

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**YERLİ GERZE (HACIKADI) TAVUK IRKINDA ET VERİMİ VE KALİTESİ
ÜZERİNE ETKİ EDEN
GENLERİN RNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Emine TOPARSLAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

EKİM 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**YERLİ GERZE (HACIKADI) TAVUK IRKINDA ET VERİMİ VE KALİTESİ
ÜZERİNE ETKİ EDEN
GENLERİN RNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Emine TOPARSLAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

EKİM 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YERLİ GERZE (HACIKADI) TAVUK IRKINDA ET VERİMİ VE KALİTESİ
ÜZERİNE ETKİ EDEN
GENLERİN RNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Emine TOPARSLAN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2022-6098 nolu proje ile desteklenmiştir.

EKİM 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YERLİ GERZE (HACIKADI) TAVUK IRKINDA ET VERİMİ VE KALİTESİ
ÜZERİNE ETKİ EDEN
GENLERİN RNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Emine TOPARSLAN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 16/10/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR (Danışman)
Prof. Dr. Mustafa AKŞİT
Prof. Dr. Yasemin ÖNER
Doç. Dr. Levent MERCAN
Doç. Dr. Münevver AKSOY

ÖZET

YERLİ GERZE (HACIKADI) TAVUK IRKINDA ET VERİMİ VE KALİTESİ ÜZERİNE ETKİ EDEN GENLERİN RNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Emine TOPARSLAN

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

Ekim 2023; 183 sayfa

Türkiye'nin tescil edilen iki yerli tavuk ırkından biri olan Gerze tavuk ırkının düşük verim özellikleri nedeniyle yetiştiriciliği gün geçtikçe azalmakta ve ırk yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır. Gerze tavuk ırkının verim özelliklerinin ortaya çıkarılarak geliştirilmesi ve ırkın ürünlerine ticari kimlik kazandırılarak yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması Gerze tavuk ırkının neslinin korunmasına destek olacaktır. Yerli Gerze tavuk ırkının koruma stratejilerine destek olmak ve ırk üzerinde gelecekte yapılacak çalışmalara temel veri sağlamak amacıyla gerçekleştirilen bu doktora tez çalışmasında Gerze tavuk ırkının et verimi ve et kalite özellikleri gen ifadesi (mRNA) düzeyinde incelenmiştir. Çalışmada hem Gerze tavuk ırkının hem de ticari hibrit tavuk ırkının iki farklı büyüme dönemindeki (Gerze: 10 ve 20 haftalık yaş, hibrit: 4 ve 8 haftalık yaş) *Pectoralis major* kas dokularında, lipid metabolizması (*PPAR γ* , *SCD*, *LPL*), kas gelişimi (*MSTN*, *CAPN3*, *FOXO3*) ve pürin biyosentezi (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8*, *ATIC*) yollarında görev alan genlerin ifade seviyeleri RT-qPCR analizi kullanılarak araştırılmıştır. *GAPDH* geninin endojen referans geni olarak kullanıldığı çalışmada 11 adet genin ifade seviyeleri, Gerze ve hibrit tavuk ırklarının iki farklı büyüme döneminden elde edilen C_q değerlerinden $2^{-\Delta C_q}$ değerinin hesaplanmasıyla elde edilmiştir. Çalışma bulguları, kas gelişiminin düzenleyicileri olarak görev alan *MSTN*, *CAPN3* ve *FOXO3* genlerinin Gerze tavuk ırkının her iki örneklem döneminde de hibrit ırka kıyasla daha fazla ifade edildiğini göstermektedir ($P<0.001$). Lipid biyosentezinde görev alan *PPAR γ* için sadece ilk örneklem döneminde önemli düzeyde ($P<0.05$) daha fazla gen ifadesine sahip olan Gerze tavuk ırkının, *SCD* ve *LPL* genleri bakımından her iki örneklem döneminde de hibrit ırka göre önemli düzeyde daha fazla gen ifadesine sahip olduğu saptanmıştır ($P>0.001$). Diğer yandan, et lezzetinin en önemli göstergesi olarak kabul edilen IMP'nin biyosentezinde görev alan genlerin (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8*, *ATIC*) her iki örneklem döneminde de Gerze tavuk ırkında daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir ($P<0.05$ ve $P<0.001$). Bu çalışma, et kalitesi ve lezzeti ile namı Osmanlı İmparatorluğu dönemine kadar uzanan Gerze tavuk ırkının et kalitesi özelliklerinin gen ifadesi düzeyinde araştırıldığı ilk çalışma niteliğine sahiptir. Bu nedenle, elde edilen çıktılar Gerze tavuk ırkında ileride yapılacak moleküler ıslah çalışmalarına temel veri olarak katkı sağlayabilecektir.

ANAHTAR KELİMELELER: Et kalitesi, Et lezzeti, Gen ifadesi, Gerze tavuğu, IMF, IMP, mRNA, RT-qPCR

JÜRİ: Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

Prof. Dr. Mustafa AKŞİT

Prof. Dr. Yasemin ÖNER

Doç. Dr. Levent MERCAN

Doç. Dr. Münevver AKSOY



ABSTRACT

INVESTIGATION OF EXPRESSION LEVELS OF GENES AFFECTING MEAT YIELD AND QUALITY IN GERZE (HACIKADI) TURKISH NATIVE CHICKEN BREED

Emine TOPARSLAN

PhD Thesis, The Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Demir ÖZDEMİR

October 2023; 183 pages

The Gerze chicken breed, one of the two native chicken breeds registered in Türkiye, is facing the danger of extinction due to its low productivity characteristics, and its breeding is decreasing day by day. Revealing and improving the productivity characteristics of the Gerze chicken breed and promoting its breeding by giving commercial identity to the breed's products will contribute to the preservation of the Gerze chicken breed's population. In this doctoral thesis study, conducted with the aim of supporting conservation strategies for the native Gerze chicken breed and providing foundational data for future research on the breed, the meat yield and meat quality characteristics of the Gerze chicken breed were examined at the gene expression (mRNA) level. In the study, the expression levels of genes involved in lipid metabolism (*PPAR γ* , *SCD*, *LPL*), muscle development (*MSTN*, *CAPN3*, *FOXO3*), and purine biosynthesis (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8*, *ATIC*) pathways in Pectoralis major muscle tissues of both Gerze chicken breed and commercial hybrid chicken breed at two different growth stages (Gerze: 10 and 20 weeks old, hybrid: 4 and 8 weeks old) were investigated using RT-qPCR analysis. The study employed the *GAPDH* gene as the endogenous reference gene, and the expression levels of 11 genes were determined by computing the $2^{-\Delta C_q}$ value using the C_q values collected from both distinct growth stages of Gerze and hybrid chicken breeds. The study findings indicate that the genes *MSTN*, *CAPN3*, and *FOXO3*, which serve as regulators of muscle development, were expressed more in the Gerze chicken breed in both sample periods compared to the hybrid breed ($P < 0.001$). For *PPAR γ* , involved in lipid biosynthesis, it was found that the Gerze chicken breed had significantly higher gene expression only in the first sampling period ($P < 0.05$), while for the *SCD* and *LPL* genes, the Gerze chicken breed exhibited significantly higher gene expression in both sampling periods compared to the hybrid breed ($P > 0.001$). Furthermore, it was observed that the genes involved in the biosynthesis of IMP, considered the most important indicator of meat flavor (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8*, *ATIC*), were expressed more in the Gerze chicken breed in both sampling periods ($P < 0.05$ and $P < 0.001$). This study represents the first investigation of the meat quality characteristics of the Gerze chicken breed, renowned for its meat quality and flavor dating back to the Ottoman Empire, at the gene expression level. Therefore, the findings obtained in this doctoral thesis may serve as fundamental data to contribute to future molecular breeding studies in the Gerze chicken breed.

KEYWORDS: Meat flavor, Meat quality, Gene expression, Gerze chicken, IMF, IMP, mRNA, RT-qPCR

COMMITTEE: Assoc. Prof. Demir ÖZDEMİR

Prof. Mustafa AKŞİT

Prof. Yasemin ÖNER

Assoc. Prof. Levent MERCAN

Assoc. Prof. Üyesi Münevver AKSOY



ÖNSÖZ

Son yıllarda ciddi bir şekilde yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalan Gerze tavuk ırkımızın namı yıllar öncesine dayanan et lezzetinin geliştirilmesi, sürdürülebilir yetiştiriciliğinin sağlanması ve ticari üretime dahil edilmesi oldukça önemlidir. Gelişmiş ülkelerin birçoğu yerli tavuk ırklarının ıslahı ve korunması üzerine çeşitli stratejiler geliştirirken, diğer yandan bu ırkların ürünlerini dünyaya tanıtmayı ve ulaştırmayı da başarılı bir şekilde gerçekleştirmektedir. Zengin biyoçeşitliliğiyle çok kıymetli hayvan genetik kaynaklarına sahip olan ülkemizin kaybolmak üzere olan değerlerinin yalnızca ekonomik değil sosyo-kültürel olarak da ülkemize kazandırılmasını bir borç bilirim. Bu hedefle çıkılan yolda elde edilen sonuçların, yakın gelecekte büyük bir farkındalık yaratarak atılacak somut ve önemli adımların bir başlangıcı olmasını temenni ederim.

Öncelikle doktora eğitimimin en kritik döneminde akademik desteğini ve bilimsel bakış açısını benden esirgemeyen, ayrıca bu konu üzerinde çalışmam için sağladığı imkan ve çalışmanın hazırlanışından itibaren her aşamasında sunduğu katkılarıyla çalışmayı zenginleştiren saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yalnızca doktora tezi değil diğer tüm çalışmalarda bilgisini, sabrını, hoşgörüyü ve anlayışını hiçbir zaman esirgemediği için kendisine minnettarım. Akademik yolun bu en kıymetli dönemini sizin önderliğinizde tamamlamış olmamın gururunu ve mutluluğunu her daim hissedeceğim.

Bu tez çalışmasının maddi olarak desteklenmesini sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin YÖK 100/2000 projesi Organik Tarım alanında gerçekleştirilmesi amacıyla bursiyer statüsünde desteklenmemeye olanak sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimi BİDEB 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı kapsamında bursiyer olarak tamamlamama destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesinde ve devamında yürütülen tüm süreçlerde değerli katkılarını benden esirgemeyen, ayrıca çalışmamın her aşamasında gösterdikleri yol ve öğrettikleri bilgilerle beni yüreklendiren çok değerli Tez İzleme Komitesi Üyeleri; Sayın Doç. Dr. Levent MERCAN'a ve Sayın Doç. Dr. Münevver AKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Bana kattıkları her şey için minnettarım...

Ayrıca tez çalışmasının değerlendirilmesi aşamasında sağladıkları katkılarla çalışmayı zenginleştiren Tez Savunma Sınav Jüri Üyesi hocalarım; Sayın Prof. Dr. Mustafa AKŞİT'e ve Sayın Prof. Yasemin ÖNER'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın materyalini sağlayan başta Sayın Melih ÇINAR olmak üzere Hacıkadı Üretim A.Ş. yönetim kurulu üyelerine çok teşekkür ederim. Ayrıca Sinop'un Gerze ilçesinden örnek toplayabilmem için sağladıkları maddi desteklerinden ötürü Sayın Özcan ÇETİN'e, Sayın Mehmet Ali KOÇ'a, Sayın Şevket KURULAR'a ve Sayın Emin GÖKGÖZ'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitim sürecinde bana gösterdiği sevgi, hoşgörü, anlayış, saygı ve en önemlisi kıymetli yol arkadaşlığı için ekip arkadaşım doktora öğrencisi Leyla BENER'e çok teşekkür ederim. Katkıların, desteğin ve en önemlisi arkadaşlığın için minnettarım.

