırılmasını sağlar. Yukarıdaki nedenlerle optik spektroskopi, yumurtacı tavuk kuluçkasında in ovo cinsiyet tayininde güçlü bir teknik olma potansiyeline sahiptir.

Yukarıda sayılan avantajlarına karşın, optik spektroskopik yöntemler yoğun bir emek istemektedir ve henüz pratik veya ticari amaçlarla uygulanabilen bir sistem geliştirilememiştir. Mevcut durumda geliştirilmiş olan yöntemler, yumurtaya hiçbir işlem uygulanmayan tamamıyla non invaziv yöntemlerden, yumurta kabuğunda açılan birkaç mm'lik pencereden yapılan ölçümlerle veri elde edilmesine, embriyo hayatını tehdit etmeyecek kadar çok az miktarda embriyonik disk hücre örnekleri alınmasına ve hatta embriyonik kan örnekleri alınmasına kadar değişen kısmen invaziv yöntemlere kadar değişmektedir. Her yöntemin sonuçlarının güvenilirlik sınırı ve sonuçların tekrarlanabilirliği, kuluçka öncesi uygulanabilirliği ve uygulandığı kuluçka dönemi, ıskartaya çıkarılan yumurtaların

tüketimde kullanılabilirliği, yöntemin pratiğe aktarılma potansiyeli, geliştirilen sistemin ekonomikliği ve ticarileşme potansiyeliyle otomasyona uygunluğu birbirinden farklıdır.

Bu çalışmada, horoz ve tavuk eritrositlerinin morfometrik verileri birbirine oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, horoz eritrosit çekirdeği morfolojik indeksi tavuklarınkinden önemli derecede daha büyüktür ($p<0,05$). Bu durum, horoz eritrositlerinin DNA içeriğinin tavuklarınkinden daha fazla olmasından kaynaklanmış olabilir.

Horoz ve tavukların perifer kan eritrosit çekirdeklerinin renk analiz sonuçlarına göre horoz eritrosit çekirdeklerinin birim alanındaki (1 μm2) total renk yoğunluğuyla kırmızı ve yeşil renk yoğunlukları tavuklarınkinden fazla olmakla birlikte, bu fark istatistiki açıdan önemli değildi.

Kuluçkanın erken döneminde eritrosit (84. Saat) eritrositler üzerinde yapılan renk analizleri sonuçlarına göre eritrosit çekirdeklerinin birim alanındaki (1 μm2) total renk yoğunluğu 1,01-0,15 arasında, kırmızı renk yoğunluğu 1,13-0,17 arasında, yeşil renk yoğunluğu 0,77-0.05 arasında ve gri ton yoğunluğu da 1,01-0,15 arasında genel dağılım göstermiştir. Her renk yoğunluğu için elde edilen veriler, grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önemli olduğu ($p<0,05$) iki grupta toplandı. Böylece, total renk yoğunluğu 1,01-0,92 ve 0,62-0,15 aralıklarında, kırmızı renk yoğunluğu 1,13-0,74 ve 0,71-0,17 aralıklarında, yeşil renk yoğunluğu 0,77-0,42 ve 0,29-0,05 aralıklarında, gri ton yoğunluğu ise 1,01-0,61 ve 0,54-0,15 aralıklarında toplanan ikişer grup oluşturuldu. Erkek eritrositlerinin daha fazla DNA içeriğine sahip olduğu dikkate alındığında iki gruptaki embriyoların erkek, ikinci gruplardakilerin de dişi embriyo olabilecekleri sonucuna varıldı.

Bu çalışmada uygulanan yöntemlerin ve elde edilen bulguların tavuk ve horoz genomları arasında kesin ayrım yapabilmede yeterli olmadığı açıktır. Her ne kadar, erken dönemde yani kuluçka öncesi ve/veya erken kuluçka döneminde cinsiyet tayininde hedefler, sistemin ve ekonominin mantığına da uygun biçimde otomasyona ve embriyoda en az hasarla analiz gerçekleştirmeye uygun olan spektroskopik yöntemlere doğru kaysa, bunlar için kesin ve doğru veri sağlayacak yöntemler yine de sitometrik yöntemlerdir. Bu yüzden, bu konuda daha geniş

popülasyonları kapsayan, hiperspektral dijital kameraların da kullanılacağı ve detaylı istatistiksel yöntemler yardımıyla gerçekleştirilecek olan daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

Akins PO, 1994. Nuclear DNA Content and ploidy levels in the Genus *Ipomoea.* J Amer Soc Hort Sci, 119,1, 110-115.

Aslam MA, Hulst M, Hoving-Bolink RA, de Wit AA, Smits MA, Woelders H, 2012. A reliable method for sexing unincubated bird eggs for studying primary sex ratio. MolPLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0116345 Ecol Resources 12, 421–427.

Atkin NB, Mattison G, Beçak W, Ohno S 1965. the comparative DNA content of 19species of placental mammals, reptiles, and birds. Chromosoma (Berl.), 17, 1-10.

Bloom SE, Delany ME, Muscarella DE 1993. Constant and variable features of avian chromosomes. In: Etches RJ, Gibbon AMV, editors. Manipulation of the avian genome. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, pp: 39–59.

Cerit H, Avanus K. 2006. Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes. Turkish J Vet Anim Sci, 31,6, 371-374.

Chapman SC, Collignon JR, Schoenwolf GC, Lumsden A 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier Dev Dyn, 220, 284–289.

Çelik İ 2018. Tavuğun üreme sistemi histolojisi, embriyonik gelişimi ve kuluçka bilgisine giriş. S.Ü. Veteriner Fakültesi Ders Notu.