Doktora eğitimim ve tez sürecimde her daim bana destek olan ve bıkmadan, usanmadan her soruma sabırla cevap veren ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Çiğdem OTUR'a kıymetli yol arkadaşlığı için çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin en kritik döneminde uzattığı el ile bana güç veren ve tez sürecim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Eren ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimime Antalya'da başlamamın en büyük şansı olarak gördüğüm ikinci ailem olan ATEŞ ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans eğitimime başladığım günden bu yana yıllarını bana hasret kalarak geçiren, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, benimle ilgili kurdukları hayaller ile bana da her daim umut ve cesaret veren canım annem-babam, Kevser-Öznur TOPARSLAN'a, ablam-kardeşim, Beren Fatma TOPARSLAN'a ve Elif TOPARSLAN'a çok teşekkür ederim. Size sonsuza dek minnettar kalacağım.

Hayatımın en zor döneminde karşıma çıkan ancak sevgisiyle, saygısıyla, hoşgörüsüyle, gösterdiği sonsuz anlayış ve destek ile hem doktora tez sürecini kolaylaştırmak için çok büyük fedakarlık gösteren hem de bana her daim kendimi şanslı hissettiren çok kıymetli müstakbel eşim Abdullah AKÇAY'a gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	vii
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Gerze Tavuk Irkı	4
2.2. Tavuklarda Et Kalitesine Etki Eden Faktörler	6
2.3. Tavuklarda Et Kalitesine Etki Eden Bazı Genler	7
2.3.1. Tavuklarda lipid metabolizması üzerinde etkili olan bazı genler	8
2.3.2. Tavuklarda büyüme ve gelişme üzerine etkili olan bazı genler	16
2.3.3. Tavuklarda et lezzeti üzerine etkili olan bazı genler	21
2.4. Gen İfadelerinin Belirlenmesinde Kullanılan RT-qPCR Analizi.....	27
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Araç ve gereç	37
3.1.2. Tamponların ve solüsyonların hazırlanması	39
3.2. Yöntem	40
3.2.1. <i>Pectoralis major</i> kas dokusu örneklerinin toplanması	40
3.2.2. Toplanan doku örneklerinin parçalanması ve homojenizasyonu.....	41
3.2.3. Doku örneklerinden RNA izolasyonu	41
3.2.4. RT-qPCR analizi için primerlerin tasarlanması ve kullanıma hazırlanması.....	43
3.2.5. RNA'dan cDNA sentezi	46
3.2.6. cDNA'ların ve primerlerin kontrol edilmesi	47
3.2.7. RT-qPCR analizi.....	49
3.2.8. İstatistik analizler.....	56
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	58
4.1. RNA Örneklerinin Safılık ve Yoğunluklarının Tespit Edilmesi	58

4.2. RT-PCR Analizi (cDNA ve Primerlerin Kontrol Edilmesi)	59
4.3. RT-qPCR Analizi	60
4.3.1. Standart eğri.....	60
4.3.2. Erime eğrisi.....	61
4.3.3. Amplifikasyon eğrisi	61
4.4. RT-qPCR Analizi ile Genlerin İfadelerinin Belirlenmesi	62
4.4.1. Tavuklarda lipid metabolizmasında görev alan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi (<i>PPARγ</i> , <i>SCD</i> , <i>LPL</i>).....	71
4.4.2. Tavuklarda büyüme ve gelişme üzerinde etkili olan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi (<i>MSTN</i> , <i>FOXO3</i> , <i>CAPN3</i>).....	76
4.4.3. Tavuklarda et lezzeti üzerine etkili olan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi (<i>ADSL</i> , <i>AMPD1</i> , <i>AK1</i> , <i>ATIC</i> , <i>ENTPD8</i>)	79
5. SONUÇLAR	84
6. KAYNAKLAR	86
7. EKLER.....	102
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “YERLİ GERZE (HACIKADI) TAVUK IRKINDA ET VERİMİ VE KALİTESİ ÜZERİNE ETKİ EDEN GENLERİN RNA DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

16/10/2023

Emine TOPARSLAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
ddH ₂ O	: Çift distile su
E	: Eğim
G	: Göreceli santrifüj kuvveti
kb	: Kilobaz
kg	: Kilogram
M	: Molar
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
R ²	: Belirtme katsayısı
Δ	: Delta
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

Kısaltmalar

ADIPOQ	: Adiponektin
ADSL	: Adenilosüksinat liyaz
AK1	: Adenilat kinaz
AMPD1	: Adenozin monofosfat deaminaz
ATIC	: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
bç:	: baz çifti
C/EBP α	: CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein- α
CAPN3	: Calpain3
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CpG	: Sitozin-fosfat-Guanin dinükleotidi
C _q	: Kantitatif döngü eşik değeri
DAD-IS	: Yerel Hayvan Çeşitliliği Bilgi Sistemi
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dsDNA	: Çift zincirli DNA
ENTPD8	: Ektonükleosit trifosfat difosfohidrolaz 8
EtBr	: Etidyum Bromür
FA	: Yağ asidi
FAM	: Floresein amiditler
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FOXO3	: Forkhead Box O3 formyltransferase/imp cyclohydrolase
G0	: Gap 0 fazı
G1	: Gap 1 fazı
G2	: Gap 2 fazı

GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
ICSBP	: İnterferon konsensüs dizisi bağlayıcı protein
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IGF-1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
IMF	: Kas içi yağ
LHMAE	: Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü
LPL	: Lipoprotein lipaz
MRF	: Miyojenik Düzenleyici Faktörler
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
MSTN	: Miyostatin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLIN1	: Perilipin 1
PPAR γ	: Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör- γ
PPAR γ	: Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör
qPCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz
RNAi	: RNA interferans
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	: Ters Traskripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Sentez fazı
SCD	: Stearoyl-CoA Desatüraz
siRNA	: Susturucu RNA
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi

SP1	: Transkripsiyon faktörü SP1
TAE	: Tris Asetat EDTA
Taq	: Thermus Aquaticus
TGF-b	: Transforme edici büyüme faktörü beta
Tm	: Erime sıcaklığı
TOB	: Tarım ve Orman Bakanlığı
vb	: ve benzeri
vd	: ve diğerleri
β -aktin	: Beta-aktin

Tezde kullanılan ondalık sayılar “.” ayracı ile belirtilmiştir.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya genelinde bölgelere göre yerli tavuk ırklarının risk durumları ve sayıları.....	1
Şekil 2.1. Gerze tavuğu ve horozu	5
Şekil 2.2. La Flèche tavuğu ve horozu.....	6
Şekil 2.3. Tavuklarda lipid metabolizmasına katkıda bulunan potansiyel sinyal yolları.....	9
Şekil 2.4. Jingyuan tavuk ırkının göğüs ve bacak kaslarındaki IMP'nin spesifik birikimini düzenleyen anahtar proteinlerin etkileşim analizi	23
Şekil 2.5. Üç farklı PCR analizinin reaksiyon basamakları.....	29
Şekil 2.6. SYBR Green kullanılarak gerçekleştirilen RT-qPCR analizinin reaksiyon basamakları	30
Şekil 2.7. RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen erime eğrisi grafiğinde tespit edilebilecek olası fragmentler	31
Şekil 2.8. RT-qPCR analizinin gerçek zamanlı tespiti sonrası oluşan başlama, üstel ve plato fazları.....	32
Şekil 2.9. cDNA standartları için yapılan RT-qPCR analizinden elde edilen standart eğri grafiği.....	33
Şekil 3.1. Hacıkadı Üretim A.Ş. tesisinden Gerze tavuk ırkına ait görüntüler	35
Şekil 3.2. Tüyden DNA izolasyonu, PCR analizi ve agaroz jel elektroforezi	36
Şekil 3.3. Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait ilk örneklem dönemindeki civcivlerin cinsiyet analizi sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 3.4. Hacıkadı Üretim A.Ş. tesisinde Gerze ve hibrit tavuk ırklarından <i>Pectoralis major</i> kas dokusu örneklerinin toplanması	40
Şekil 3.5. Doku örneklerinin ultrasonikatör ile homojenizasyonu	41
Şekil 3.6. Doku örneklerinden RNA izole etmek için kullanılan ticari kit.....	42
Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımı	44
Şekil 3.8. Amplify4 programında tasarlanan <i>FOXO3</i> genine özgü primer tasarımı ve amplikon dizisi	45
Şekil 3.9. RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi için kullanılan ticari kit.....	47

Şekil 3.10. Standart eğri analizi için 1:10 konsantrasyonda oluşturulan 6 farklı cDNA dilüsyonu.....	50
Şekil 3.11. <i>GAPDH</i> , <i>ADSL</i> ve <i>PPARγ</i> primerleri için cDNA dilüsyon değerlerinin LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımına girilmesi	51
Şekil 3.12. Standart eğri analizi için kullanılan RT-qPCR cihazı ve SYBR Green tabanlı master mix	52
Şekil 3.13. 6 farklı dilüsyonda hazırlanan cDNA'ların <i>GAPDH</i> primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-qPCR analiz sonucunun LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımında incelenmesi.....	53
Şekil 4.1. Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin <i>GAPDH</i> primerleri ile çoğaltılan amplikonlarının agaroz jel görüntüsü.....	59
Şekil 4.2. 39 ve 8H4 numaralı örneklerin 12 adet primer kullanılarak yapılan PCR analizinden elde edilen amplikonlara ait agaroz jel görüntüsü	60
Şekil 4.3. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri.....	65
Şekil 4.4. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ikinci örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri.....	66
Şekil 4.5. Gerze tavuk ırkının her iki örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri.....	66
Şekil 4.6. Hibrit tavuk ırkının her iki örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri.....	67
Şekil 4.7. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem dönemine kıyasla sahip oldukları log ₂ tabanında göreceli kantitatif gen ifadesinin kat değişimi.....	68

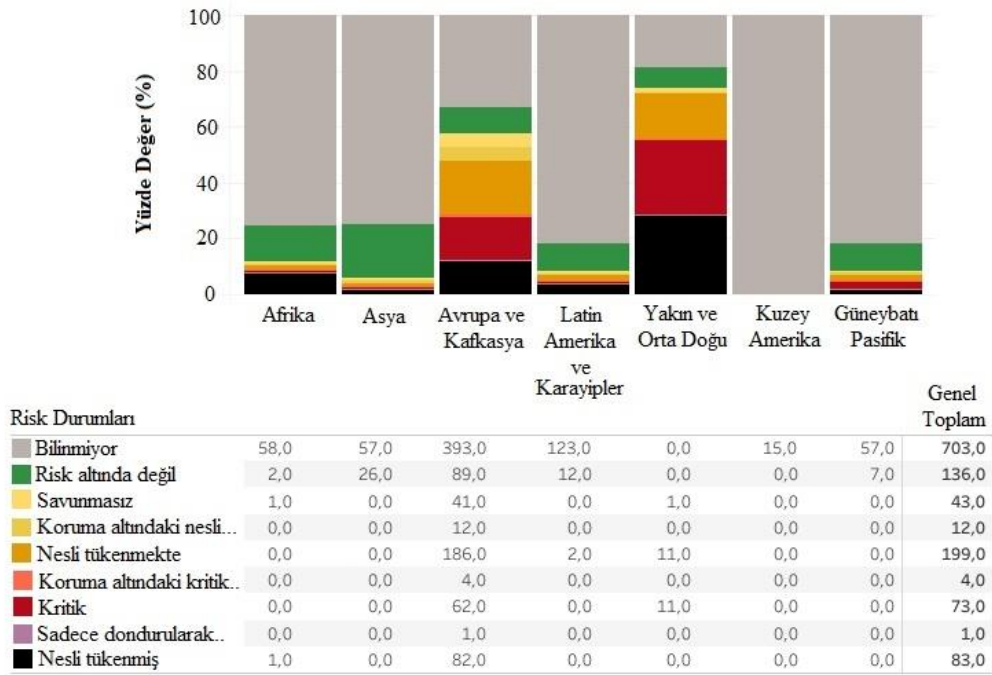
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deney gruplarına ait örneklem zamanları, ırklar ve birey sayıları	36
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan ekipmanlar.....	38
Çizelge 3.3. Primerlerin dizisi, ampikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları	45
Çizelge 3.4. cDNA kitinin bileşenleri ve miktarları	47
Çizelge 3.5. PCR analizinde kullanılan reaktifler ve miktarları	48
Çizelge 3.6. PCR analizi için uygulanan sıcaklık döngü programı	48
Çizelge 3.7. Standart eğri analizi için hazırlanan 24 örneklik reaksiyon bileşenleri ve miktarları	51
Çizelge 3.8. RT-qPCR analizi için kullanan kitin bileşenleri ve miktarları	54
Çizelge 3.9. RT-qPCR analizi için uygulanan sıcaklık döngü programı	54
Çizelge 4.1. Gerze tavuk ırkının ve ticari hibrit ırkın <i>Pectoralis major</i> kas dokusundan elde edilen RNA örneklerinin saflık ve yoğunlukları	58
Çizelge 4.2. Gerze tavuk ırkının iki örneklem döneminden elde edilen C_q değerleri ile ΔC_q değerleri	62
Çizelge 4.3. Hibrit tavuk ırkının iki örneklem döneminden elde edilen C_q değerleri ile ΔC_q değerleri	63
Çizelge 4.4. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının iki örneklem dönemi için gen ifadelerinin ($2^{-\Delta C_q}$) ortalama değerleri üzerine ırk, yaş ve ırk*yaş interaksyonu faktörlerinin etkisine ilişkin tek değişkenli varyans analiz tablosu	69

1. GİRİŞ

Ticari amaçlı kanatlı hayvan üretimi 1940'ların sonlarında başlayan ve gıda üretimindeki yoğun endüstrileşmeyle birlikte günümüzde en hızlı büyüme gösteren tarım alt sektörlerinden biridir (Escobedo del Bosque vd., 2020). Bu hızlı büyümenin etkisiyle hayvan başına düşen verimin artırılması için uygulanan melezleme ve yoğun seleksiyon günümüzdeki ticari hibritlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Thiele, 2001; Gillespie ve Flanders, 2009; Zhang vd., 2017). Ticari hibritlerin sahip olduğu verim özellikleri (et, yumurta gibi) ve bu sayede sağladıkları ekonomik kazanç yetiştiricilerin daha çok ilgisini çekmiştir. Bu durum, yerel ırklara olan talebin azalmasına ve dolayısıyla dünya genelinde pek çok yerel tavuk ırkının yok olmasına ya da neslinin tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına neden olmuştur (Leenstra vd., 2012). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından geliştirilen Yerel Hayvan Çeşitliliği Bilgi Sistemi (DAD-IS) verilerine göre, dünya çapında tanımlanan 1254 yerel tavuk ırkının %23.04'i yok olma tehlikesi altındadır ve bu yerel ırkların %6.61'inin nesli tükenmiştir (Şekil 1.1) (DAD-IS, 2023). Daha önceki verilerle kıyaslandığında (Şubat/2021; 1499 yerel tavuk ırkının %3.4'ünün nesli tükenmiş) yerli tavuk ırklarının sayısında gün geçtikçe hızla artan bir yok oluş dikkati çekmektedir (Franzoni vd., 2021).

Bölgelere Göre Yerel Tavuk İrklarının Risk Durumları



Son güncelleme: 9.09.2023 17:19:01

DAD-IS

Şekil 1.1. Dünya genelinde bölgelere göre yerli tavuk ırklarının risk durumları ve sayıları (DAD-IS, 2023'ten uyarlanmıştır)

Yüzyıllardır aynı coğrafyada yetiştirilen, yaşadığı bölgenin iklimine ve hastalıklarına adaptasyon geliştirmiş ve meradan daha fazla yararlanma potansiyeline sahip yerel tavuk ırklarının önemi gün geçtikçe daha çok artmaktadır (Pellatiero vd., 2020). Hibrit genotiplerin ihtiyaç duyduğu kontrollü çevre şartlarının yüksek maliyeti ve hastalıklara karşı daha dirençsiz olmaları son zamanlarda bu sorunların önüne geçmek üzere yerel tavuk ırklarına olan ilgiyi artırmıştır (Zanetti vd., 2010; Pellatiero vd., 2020). Ayrıca, hibritlerin hızlı gelişim süreçlerinin tüketicide bir güven kaybına yol açması, bu hızlı büyümenin antibiyotik, hormon ve büyütme faktörü gibi uyarıcılarla sağlandığı algısının oluşması, tüketiciyi daha doğal yetiştirme prosesleri ile büyütülen yerli ırklara yöneltmiştir (Devatkal vd., 2019). Diğer yandan, yerel ırkların kendine has lezzeti ve et kalitesi özellikleri hem tüketicilerin hem de araştırmacıların dikkatini çekmektedir (San vd., 2021). Dolayısıyla yerel ırkların sahip olduğu avantajlar ticari kanatlı yetiştiriciliğinde keşfedilmemiş et kalite özellikleri ile bazı niş pazar ihtiyaçlarının karşılanmasında da önemli bir potansiyel oluşturmaktadır (Gonzalez Ariza vd., 2019; Gonzalez Ariza vd., 2021).

Değişen tüketici profili sayesinde günümüzde serbest dolaşma alanlarıyla hareketliliği artıran yetiştirme sistemlerinden veya organik üretimden elde edilen kümes hayvanları ürünleri popüler gıda kaynakları haline gelmiştir (Fanatico, 2006; Tong vd., 2014). Bu bağlamda gelişmiş ülkelerde yerel tavuk ırklarını koruma altına almak ve aynı zamanda kalite/verim kapasitelerini artırmak amacıyla birçok strateji geliştirilmiştir. Uygulanan ıslah stratejileri neticesinde geliştirilen yerli tavuk ırklarından biri Fransa'nın milli servet olarak nitelendirdiği La Flèche tavuk ırkıdır. Kendine has et lezzeti, kas yapısı ve et rengi ile ülkenin en iyi et kalitesine sahip tavuk ırkı olduğu belirtilmektedir (Hudson, 2023; Anonymous, 1; Anonymous, 2). Bir başka tavuk ırkı ise yüksek kaliteli et, erken olgunlaşma, yüksek üreme performansı ve düşük kaliteli yemlere uyum sağlama gibi özellikleriyle bilinen Çin'in Jinghai Yellow yerli tavuk ırkıdır. Bu tavuk ırkları, yerli tavuk ırklarının korunması ve ıslah edilmesi konusunda verilebilecek en iyi örneklerdendir (Chen vd., 2019a; Wu vd., 2020).

Gelişmiş ülkelerde kanatlı biyoçeşitliliğinin korunması, en önemli hedeflerin başında gelirken, Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde yetiştiricilerin daha yüksek verim elde etme amacıyla ticari yetiştiriciliğe yönelmesi, düşük verimli yerli tavuk ırklarının üretim sürecinde tercih edilmemesine ve dolayısıyla bu ırkların genetik kaybına yol açmıştır. Bununla birlikte 8/8/2006 tarihinde 26253 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan "Kuş Gribi ve İnsana Tesir Eden Salgına Karşı Hazırlık ve Mücadele Projesi (AIHP)" ikraz anlaşması ile kuş gribi hastalığıyla (Avian influenza) mücadele için gerçekleştirilen imha işlemleri sahip olduğumuz gen kaynaklarımızda önemli kayıplara sebep olmuştur.

Ülkemizde bugüne kadar sadece Denizli ve Gerze tavuk ırkları resmi olarak tescil edilmiştir. Gerze tavuk ırkı, Sinop ilinin Gerze ilçesinde yöre halkı tarafından uzun yıllardır yetiştirilmektedir. Ayrıca, TOB (Tarım ve Orman Bakanlığı) Gerze İlçe Müdürlüğü Gerze Tavuğu Üretim Çiftliği'nde ve TOB LHMAE (Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü) bünyesindeki tesislerde koruma altına alınmıştır (Kaya ve Yıldız, 2014; İlhan, 2019).

Gerze tavuk ırkının Gerze ilçesine özgü lokal bir ırk olması ve yetiştiricilerin ilgisini yeterince çekememesi, günümüzde yerli tavuk ırkımızı yok olma tehlikesiyle karşı karşıya bırakmıştır. Hobi ve süs tavuğu yetiştiricileriyle 2020 yılında yapılan bir anket çalışmasında yetiştirici elinde oldukça az sayıda Gerze tavuk ırkı popülasyonu bulunduğu bildirilmiştir (Özdemir, 2019). Çalışma sonuçları Gerze tavuk ırkının salgın bir hastalık ya da afet gibi olaylarla karşı karşıya kalması durumunda ırkın tamamen yok olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle Gerze tavuk ırkının halk elinde korunması ve yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması için ekonomik verim özelliklerinin iyileştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde yalnızca hibrit genotipler değil, düşük verimli pek çok yerel tavuk ırkı koruma ve ıslah programları sayesinde hem lezzet hem de verim bakımından oldukça üst seviyelere ulaştırılmıştır (Chen vd., 2019a; Wu vd., 2020; Anonymous, 2). Eski kaynaklarda Gerze tavuk ırkının et lezzetiyle meşhur bir ırk olduğu, morfolojik olarak La Flèche tavuk ırkına oldukça benzerlik gösterdiği, dolayısıyla et kalitesinin de La Flèche tavuk ırkı kadar ıslah edilip geliştirilebileceği belirtilmiştir (Zeki, 1931). V şeklinde çatal ibik yapısı, uzun sakalları, büyük beyaz kulak lobları, siyah tüyleri ile La Flèche tavuk ırkı yerli Gerze tavuk ırkımıza çok fazla benzerlik göstermektedir. İkinci Dünya Savaşı sonrasında sayısı azalan La Flèche tavuk ırkı koruma altına alınmış (Anonymous, 1) ve yıllar içerisinde gerçekleştirilen ıslah çalışmaları sonucunda et verimi ve kalitesi oldukça geliştirilmiştir (Anonymous, 2). Tüm bu koruma ve ıslah çalışmaları neticesinde günümüzde La Flèche tavuğunun tüm Fransız tavuk ırkları arasında et kalitesi ve lezzeti bakımından üst sıralarda yer aldığı bildirilmektedir (Anonymous, 2). Bu bilgiler ışığında Gerze tavuk ırkının da La Flèche tavuk ırkı gibi et kalitesinin ıslah çalışmalarıyla geliştirilme potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar arasında Gerze tavuk ırkının et verimi ve kalitesi üzerine moleküler düzeyde yapılmış bir çalışma tespit edilememiştir. Bu nedenle, tamamlanan bu doktora tez çalışmasında Gerze tavuk ırkının et verimi ve kalitesi potansiyelinin gen ifadesi (mRNA) düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Gerze tavuk ırkı ile hibrit tavuk ırkının (Cobb500) *Pectoralis major* kas dokusunda et verimi ve kalitesine etki eden, lipid metabolizması (*PPAR γ* , *SCD*, *LPL*), kas gelişimi (*MSTN*, *FOXO3*, *CAPN3*) ve pürin biyosentezi (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8*, *ATIC*) yolaklarında görev alan genlerin farklı büyüme dönemlerindeki ifade seviyeleri RT-qPCR (Ters Transkripsiyon-Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi kullanılarak araştırılmıştır. Gerze tavuk ırkının mevcut yetiştiricilik sisteminde et verimi ve kalitesine etki eden genlerin ifade seviyelerinin belirlenmesi, yerli ırkımızın et kalitesi özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla yapılacak diğer çalışmalara temel veri sunma imkanı sağlayacaktır. Ayrıca çalışma bulgularının ulusal ve uluslararası platformlarda paylaşılması, Gerze tavuğunun tanıtılmasına, et verimi ve kalitesi potansiyelinin araştırılması için gerekli stratejilerin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Gerze Tavuk Irkı