Demalsy P, Callebaut M 1967. Plain water as s rinsing agent preferable to sulfurous acid after the Feulgen nuclear reaction. Stain Technol 42, 133-136.

Dikmen BY, Dikmen S 2013. A morphometric method of sexing white layer eggs. Revista Brasil Ciência Avíc, 153, 203-210**.**

Dondero NC, Adler HI, Zelle MR 1954. Quantification of the feulgen reaction in bacteria Bacteriol, 68, 483-492.

Emanuelsson H 1965. Cell multiplication nin the chick blastoderm up to time of laying. Exp Cell Res, 39, 386-399.

Galli R, Grit Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E and Steiner G 2017. In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy. Anal Bioanal Chem, 409,1185–1194.

Galli R, Koch E, Preusse G, Schnabel C, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Steiner G 2017. Contactless in ovo sex determination of chicken eggs. Current DirecBiomed Eng, 3, 2, 131–134.

Galli R, Preusse G, Schnabel C, Bartels T, Cramer K, Krautwald-Junghanns M-E, Koch E, Steiner G 2018. Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopythrough the shell membrane. PLOS ONE 13,2, 1-14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.

Griffiths R, Daan S, Dijkstra C 1996. Sex identification in birds using two CHD genes. Proc Royal Soc London, Series B, 263, 1251-1256.

Horn R 2009. Script to Lecture Raman Spectroscopy. Lecture Series: Modern methods in heterogeneous catalysisFritz-Haber-Institute of the MPG. Department of Inorganic Chemistry Faradayweg:4-6. 14195 Berlin.

Konuk T 1981. Practical Physiology. Ankara Univ. Fac.Vet. Pub. Ankara, Turkey. pp: 95.

Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PCM, Vignal A, Fillon V, Walsh PS, Cox H, Tempest HG, Smith J, Habermann F 2004. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype. Genetics, 166,3, 1367–1373.

Mendonça MAC, Carvalhob CR, Clarindoc WR 2016. DNA amount of chicken chromosomes resolved by image cytometry. **I**nt J Cytol, Cytosyst Cytogenet, 69,3, 202-206.

Mendonça MAC, Carvalho CR, Clarindo WR 2010. DNA content differences between male and female chicken (Gallus gallus domesticus) Nuclei and Z and W chromosomes resolved by image cytometry. J Histochem Cytochem, 58,3, 229-235.

Naderi NJ 2018. Reporting an experience: Improving the feulgen staining technique for better visualizing of nucleus. Letter to The Editor. Iran J Pathol, 13,1, 106-107.

Nakamura D, Tiersch TR, Douglass M, Chandler RW 1990. Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. Cytogenet Cell Genet, 53, 201–205.

Ploem JS 1967. The use of vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. Z Wii Mikrosk Tech, 68,129-142.

Qiaohua W, Dandan FU, Ma Meihu M, Zhang Tao Z 2017. Differentiating between fertilized and unfertilized eggs prior to incubation based on oxygen flux measurement. Int J Agric and Biol Eng, 10, 4, 243-251.

Raman CV, 1928. A new radiation. Indian J Phys, 2, 387-398.

Ris BH, Mirsky DAE 1949. Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acıd with the feulgen nucleal reaction. J Gen Physiol, 20, 33,2, 125-146.

Schmidt G, Thannhauser SJ 1945. A method for the determination of desoxyribonucleicacid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J BiolChem, 61, 83-89.

Schulte E, Wittekind D 1988. Standardization of the Feulgen-Schiff technique staining characteristics of pure fuchsin dyes; a cytophotometric investigation. Histochem, 91, 321-331.

Steiner G, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Boos A, Koch E 2010. Sexing of turkey poults by Fourier transform infrared spectroscopy. Anal Bioanal Chem, 396,1, 465-470.

Takagi S, Ono T, Tsukada A, Atsumi Y, Mizushima S, Saito N, Shimada K 2007. Fertilization and blastoderm development of quail oocytes after ıntracytoplasmic ınjection of chicken sperm bearing the W chromosome. Poult Sci, 86, 937–943.

Tiersch TR, Chandler RW, Wachtel SS, Elias S 1989. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. Cytometry, 10, 706-710.

Webster B, Hayes W, Pike TW 2015. Avian egg odour encodes information on embryo sex, fertility and development. PLoS One, 10,1, e0116345, 1-10.

Webster B, Hayes W, Thomas PW 2015. Avian egg odour encodes information on embryo sex, fertility and development. PLOS ONE: 1-10. DOI,10.1371/journal.pone.0116345.

Weissmann A, Förster A, Gottschalk J, Reitemeier S, Krautwald-Junghanns M E, Preisinger R, Einspanier A, 2014. In ovo-gender identification in laying hen hybrids: Effects on hatching and production performance. Europ Poult Sci, 78 1-12.

Weissmann A, Reitemeier S, Hahn, A, Gottschalk J, Einspanier A 2013. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. Theriogenol, 80, 199–205.

Wieland H, Scheuing, G, 1921. Die Fuchsin-schweflige Säure und ihre farbreaktion mit aldehyden. Bet. Ddtsch, Chem. Ges, 54, 2527-2555.

8.ÖZGEÇMİŞ

31.01.1991 tarihinde Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlkokulu ve ortaokulu 1998-2006 yılları arasında Adana'da Şükran Çobanoğlu İlköğretim Okulu'nda, liseyi 2006-2010 yılları arasında Adana'da Borsa Lisesi'nde ve üniversiteyi ise 2010-2015 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde okudu.