Gerze tavuk ırkı Sinop'un Gerze ilçesine özgü bir ırktır ve yerel halk tarafından "Hacıkadı" olarak isimlendirilmektedir. Çatal ibik yapısına sahip olan ırkın yüzü orta uzunlukta ve hafif tüylüdür (Şekil 2.1). Kulak lobları erkeklerde her iki tarafta oldukça belirgin olmakla birlikte büyük ve beyaz olup kısa tüylerle çevrelenmiştir. Gözleri kahve rengi, orta büyüklükte ve yuvarlak olan Gerze tavuğunun gagası orta uzunlukta ve gri renkli, burun delikleri ise büyüktür ve gaga üzerinde çıkıntılı şekilde yer almaktadır. Vücudunun tamamı siyah tüylerle kaplıdır ve göğüs orta derinliktedir. Dişilerde boyun yapısı orta uzunlukta, erkeklerde uzundur ve her ikisinde de tüylerle kaplıdır. Büyük ve geniş bir kanat yapısına sahip olan Gerze tavuk ırkının kuyruk yapısı, erkeklerde sağlam ve gösterişli olmasının yanı sıra ışık altında yeşil-siyah renktedir ve deri rengi beyazdır. Ayrıca, incik, ayak derisi ve pulları gri renkte ve tüysüzken, ayakları dört parmaklı ve mahmuzludur. Bacak yapısı erkeklerde daha sağlam yapılı ve yüksek duruşluken, dişilerde daha kısa yapılıdır. Yumurta kabuk rengi beyazdır ve yumurta sayısı geniş bir varyasyon gösterse de yıllık ortalama 88 ± 6.35 adet olarak tespit edilmiştir. Yumurta ağırlığı ise 49.62 ± 0.77 g olarak hesaplanmıştır (Özdoğan ve Gürcan, 2006). Ergin canlı ağırlık, dişilerde 2.7 - 3.5 kg arasında, erkeklerde 3.5 - 4 kg arasında değişmektedir (Şekeroğlu ve Özen, 1997).



Şekil 2.1. Gerze tavuğu ve horozu

Gerze tavuk ırkımızın et lezzetinin vurgulandığı en eski kaynak Salih Zeki (1931) tarafından yazılan “ASRÎ TAVUKÇULUK” isimli kitaptır. Eserde ülkemizde o dönemlerdeki tavuk yetiştiriciliği şu cümleler ile anlatılmaktadır:

“Maateessüf bugün nesilleri kesilen hakiki ‘Gerze’ ve ‘Mısri’ tavuklarıyla, tepeli Fizan, paçalı Nemse ırklarının pek çok meraklıları vardı. Yakışıklı ve nefis etli Hacıkadın tavuklarını, uzun ve kalın öten ‘Denizli’, ince ve uzun sesli ‘Berat’ horozlarını zevk için besleyenler çoktu.”

1930’lu yıllarda Gerze tavuğu neslinin tükenmek üzere olduğunu vurgulayan Salih Zeki, aynı kitabında Gerze tavuğunu “Hacıkadın” tavuğu olarak isimlendirmiş ve Gerze tavuk ırkını “etlerinin nefaseti ve şekillerinin zarafeti ile meşhur ırktır” sözleriyle tanımlamıştır (Zeki, 1931). “ASRÎ TAVUKÇULUK” isimli eserinde Gerze tavuk ırkına morfolojik olarak oldukça benzerlik gösteren (Şekil 2.2) Fransız La Flèche tavuk ırkına dikkat çeken Salih Zeki, Gerze tavuk ırkının da et verimi ve kalitesi yönünde ıslah edilebilir olduğunu bildirmiştir (Zeki, 1931).



Şekil 2.2. La Flèche tavuğu ve horozu

Ülkemizde sayısı gün geçtikçe azalan Gerze tavuk ırkı üzerinde bugüne kadar az sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar; Gerze tavuğunun yumurta verim ve kalite özelliklerinin araştırılmasına, genetik çeşitliliğinin bazı moleküler markörler ile araştırılmasına, Gerze horoz ve tavuklarının göz yapısının anatomik, histolojik ve elektron mikroskopik olarak incelenmesine, hastalıklarla ilişkili lokuslardaki polimorfizmlerin araştırılmasına (SSR ya da PCR-RFLP markörleri kullanılarak) dayanmaktadır (Şekeroğlu, 1993; Kaya, 2008; Mercan, 2010; Lenger, 2011; Fadhıl, 2014; Özdemir vd., 2016; İnce vd., 2018; İlhan, 2019, Mercan vd., 2019; Ekinci ve Mercan., 2020; Alan vd., 2020; Mercan vd., 2022;). Literatür araştırmaları sonucunda Gerze tavuk ırkı üzerine et verimi ve kalitesi/lezzeti ile ilgili herhangi bir çalışma yer almadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, Gerze tavuk ırkının et kalitesi/lezzeti bakımından mevcut potansiyelinin mRNA düzeyinde araştırılması bakımından ilk olması niteliği taşımaktadır.

2.2. Tavuklarda Et Kalitesine Etki Eden Faktörler

Et kalitesi, yumuşaklık, su tutma kapasitesi, renk, besin değeri, lezzet ve gıda güvenliği gibi birçok faktör tarafından belirlenmektedir (Cao vd., 2022). Genel olarak et kalitesini değerlendirmek için kullanılan en yaygın faktörler yumuşaklık, su tutma kapasitesi, renk ve lezzet olarak kabul edilmektedir (Mancini vd., 2005; Desai vd., 2016). Diğer yandan, et endüstrisi için et kalitesi; fiziksel, kimyasal, morfolojik, biyokimyasal, mikrobiyal, duysal, teknolojik, hijyenik, beslenme ve mutfak özelliklerini içeren genel et özelliklerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir (Mir vd., 2017; Cao vd., 2022). Görünüş, doku, sululuk, renk, gevreklik, yumuşaklık, aroma ve lezzet, bir et ürünü satın almadan önce ve sonra tüketicilerin ilk ve nihai kalite yargısını etkileyen en önemli ve

algılanabilir et özellikleridir (Cross vd., 1986). Ayrıca, etin işlenmesinde ve et ürünlerinin imalatında, etin su tutma kapasitesi, kesme kuvveti, damlama kaybı, pişme kaybı, pH, raf ömrü, kolajen içeriği, protein çözünürlüğü ve yağ bağlama kapasitesi gibi ölçülebilir özellikler çok önemli kalite özelliklerindendir (Allen vd., 1998). Tüm bunların yanı sıra son zamanlarda tüketicilerin artan sağlık bilinci nedeniyle belirlediği bazı et kalitesi kriterleri (hafif, sade, az yağlı, yağı azaltılmış, kalorisi azaltılmış vb.) ortaya çıkmıştır ve bu etikete sahip ürünlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Cao vd., 2022).

Kanatlılarda et kalitesini iyileştirmeyi amaçlayan moleküler düzeyde çalışmalar gerçekleştirilirken (Cao vd., 2022) et kalitesinin poligenik bir özellik olması sebebiyle bu çalışmalarda genetik ilerleme başarısı sınırlı kalmıştır. Ayrıca, et kalitesine etki eden genlerin birbirleriyle olan karmaşık etkileşimi, bu genlerin et kalitesi üzerine etkilerinin kesin bir biçimde etkisini belirlemeyi zorlaştırmaktadır (Bendixen, 2015). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda et kalitesi özellikleriyle yakından ilişkilendirilen birçok major etkili aday belirteç gen tespit edilmiş, ancak et kalitesini belirleyen moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Bolormaa vd., 2013; Jolanta vd., 2014; Cao vd., 2022).

2.3. Tavuklarda Et Kalitesine Etki Eden Bazı Genler

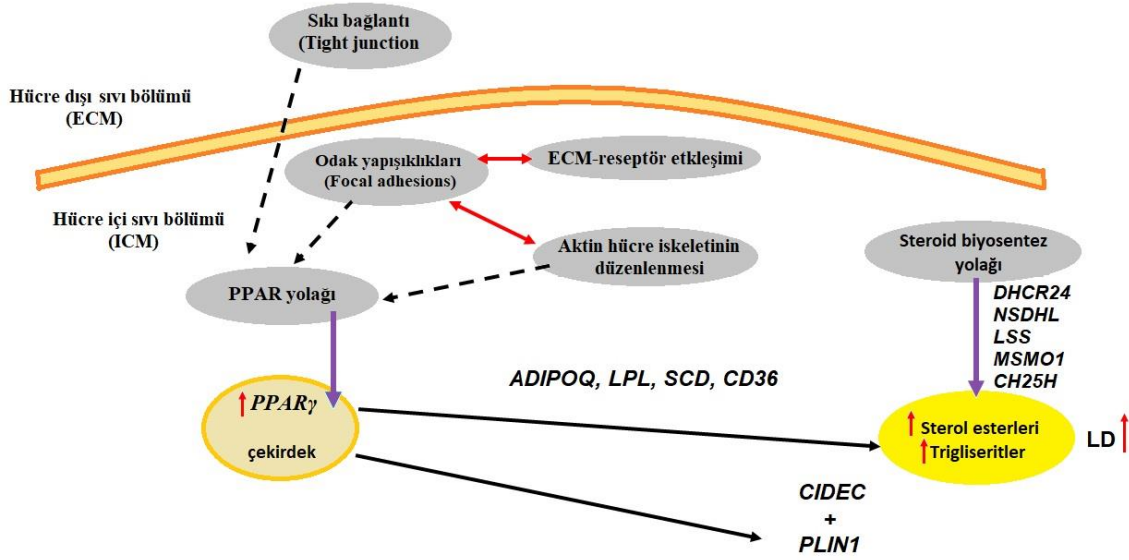
Yerli tavuk ırklarının yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması ve diğer yandan tüketicilerin yerli tavuk ürünlerine artan ilgisi nedeniyle, birçok gelişmiş ülke, yerli tavuk ırklarının koruma altına alınmasına ve verim potansiyellerinin araştırılmasına yoğunlaşmıştır (Pellattiero vd., 2020). Bu doğrultuda, yerli tavuk ırklarının göğüs kaslarının (*Pectoralis major* ve *Pectoralis minor*) ve bacak kaslarının (*Iliotibialis cranialis*, *Iliotibialis lateralis*, *Gastrocnemius externus*, *Fibularis longus*) gelişim mekanizmalarını inceleyen ve kas gelişimini artırmayı hedefleyen pek çok çalışma yapılmıştır (Piorkowska vd., 2015; Chen vd., 2015; Zhang vd., 2017; Kong vd., 2017; Mueller vd., 2018; Wu vd., 2018; Li vd., 2019a; Chen vd., 2019a ; Chen vd., 2019b; Liu vd., 2020; Wu vd., 2020). Et kalitesinin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için son yıllarda yerli ve hibrit tavuk ırklarının büyüme performansı ve et kalitesi özellikleriyle ilişkili moleküler mekanizmaları karşılaştırmalı gen ifadesi düzeyinde incelenmiştir (Chen vd., 2015; Zhang vd., 2017; Mueller vd., 2018). Diğer yandan et lezzeti ya da hastalıklara direnci gibi özellikleriyle bilinen yerli tavuk ırklarının büyümesi ve gelişmesi, etlik piliçlerin kesim yaşı, yerel ırkların hızlı ve yavaş büyüyen alt popülasyonlarındaki gelişim farkının araştırıldığı transkriptom çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Wu vd., 2018; Chen vd., 2019a; He vd., 2020; Wu vd., 2020). Bu çalışmalarda, *LPL*, *PPAR γ* , *SCD* gibi genlerin tavuklarda lipid depolanması ve et kalitesi üzerinde önemli etkileri olduğu (Gunawan vd., 2018; Liv d., 2019a; Wang vd., 2023), *ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8* ve *ATIC* gibi genlerin kaslardaki IMP birikimi ve et lezzeti ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hu vd., 2015; Ma vd., 2015; Zhang vd., 2018a; Huang vd., 2022a; Huang vd., 2022b). Özellikle kas büyümesi ve gelişmesi için *MSTN*, *CAPN3*, *FOXO3* gibi genlerin tavuklarda majör etkili aday genler olabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2009; Zhou vd., 2015; Lee vd., 2020).

2.3.1. Tavuklarda lipid metabolizması üzerinde etkili olan bazı genler

Tavuklarda aşırı yağ depolanması et üretim maliyetini, yem verimliliğini, et kalitesini ve tüketici sağlığını etkileyen istenmeyen bir faktör olarak kabul edilmektedir (Nematbakhsh vd., 2021). Ancak diğer yandan, toplam kas içi yağ (IMF) miktarı ve yağ asidi (FA) içeriği etin sululuk, lezzet ve yumuşaklık gibi kalite özelliklerinde belirleyici rol oynamaktadır (San vd., 2021). Bu nedenle tavuklarda lipid metabolizmasını ve kas gelişim dengesini anlamak için pek çok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda tavuklarda yağ depolanması ile ilgili moleküler düzeyde gerçekleştirilen araştırmalar, lipid metabolizmasında görev alan transkripsiyonel düzenleyicilerin rolünü ve birbirleriyle etkileşimlerini ortaya çıkarmıştır (Fu vd., 2014; Zhang vd., 2014; Chen vd., 2017; Zhang vd., 2018; Liu vd., 2019; Tunim vd., 2021; San vd., 2021; Li vd., 2023). Bu çalışmalar sonucunda farklı transkripsiyon faktörlerinin, çeşitli sinyal yollarıyla lipojenik (yağ asitlerinin sentezi ile ilgili) ve adipojenik (öncül yağ hücrelerinin olgunlaşması ile ilgili) genlerin ifadesini düzenlediği ve bu transkripsiyon faktörlerinin tavuk lipid metabolizması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Son zamanlarda hibrit tavuklara göre daha zengin bir et aroması ve lezzetine sahip olan yerli tavuk ırklarından elde edilen et ürünleri tüketici tarafından oldukça rağbet görmektedir (San vd., 2021). Yerli ırkların kendine özgü et kalitesi özellikleri yanında tüketiciler arasında bu tavukların doğal yaşamlarına uygun tarım sistemlerinde (serbest yetiştiricilik, organik tarım gibi) yetiştirildiğine dair de bir algı oluşmuştur. Kanatlı sağlığı ve beslenmesine ilişkin tüketiciler arasında artan bu farkındalık, daha kapsamlı yetiştiricilik sistemleri kullanılarak üretilen yerli tavuk ırkı ürünleri için pazar ihtiyacını gündeme getirmiştir (Devatkal vd., 2019; Al-Nasser vd., 2020; San vd., 2021). Bu nedenle yerli tavuk ırklarının et kalitesine ve lezzetine etki ettiği bilinen lipid metabolizması ile ilişkili lipojenik ve adipojenik genler ve biyolojik yollar üzerine pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Fu vd., 2014; Chen vd., 2017; Tunim vd., 2021; Nematbakhsh vd., 2021; Li vd., 2023). Bu çalışmalarda tavukların farklı dokularında lipid metabolizmasının önemli süreçlerine dahil olan bazı genler (*PPAR γ* , *SCD*, *LPL* gibi genler) tespit edilmiştir.

Liu vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, göğüs kası dokularında farklı trigliserit içeriklerine sahip (yüksek ve düşük) tavukların transkriptom analizi sonucunda, farklı lipid birikimini ve metabolizmasını kontrol eden anahtar yollar tespit edilmiştir (Şekil 2.3). *PPAR* sinyal yolağında görev alan *PPAR γ* geninin aktivasyonu ile trigliserid sentezini teşvik eden *ADIPOQ*, *LPL*, *SCD* veya *CD36* dahil olmak üzere bazı lipojenik genlerin ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Diğer yandan *PPAR γ* 'nın yağ damlacıklarının oluşumunu hızlandırmak için *CIDEA* geninin *PLIN1* geni ile etkileşimini destekleyebileceği tespit edilmiştir. Bu nedenle *PPAR γ* , *SCD* ve *LPL* genlerinin lipid metabolizması ve depolanması için anahtar enzimler kodladığı vurgulanmıştır (Liu vd., 2019; Nematbakhsh vd., 2021).



Şekil 2.3. Tavuklarda lipid metabolizmasına katkıda bulunan potansiyel sinyal yolları (Liu vd. 2019'dan uyarlanmıştır)

2.3.1.1. *PPARγ* geni (Peroxisome proliferator activated receptor gamma)

PPARγ geni tavuklarda öncül yağ hücrelerinin farklılaşması ve gelişmesinde görev alan önemli bir düzenleyici reseptör olarak bilinmektedir (Ding vd., 2011). Tavukta 12. kromozom üzerinde yer alan *PPARγ* geni, yaklaşık 55 kb uzunluğundadır ve 1428 bç'lik kodlama bölgesinden 475 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 373928). *PPARγ*, yağ asidi alımı, lipid depolanması, yağ asidi metabolizması, glukoz metabolizması ve öncül yağ hücrelerinin (pre-adipozit) farklılaşması gibi süreçlerde görev alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Rosen vd., 1999; Sato vd., 2004; Sato vd., 2009; Tarai vd., 2017; Tunim vd., 2021). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda, *PPARγ*'nin ağırlıklı olarak yağ hücrelerinde (adipozit) ifade edildiği ve bilinen bazı transkripsiyon faktörleri ile birlikte yağ hücrelerinin gelişim yollarına katıldığı tespit edilmiştir (Liu vd., 2010). Elde edilen bulgular, bu genin tavuklarda lipid metabolizması ve yağ hücresi farklılaşması sürecinde görev alan diğer genlerin de ifadesini uyardığını göstermiştir (Wand vd., 2017). Ayrıca, *PPARγ* geninin yağ hücresi farklılaşması sırasında önemli ölçüde ifadesinin arttığı ve bu nedenle çalışmalarda yağ hücresi oluşumunda popüler bir belirteç olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Liu vd., 2019). Genel olarak bugüne kadar yapılan çalışmalarda *PPARγ* geninin farklı dokulardaki ifade seviyeleri, dokulardaki yağ depolanması ile ilişkisi, cinsiyet, ırk, yaş ve beslemeye bağlı olarak değişkenlik gösterip göstermediği başlıca araştırma konuları olarak literatürde yer almıştır.

Sato vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada etlik tavuk ırklarının farklı dokularındaki *PPARγ* gen ifadesinin yaş, beslenme ve agonist uygulamalarına karşı değişimi araştırılmıştır. 30 haftalık tavuklarda incelenen 14 farklı dokudan en düşük ifade seviyesi yağ dokusu, dalak, akciğer ve pankreasta tespit edilmiştir. *PPARγ* mRNA seviyesinin yaşla birlikte yağ dokusunda azalırken, kas dokusunda arttığı saptanmıştır.

Diğer yandan farklı bitkisel yağ içeriklerine sahip rasyonların tavuk abdominal yağ dokusundaki *PPAR γ* mRNA seviyesini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir. Ayrıca, gıda takviyesi olarak uygun bir ligand (günlük 50 mg/ kg (piliç canlı ağırlığı) oral troglitazon takviyesi) kullanıldığında abdominal yağ ağırlığının, *PPAR γ* ve *LPL* mRNA seviyelerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular tavuk *PPAR γ* ifade seviyesinin dokular arasında farklılık gösterdiğini, farklı besleme stratejilerinden etkilenebildiğini ve morfolojik olarak da önemli değişikliklere sebep olabileceğini ortaya koymuştur (Sato vd., 2004).

Tavuklarda *PPAR γ* 'nın işlevinin daha iyi anlaşılabilmesi için 12 günlük civcivlerin öncül yağ hücresi dokuları kültüre alınarak RNAi (RNA interferans – transkripsiyon sonrası gen susturma) teknolojisiyle (*siPPAR γ*) *PPAR γ* geni susturulmuştur (Wang vd., 2008). Beklendiği şekilde hücrelerin *siPPAR γ* ile geçici transfeksiyonu, tavuk öncül yağ hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir ($P<0.05$). Bu sonuçlar *PPAR γ* 'nın tavuklardaki yağ dokularının miktarına doğrudan etki ettiğini göstermektedir.

Sato vd. (2009) tarafından yapılan bir başka çalışmada *PPAR γ* gen ifadesi seviyesinin ve abdominal yağ dokusu miktarının, ırk (etlik, yumurtacı hibritler ve yerli tavuk ırkları) ve cinsiyete bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Ancak çalışılan tüm ırklarda ve her iki cinsiyette de karın yağ dokusundaki *PPAR γ* mRNA seviyesinin 5 haftalık yaşta en yüksek seviyede ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle *PPAR γ* mRNA seviyesinin yaşla birlikte arttığı sonucuna varılmıştır. Özellikle etlik piliçlerde, *PPAR γ* mRNA seviyesinin yumurtacı hibritten ve yerli tavuk ırklarından önemli seviyede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca abdominal yağ dokusu ağırlığı ile *PPAR γ* mRNA seviyesinin korelasyon göstermesinin, *PPAR γ* geninin dokulardaki kas içi yağ miktarı bakımından majör etkili bir gen olabileceği vurgulanmıştır. Dolayısıyla yapılan bu çalışmada *PPAR γ* geninin kas içi yağ miktarı için iyi bir belirteç olduğu ve tavukların abdominal yağ birikiminde anahtar bir faktör olarak görev aldığı ifade edilmiştir (Sato vd., 2009).

Yağ hücresi oluşumu sürecine dahil olan birçok gen bulunmaktadır ve bu genlerin *PPAR γ* geni üzerindeki etkileri halen araştırma konusudur. Ancak *C/EBP α* geninin (CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein- α) *PPAR γ* geniyle ilişkisi Ding vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Tavuk embriyo fibroblast hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada, bir transkripsiyon faktörü olan *C/EBP α* 'nın, *PPAR γ* 'nın promotör bölgesine doğrudan bağlanabildiği ve *PPAR γ* ifadesini düzenleyebildiği tespit edilmiştir. Bu nedenle *C/EBP α* geninin, *PPAR γ* gen ifadesini doğrudan düzenleyebilme yeteneğine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen bulgular, tavuklarda *PPAR γ* 'nın doğrudan *C/EBP α* tarafından düzenlenebileceğini gösterdiği gibi başka düzenleyici faktörlerin de *PPAR γ* gen ifadesine ve dolayısıyla kas içi yağ miktarını ve yağ hücresi farklılaşmasını etkileyebileceğini göstermektedir (Ding vd., 2011).

PPAR γ geninin promotör aktivitesi sadece transkripsiyon faktörlerine değil promotör bölgenin metilasyon durumuna da bağlıdır (Sun vd., 2014). Yani transkripsiyon faktörü ne kadar fazla olursa olsun *PPAR γ* geninin promotör bölgesinde yer alan CpG

dinükleotidlerinin metillenme profili de gen ifadesi seviyesi bakımından oldukça kritiktir (Sun vd., 2014). Çünkü, promotör bölgede yer alan CpG dinükleotidlerine bir metil grubu bağanarak (DNA metilasyonu), transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye bağlanmasına engel olmakta ve gen ifadesinin azalmasına neden olmaktadır. Nihai olarak, *PPAR γ* gen ifadesi DNA metilasyon gibi gen ifadesini düzenleyen mekanizmalar tarafından da düzenlenmektedir (Sun vd., 2014).

Bu bağlamda, Sun vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada abdominal yağ içeriği bakımından seleksiyon uygulanmış ve uygulanmamış iki tavuk popülasyonunda (kas içi yağ miktarı düşük ve yüksek) *PPAR γ* 'nın promotör bölgesinin metilasyon durumu ve gen ifadesi seviyesi araştırılmıştır. *PPAR γ* geninin promotör bölgesindeki metilasyon seviyeleri bisülfid dizileme yöntemiyle, mRNA seviyesi ise RT-qPCR analizi ile incelenmiştir. *PPAR γ* transkripsiyon başlangıç kodonunda ATG başlangıç kodonunun da dahil olduğu -1175 ile -301 bp'lık bir bölgede, 6 adet CpG dinükleotidi tespit edilmiştir. Bu CpG dinükleotidlerinden 3 tanesinin (-548, -435 ve -383 bp pozisyonunda) her iki tavuk popülasyonları arasında farklı metilasyon profili gösterdiğini, ancak -1014, -796 ve -625 bp pozisyonlarındaki diğer 3 CpG dinükleotidlerinin aynı metilasyon profiline sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan her iki tavuk popülasyonunda da *PPAR γ* promotör bölgesindeki metilasyonunun yaşla birlikte azaldığı ve metilasyon seviyelerinin kas içi yağ miktarı düşük olan piliçlerde 2 haftalık (%79.9 ila 64.5; $P < 0.0001$), 3 haftalık (66.7 ila 58.3) %; $P < 0.0001$) ve 7 haftalık yaşlarda (%50 ila 42.7; $P = 0.0004$) önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan *PPAR γ* gen ifadesi seviyeleri ile DNA metilasyon seviyeleri arasında önemli düzeyde negatif korelasyon (Pearson $r = -0.653$, $P = 0.0057$) saptanmıştır (Sun vd., 2014). Elde edilen bulgular, azalan metilasyon seviyesinin artan *PPAR γ* ifadesiyle sonuçlandığını ispatlamaktadır. Sonuç olarak yapılan çalışmada, tavuk *PPAR γ* geninin yağ dokusu gelişimi sırasında DNA metilasyonu ile de düzenlendiği ortaya çıkarılmıştır (Sun vd., 2014).

PPAR γ geni üzerine yapılan bir başka çalışma ise genetik yapısının karakterizasyonudur (Duan vd., 2015). Veri tabanlarında yalnızca bir adet tavuk *PPAR γ* mRNA dizisi rapor edildiğini belirten Duan vd. (2015), *PPAR γ* cDNA dizisinin 5' bölgesini çoğaltarak, üç farklı transkripsiyon başlatma bölgesinden beş farklı transkript varyantının kopyalandığı tespit etmişlerdir. Ancak açık okuma çerçevesi kayması analizi sonucunda bu genin beş transkript varyantından (*PPAR γ 1-5*) sadece iki adet *PPAR γ* protein izoformunun (*PPAR γ 1-PPAR γ 2*) kodlandığı bildirilmiştir. *PPAR γ 2* izoformunun N-terminal bölgesinin *PPAR γ 1*'den daha fazla amino asit içerdiği (6 adet) saptanmıştır. Doku dağılım analizine göre, *PPAR γ 1*'in birçok tavuk dokusunda ifade edilmesine rağmen, ağırlıklı olarak abdominal yağ dokusunda ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu durumun, insan ve fare *PPAR γ 1* proteinleriyle de benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, *PPAR γ 1* protein izoformunun, *PPAR γ 1*, *PPAR γ 3*, *PPAR γ 4* ve *PPAR γ 5* transkript varyantları tarafından kodlanabileceği ileri sürülmüştür. *PPAR γ 1*'in, abdominal yağ dokusunda en fazla ifade edilen transkript olmasından dolayı bu dokunun öncelikli olarak *PPAR γ 1* protein izoformunun ifadesinden sorumlu olabileceği çıkarımı yapılmıştır (Duan vd., 2015).

PPAR γ 1 ve *PPAR γ 2* protein izoformlarının yağ hücresi farklılaşmasındaki görevlerinin aydınlatılması için tavuk öncül yağ hücrelerinin çoğaltılması, apoptozu ve

farklılaşması üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Mu vd., 2020). Her iki protein izoformunun ICP2 hücrelerinde (sürekli bölünebilen tavuk öncül yağ hücreleri) hücre çoğalmasını belirgin şekilde baskıladığı ve hücre döngüsünü G0/G1 aşamasında durdurduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ELISA deneylerinde her iki izoformun fazla ifade edilmesi durumunda apoptozu uyardığı ancak hücre farklılaşmasını da desteklediği belirtilmiştir. Diğer yandan, *PPARy2*'nin, apoptozu uyarmada, öncül yağ hücrelerinin oluşumunu teşvik etmede ve hücre çoğalmasını baskılamada *PPARy1*'den daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, her iki izoformun *LPL* ve *PLIN1* (Perilipin1) genlerinin promotör aktivitelerini farklı şekilde uyardıkları tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *PPARy1*'in ve *PPARy2*'nin öncül yağ hücrelerinin çoğalması, apoptozu ve yağ hücresi farklılaşması süreçlerini farklı şekilde düzenlediği bildirilmiştir (Mu vd., 2020). Dolayısıyla dokulardaki yağ hücresi miktarının, *PPARy* ifade seviyesiyle, *PPARy* mRNA dizi bilgisiyle ve varsa farklı *PPARy* protein izoformlarının ifade oranları ile ilişkilendirilmesi oldukça kritiktir.

2.3.1.2. *SCD* geni (Stearoyl-CoA desaturase)

Stearoyl-CoA desatüraz (*SCD* ya da *SCD1*) geni, palmitik asit (C16:0) ve stearik asidi (C18:0), sırasıyla palmitoleik (C16:1) ve oleik aside (C18:1) desatürasyonunu katalize ederek de novo (basit moleküllerden karmaşık moleküllerin sentezlenmesi) yağ asidi sentezinde görev alan anahtar bir enzimi kodlamaktadır (Nematbakhsh vd., 2021). Tavuklarda 6. kromozom üzerinde yer alan *SCD* geni, yaklaşık 18 kb uzunluğunda olup 1074 çb'lik kodlama bölgesinden 357 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 395706). Yapılan çalışmalarda *SCD*'nin tavuklarda vücut ağırlığı ve enerji homeostazının kontrolünde potansiyel bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Huang vd., 2015). Göğüs kası dokusunda farklı doymamış yağ asidi içeriğine sahip tavuklarda yapılan transkriptom analizi sonucunda *SCD*'nin fonksiyonel bir aday gen olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Gunawan vd., 2018).

Kas içi yağ miktarı, et kalitesi bakımından oldukça önemlidir ve kas dokularındaki aşırı yağ birikimi hem üreticiler hem de tüketiciler tarafından istenmeyen bir durumdur (Bourneuf vd., 2005). Bu nedenle lipid ve enerji metabolizmasında görev alan *SCD* geninin farklı dokularda, yaşlarda, ırklarda ve besin takviyelerinde ifade seviyelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla Dridi vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, abdominal yağ miktarı bakımından gruplandırılan tavuk popülasyonlarının (düşük ve yüksek) 9 haftalık yaşta, 16 ya da 24 saat beslemeden yoksun bırakmanın karaciğer dokularındaki *SCD* gen ifadesini azalttığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, *SCD* geninin cinsiyete bağlı olarak farklı dokularda farklı seviyelerde (dişilerde en yüksek ovaryumda, erkeklerde hipotalamusta) ifade edildiği bildirilmiştir. Yem tüketimini etkileyen hormonlardan biri olan leptinin tavuklara uygulanmasının karaciğer dokusunda *SCD* mRNA seviyesini artırdığı, yağ asidi ve steroid biyosentezini inhibe eden cerulenin (antibiyotik) uygulamasının kas dokularında *SCD* mRNA seviyesini azalttığı saptanmıştır. Leptin uygulamasının memelilerdeki aksine bir eğilimde *SCD* gen ifadesi sergilemesi nedeniyle, bu genin türler arasında farklılıklar gösterdiği ileri sürülmüştür (Dridi vd., 2007). *SCD* geninin dahil olduğu yollar dikkate alındığında bu genin ifadesinin cinsiyete, türe, beslemeye ve dokuya spesifik olduğu ifade edilebilir.

Tavuklarda açlık durumunun *SCD* ifadesine etki ettiğini bildiren bir başka çalışmada 6 haftalık yaşta tavuklar 16-48 saat aç bırakılmış ve açlık uygulaması sonrasında tavukların karaciğer dokularında *SCD* geni ifade seviyesinin 14 kat inhibe edildiği tespit edilmiştir (Désert vd., 2008).

Yağ asitleri, çeşitli genlerin düzenlenmesi yoluyla hücrel lipid metabolizmasında düzenleyici rol oynamaktadır ve *SCD* geni lipid metabolizmasında görev alan önemli genlerden biridir. Dolayısıyla *SCD* geninin dokulardaki yağ asidi kompozisyonuyla yakından ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Maharani vd. (2013) ve Furqon vd. (2017) tarafından yapılan çalışmalar bu varsayımı desteklemektedir. Yapılan çalışmalarda, etlik tavuklarda bacak kası ve karaciğer dokusundaki *SCD* geninin 2. ekzonundaki polimorfizmlerin farklı yağ asidi içerikleriyle yakından ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır ($P<0.05$) (Maharani vd., 2013). Cobb500 genotipinde gerçekleştirilen çalışmada ise yine *SCD* geninin 2. ekzonunda tespit edilen SNP'nin (g.3728A>G) bacak kası dokusundaki miristoleik asit (C14:1; $P<0.05$), palmitik asit (C16:0; $P<0.05$), palmitoleik asit (C16:1; $P<0.05$) ve doymuş yağ asitleri (SFA; $P<0.05$) ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Maharani vd., 2013). F2 kampung etlik tavuk ırkının karaciğer dokusunda *SCD* geninin 2. ekzonunda tespit edilen bir SNP'nin (g.37284A>G) palmitoleik asitle (C16:1), ayrıca 26 haftalık yaşta tavukların toplam yağ asidi ve doymamış yağ asidi miktarıyla yakından ilişkili olduğu saptanmıştır ($P<0.05$) (Furqon vd., 2017). Elde edilen bulgular doğrultusunda, *SCD* geninin dokulardaki yağ asidi içerikleri için bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Maharani vd., 2013; Furqon vd., 2017).

SCD geninin dokulardaki yağ asidi içeriğine etkisi, araştırmacıları doymuş ve doymamış yağ asidi içerikleriyle *SCD* gen ifadesi arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönlendirmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada (Gunawan vd., 2018), 12 haftalık yaşta Endonezya hibrit tavuk ırkının *Pectoralis major* kas dokusundaki yağ asidi miktarı ve bileşenleri, ayrıca karaciğer dokusundaki *SCD* gen ifadesi seviyesi incelenmiştir. *Pectoralis major* kas dokusunda yüksek miktarda yağ asidi içeriğine sahip tavuklarda doymamış yağ asitlerinin daha fazla olduğu, bunun aksine düşük miktarda yağ asidine sahip tavuklarda doymuş yağ asitlerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak *SCD* gen ifadesinin, yüksek miktarda yağ asidine sahip tavuklarda önemli düzeyde daha fazla ifade edildiği bildirilmiştir ($P<0.05$) (Gunawan vd., 2018). Doymamış yağ asidi içeriğinin daha sağlıklı olduğu ve bu nedenle tavuk etinin beyaz ete kıyasla öncelikli tercih sebebi olabildiği göz önüne alındığında, yüksek doymamış yağ asidi içeriğine sahip tavukların seçiminde *SCD* geninin aday bir belirteç olarak kullanılması potansiyeli de gündeme gelmektedir.

Benzer bir çalışma Jin vd. (2020) tarafından yapılmıştır ve 20 haftalık yaşta Kore yerli tavuk ırkının bacak kası dokusundaki *SCD* geninin sahip olduğu bir SNP'nin (rs10731498) stearik asitle (C18:0), göğüs kası dokusundaki *SCD* geninin sahip olduğu SNP'lerin (rs10731498 ve rs313838448) oleik asit (C18:1) ve linoleik asit (C18:2) ile önemli düzeyde yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Yağ asidi sentezi anlamına gelen lipogenez, birden fazla gen ailesinin katıldığı karmaşık bir süreçtir ve bu poligenik özellik sebebiyle tavuklarda çoklu yağ asidi

sentezini düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Liu vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışma ile çoklu doymamış yağ asidi senteziyle ilişkilendirilen, aralarında *SCD* geninin de bulunduğu 11 adet genin çekirdek promotör bölgeleri tanımlanmıştır. Araştırma sonucunda *SCD* geninin çekirdek promotör bölgesinde 41 adet transkripsiyon bağlanma bölgesi bulunduğunu ve toplam 25 adet transkripsiyon faktörünün bu bölgeye bağlanabildiğini tespit etmişlerdir. En fazla bağlanma bölgesinin *SP1* genine (8 adet) ait olduğu ve bunu takiben *C/EBPα* (6 adet bağlanma bölgesi), *ICSBP* ve *GATA-1* (3'er adet bağlanma bölgesi) genlerine ait birden fazla bağlanma bölgeleri olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2023). Elde edilen bulgular, *SCD* genin ifadesine etki eden birden fazla gen olduğunu göstermektedir ve *SCD* geninin yağ asidi sentezindeki görevinin daha net anlaşılması için bu genlerin birbirleriyle etkileşimlerinin de aydınlatılması oldukça önemlidir.

2.3.1.3. *LPL* geni (Lipoprotein lipase)

Lipoprotein lipaz (LPL) enzimi, yağ hücreleri, iskelet kası hücreleri ve kalp kası hücreleri tarafından sentezlenebilen suda çözünür bir enzimdir (Talpur vd., 2018). Çeşitli dokularda ifade edilen LPL enzimi, hücrel kullanımı için trigliseritlerden yağ asitleri ve gliserol üreterek yağ metabolizmasında görev alan önemli bir enzimdir (Nematbakhsh vd., 2021). Bu nedenle, dokulardaki yağ birikimini artırarak kas kütlesine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Talpur vd., 2018). Tavuklarda Z kromozomu üzerinde yer alan *LPL* geni, yaklaşık 17 kb uzunluğundadır ve genin 1458 bp'lik kodlama bölgesinden 485 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 396219).

Yağ asidi sentezi ve oksidasyonu, karaciğerdeki trigliserit birikiminin kontrolünde gerçekleşmektedir. Yağ sentezi ve yağ katabolizması (lipoliz) arasındaki denge sonucu dokularda yağ birikimi meydana gelmektedir. Dolayısıyla, yem içeriğiyle sağlanan yağ miktarı sabit tutulduğunda, dokularda düşük seviyede yağ birikimi gerçekleşmesinin sebebi, yağ katabolizmasının artması ya da yağ asidi sentezinin azalması olarak değerlendirilmektedir (Sanz vd., 2000; Zhao vd., 2010).

Tavuk embriyosunun toplam enerji ihtiyacının %90'ından fazlasının, yumurta sarısı lipidlerinden türetilen yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile sağlandığı bilgisinden yola çıkarak Zhao vd. (2010) tarafından tavuklarda embriyonik dönemde *LPL* gen ifadesi araştırılmıştır. Yağ asidi hidrolizinde görev alan *LPL* geninin iki etlik tavuk ırkının (yerli/abdominal yağ ağırlığı düşük ve ticari ırk/ abdominal yağ ağırlığı yüksek) embriyonik dönemlerinde karaciğer dokusundaki ifade seviyeleri ve kandaki trigliserit ve toplam kolesterol miktarları incelenmiştir. Elde edilen bulgulara, yerli tavuk ırkında *LPL* gen ifadesinin embriyonik dönem boyunca (E9, E14, E19) azaldığı ve hatta kuluçka çıkışında (H1) neredeyse tamamen durduğu tespit edilmiştir. Bunun aksine her iki ırkta da trigliserit miktarının azaldığı, toplam kolesterol ve esterleşmemiş yağ asitleri miktarının arttığı tespit edilmiştir. Araştırma bulguları, tavuklarda lipid metabolizmasının *LPL* geni bakımından henüz embriyonik dönemde planladığını göstermektedir. Ancak yağ asidi biyosentezi ve katabolizması bakımından farklılık tespit edilmemesi, ırk düzeyinde lipid metabolizması bakımından başka spesifik farklılıkların olabileceğine işaret etmektedir. Yine de her iki tavuk ırkının embriyonik dönemde

gösterdiği farklı *LPL* gen ifadesi seviyeleri, tavukların nihai olarak abdominal yağ miktarına etki edebileceği ileri sürülmüştür.

Tavuklarda aşırı yağ birikimi istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle kas içi yağ miktarı düşük ve yüksek olan tavuk popülasyonları arasındaki lipid metabolizmasında görev alan ajanların fonksiyonlarının belirlenmesi oldukça önemlidir. *LPL* enzimi trigliseridleri yağ asidi ve gliserol bileşenlerine ayırmaktan ve yağ depolanmasından sorumludur (Talpur vd., 2018). Xing vd. (2011) tarafından yapılan çalışma, *LPL* gen ifadesinin abdominal yağ dokusu miktarı üzerinde belirleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle etlik piliçlerde 56 ve 66 günlük yaşlarda rasyona eklenen %1’lik betainin (metil verici besin takviyesi) *LPL* geninin promotör bölgesindeki CpG dinükleotidlerindeki metilasyon profilini değiştirdiği saptanmıştır. Bu değişimin 66 günlük yaştaki bireylerde *LPL* gen ifadesini ve abdominal yağ dokusu miktarını önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). Elde edilen bulgular, yağ dokusu miktarının azaltılması için *LPL* gibi majör etkili genlerin metil verici yem katkı maddeleri ile düzenlenebileceğine işaret etmektedir.

Entansif tavukçulukta özellikle etlik piliçlerde ve damızlıklarda abdomen ve iç organlarında aşırı yağ depolanması kontrol edilmesi gereken önemli bir sorundur. Yüksek verimli modern etlik ırklar, hızlı büyüme özellikleri sebebiyle aşırı yağ depolama eğilimindeyken, yavaş gelişen genotiplerde bunun aksine abdominal yağ depolama özelliği daha azdır. Bu farklılık araştırmacıları yavaş ve hızlı gelişen genotiplerin lipid mekanizmasında görev alan genlerin ifade farklılıklarını araştırmaya yöneltmiştir. Konu ile ilgili D’Andre vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada genom çipi analizi ile hızlı ve yavaş büyüyen iki tavuk ırkının (8 haftalık yaşta) abdomen, derialtı, göğüs ve hipofiz bezi dokularındaki gen ifadesi farklılıkları araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, *LPL* geninin hızlı gelişen etlik ırkta sadece göğüs kası dokusunda ifadesinin azaldığını, diğer dokularda ifadesinin arttığını göstermiştir. Araştırma sonuçları *LPL*’nin tavuklarda lipid depolanması ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

Benzer bir çalışmada, hızlı ve yavaş gelişen iki tavuk ırkının göğüs ve bacak kası dokularında *LPL* gen ifadesi, *LPL* enzim aktivitesi ve kas içi yağ oranı incelenmiştir (Huang vd., 2016). Çalışma sonucunda, yaş ve ırkın *LPL* enzim aktivitesi ve gen ifadesi üzerine etkili olduğu, ayrıca her iki ırkın göğüs ve bacak kası dokularındaki kas içi yağ miktarıyla *LPL* gen ifadesi arasında orta-güçlü pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Diğer yandan yapılan bazı güncel çalışmalarda, *LPL* mRNA seviyesinin ve polimorfizmlerin tavukların göğüs kas dokusundaki kas içi yağ miktarıyla önemli seviyede ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2023). Baicheng-Oil (Çin’in yerli tavuk ırkı) ve ticari etlik tavuk ırkı üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada göğüs ve bacak kası dokularındaki kas içi yağ miktarı, *LPL* gen ifadesi ve polimorfizmleri araştırılmıştır. Baicheng-Oil tavuk ırkının her iki dokuda da önemli düzeyde daha fazla kas içi yağ miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, her iki tavuk ırkının *LPL* gen ifadesiyle kas içi yağ miktarı arasında güçlü bir pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Ayrıca bir SNP’nin (C12315T), göğüs ve bacak kası dokusundaki *LPL* gen ifadesi ve kas içi yağ miktarıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Son yıllarda transkriptom analizi sayesinde çeşitli biyolojik yollarda görev alan genler, miRNA'lar ve birbirleriyle olan etkileşimleri aydınlatılmıştır. Tavuklarda lipid metabolizması da üzerinde en fazla çalışılan konulardan biridir. Bu bağlamda, Çin'e özgü yerli bir tavuk ırkının (Gushi tavuk ırkı) abdominal yağ dokusunda ifade edilen mRNA ve miRNA ilişki analizinin incelendiği bir çalışmada (Zhai vd. 2023) *LPL* geninin 3 farklı miRNA (gga-let-7j-3p, gga-miR-200b-3p ve gga-miR-29b-3p) tarafından hedeflendiği tespit edilmiştir.

2.3.2. Tavuklarda büyüme ve gelişme üzerine etkili olan bazı genler

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda et ya da yumurta verimi gibi ekonomik verim karakterlerinin ortaya çıkmasında birden fazla genin görev aldığı tespit edilmiştir (Nematbakhsh vd., 2021). Büyüme ve kas gelişimi özellikleri de birden fazla gen (Miyojenik düzenleyici faktörler (MRF'ler), İnsülin benzeri büyüme faktörü 1/İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (*IGF I/IGF-IR*), miyostatin (*MSTN*) gibi) tarafından düzenlenmektedir (Liu vd., 2016; Zhu vd., 2016; Roelfsema vd., 2018; Goto vd., 2019). Modern moleküler biyolojinin gelişmesiyle birlikte, tavuk kas gelişimi özelliklerini düzenleyen çoklu genler arasında daha büyük etkiye sahip olan majör genlerin de mevcut olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2019a). Gen ifadelerinin incelenmesini hedefleyen (RT-qPCR ya da RNA dizileme teknikleri kullanılarak) bu çalışmalarda tavukların iskelet kası gelişimine ve et kalitesine etki eden genler, bu genlerin görev aldığı biyolojik yollar, genlerin birbirleriyle olan ilişkisi ve majör genlerin tespiti hedeflenmiştir (Chen vd., 2015; Kong vd., 2017; Zhang vd., 2017; Li vd., 2019b; Li vd., 2019c, Chen vd., 2019a; Chen vd., 2019b; Liu vd., 2019; Li vd., 2020; Nematbakhsh vd., 2021). Özellikle *MSTN*, *FOXO3* ve *CAPN3* genleri, iskelet kası büyümesi ve gelişmesi üzerine yapılan çalışmalarda odaklanılan kritik genler arasında yer almaktadır.

2.3.2.1. *MSTN* geni (Miyostatin)

Büyüme farklılaştırıcı faktör-8 olarak da adlandırılan *MSTN* geni, ağırlıklı olarak iskelet kası hücrelerinde ifade edilmektedir ve kanatlı hayvanlarda iskelet kası gelişiminin (kas lifi sayısı ve çapı) negatif düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Bonnieu vd., 2007; Bhattacharya vd., 2015; Dushyanth vd., 2016). Tavuklarda 7. kromozom üzerinde yer alan *MSTN* yaklaşık 7 kb uzunluğundadır ve 1128 bç'lik kodlama bölgesinden 375 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 373964). Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) ailesinin bir üyesi olan *MSTN*'nin, miyoblastların (öncül kas hücresi) çoğalmasını ve farklılaşmasını baskılayarak hücre döngüsünün G1'den S'ye ve G2'den M'ye geçişlerini kontrol ettiği ve kas gelişimini baskıladığı düşünülmektedir (Dushyanth vd., 2016). Daha önce yapılan çalışmalarda mutasyona uğratılan *MSTN*'nin, kanatlı hayvanlarda meydana gelen kas hiperplazisi (kas lifi sayısının artması) ile birlikte vücut ağırlığının önemli seviyede arttığı tespit edilmiştir (Lee vd., 2020). Bu nedenle *MSTN*, kanatlı hayvan ıslahı için üzerinde en çok çalışma yürütülen genlerden biri haline gelmiştir.

MSTN genindeki SNP'lerin tavukların büyüme ve gelişmesiyle doğrudan ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Zhu vd., 2007; Zhang vd., 2011; Bhattacharya. vd., 2015; Dushyanth vd., 2016; Zhang vd., 2019). Bu çalışmalarda

özellikle *MSTN* geninin ekzon bölgelerindeki polimorfizmler farklı tavuk ırklarının abdominal yağ dokusu ağırlığı, karkas yüzdesi, göğüs kası ağırlığı, göğüs kası yüzdesi ve vücut ağırlığı ile ilişkilendirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan *MSTN* geninde tanımlanan SNP'lerin genetik seleksiyon için aday markör olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tavuklarda et verimi en önemli ekonomik verim karakterlerinden biridir. Bu nedenle tavuklarda kas büyümesi her ne kadar istenen bir durum olsa da ticari hibritlerin hızlı ve aşırı büyümesi bazı kas kusurlarına da (beyaz çizgili kas, spagetti kas ya da odunsu kas gibi) sebep olabilmektedir (Tekeli vd., 2016; San vd., 2021). Diğer yandan kendine has et lezzeti ile bilinen bazı yerli tavuk ırklarının ekonomik değerinin artırılması kas büyümesi ve gelişmesinden geçmektedir. Bu nedenle tavuklarda istenen büyüme ve gelişmenin sağlıklı bir şekilde elde edilebilmesi için bu süreçte görev alan biyolojik yolların ve genler arasındaki dengenin hızlı/yavaş büyüyen ve etlik/yumurtacı tavuk ırklarında araştırılıp aydınlatılması oldukça önemlidir.

MSTN geninin yumurtacı ve etlik tavuk ırklarındaki gen ifadesi profillerinin incelendiği bir çalışmada (Bhattacharya vd., 2015), *MSTN* geninin cDNA dizisinde farklı SNP'lere sahip olduğu ve bu SNP'lerin farklı amino asitleri kodladığı bildirilmiştir. Ayrıca farklı tavuk ırklarının büyüme sürecinde (2, 4 ve 7 haftalık yaşlarda) farklı *MSTN* gen ifadesi sergiledikleri ve vücut ağırlığı ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

MSTN geni, öncül kas hücrelerinin farklılaşmasında ve çoğalmasında negatif düzenleyici rol oynamaktadır ve dolayısıyla karkas ağırlığı ile ilişkilendirilen polimorfizmlerin aslında *MSTN* geninde fonksiyon azalması ya da kaybına neden olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Bunu doğrulayabilmek için RNAi (shRNA) teknolojisiyle *MSTN* geninin susturulması üzerine pek çok çalışma yapılmıştır. Tripathi vd. (2012; 2013) tarafından yapılan çalışmalarda tavuk embriyosunun temel bağ dokusu hücrelerindeki (fibroblast) ve öncül kas hücrelerindeki *MSTN* geni, sırasıyla beş farklı shRNA (kısa saç tokası RNA dizileri) ve 7 farklı shRNA aracılığı ile %68 ve %55 oranında geçici olarak başarılı bir şekilde susturulmuştur. Bu girişimi takiben *MSTN* geninin susturulması ve karkas özellikleriyle ilişkilendirilmesi üzerine başka çalışmalar da yürütülmüştür (Bhattacharya vd., 2017; Bhattacharya vd., 2019). Ayrıca bu çalışmalarda sadece *MSTN* geni değil, bu genin reseptörleri de (*ACVR2A* ve *ACVR2B*) susturularak bacak kası, göğüs kası ve vücut ağırlığı üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek karkas ağırlığı özellikle *ACVR2B* reseptörünün susturulduğu tavuklarda tespit edilmiştir.

Benzer bir şekilde D10-Cas9 teknolojisi kullanılarak susturulan *MSTN* geni, tavuklarda göğüs ve bacak kas miktarlarında artışa neden olmuştur. Ancak *MSTN* geninde meydana getirilen bu delesyonun neden olduğu iskelet kası büyüme oranının ve kas lifi sayısındaki artış seviyesinin cinsiyete ve kas tipine göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Kim vd., 2020).

Tavuklarda büyüme ve gelişme, diyet içeriğindeki protein miktarı ile de oldukça yakından ilişkilidir. Bu konuda Kumaravel vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada Hindistan'nın et lezzeti ile bilinen Aseel yerli tavuk ırkının rasyonuna eklenen farklı miktarlarda ham protein içeriğine karşı gösterdiği *MSTN* gen ifadesi seviyesi, vücut

ağırlığı ve yemden yararlanma oranları incelenmiştir. Çalışmada 16 haftalık yaşa kadar %21 oranında ham protein kullanımının vücut ağırlığı artışında, göğüs kası dokusundaki *MSTN* gen ifadesinin azalmasında ve yemden yararlanma oranında önemli düzeyde etkili olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bulgulara göre; Aseel tavuk ırkı için 16 haftalık yaşa kadar uygulanacak 2800 kcal ME/kg izokalorik diyetteki %21 ham proteinin, vücut ağırlığı kazanımı ve yemden yararlanma oranı bakımından optimum büyüme performansı sağlayacağı bildirilmiştir.

2.3.2.2. *FOXO3* geni (Forkhead box O3)

Forkhead transkripsiyon faktörü ailesi (FOXO), büyüme ve gelişme sırasında birçok biyolojik yolakta görev alan, evrimsel olarak korunmuş bir transkripsiyon düzenleyici grup olarak tanımlanmaktadır. Forkhead ailesi üyelerinden biri olan *FOXO3* geninin yapılan çalışmalar sonucunda birçok türde hücre büyümesi ve farklılaşmasının engellenmesinde, hücre döngüsü kontrolü, enerji metabolizması, DNA hasar onarımı, oksidatif strese yanıt ve apoptoz gibi çeşitli hücresel işlevlerde çok önemli roller üstlendiği tespit edilmiştir (Tran vd., 2002; Kops vd., 2002; Sanchez vd., 2014; Chen vd., 2015; Gao vd., 2017; Xue vd., 2017; Chen vd., 2019b;). Diğer yandan *FOXO3* tarafından kodlanan proteinin, hem otofaji-lizozom hem de ubiquitin-proteazomal yollarının ana düzenleyicisi olduğu, bu nedenle protein bozulmasını teşvik ettiği ve böylece kas atrofisine (kas incilmesi veya kaybı) neden olduğu bildirilmiştir (Cao vd., 2013; Zhou vd., 2015). Tavuklarda 3. kromozom üzerinde yer alan *FOXO3*, yaklaşık 86 kb uzunluğundadır ve 1983 bç'lik kodlama bölgesinden 660 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 421769). Tavuklarda yapılan çalışmalarda *FOXO3*'ün birçok dokuda ifade edildiği ancak göğüs kası ve bacak kası dokularında daha yüksek oranda ifade edildiği bildirilmiştir (Van der Vos vd., 2011).

FOXO3 geninin tavuklarda kas büyümesi ve gelişmesi ile ilişkisinin daha iyi anlaşılması için Zhou vd. (2015) tarafından bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada ticari hibrit tavuk ırkı, yemden yararlanma oranlarına göre düşük ve yüksek olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Her iki grubun göğüs kası dokularındaki gen ifadesi seviyeleri transkriptom analizi ile tespit edilmiştir. Yemden yararlanma oranı yüksek olan tavuklarda *FOXO3* gen ifadesinin azaldığı, dolayısıyla bu tavukların göğüs kası dokusunda protein sentezinin yükselmiş, protein bozulmasının da azalmış olabileceği öne sürülmüştür. Diğer yandan, yemden yararlanma oranı yüksek tavuklarda bazı transkripsiyon faktörlerinin (*JunB* gibi), protein sentezini artırmak için miyozin (Kas hareketini üreten iplikçileri oluşturan protein) ifadesini uyarabileceğini, böylece kas kütlelerini koruyabileceğini ve hatta artırabileceğini bildirmişlerdir. Bir başka açıdan, *JunB*'nin, *FOXO3*'ün transkripsiyonunu baskılayabileceğini ve böylece kastaki protein bozulmasını engelleyebileceğini; bu nedenle, yemden yararlanma oranı yüksek olan tavuklarda *JunB* aktivasyonunun, tavukların göğüs kasındaki *FOXO3*'ün ifade seviyesinin azalmasına sebep olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu sonuçlar *FOXO3* mRNA profilinin, ilgilenilen dokudaki protein sentezi ya da bozulması hakkında bilgi verebileceği potansiyelini işaret etmektedir.

Hızlı ve yavaş büyüyen iki tavuk ırkının (Recessive White Rock WRR ve Xinghua tavuk ırkları) göğüs ve bacak kası dokularındaki *FOXO3* ifade seviyesinin incelendiği bir çalışmada, yavaş büyüyen tavuk ırkının iskelet kası dokularında daha fazla *FOXO3* ifade

edildiği bildirilmiştir (Chen vd., 2015). Dolayısıyla *FOXO3* geninin tavukların iskelet kaslarında yavaş büyüme performansına katkı sağlayabileceği belirtilmiştir. Önceki çalışmalarda *FOXO3*'ün, öncül kas hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasında görev alan *MYOD* geninin transkripsiyonunu aktive ettiği tespit edilmiştir (Hu vd., 2008). Dolayısıyla *FOXO3* gen ifadesinin azalması, *MYOD* gen ifadesini de azaltarak tavukların iskelet kaslarındaki büyümeyi yavaşlatmış olabileceği öne sürülmektedir (Chen vd., 2015).

Bir sonraki aşamada bu iki tavuk ırkının iskelet kaslarındaki *FOXO3* gen ifadesi farklılıklarının temelinde yatan miRNA'lar araştırılmıştır (Li vd., 2018). Araştırma sonucunda, hızlı büyüyen tavuklarda *FOXO3*'ün miR-142-5p tarafından hedeflendiği ve aşırı ifade edildiği durumlarda *FOXO3* ifade seviyesini önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, *FOXO3*'ün inhibe edilmesiyle kas kaybının önlenebileceğini, böylece kas kütlesinde bir kazanım elde edilebileceğini göstermektedir. Bu çalışma ile miR-142-5p tavuklarda iskelet kası büyümesinde önemli rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır. Bulgular, hızlı ve yavaş büyüyen tavukların farklı büyüme oranlarının temelini açıklamaya katkı sunmaktadır.

Diğer yandan, yapılan çalışmalarda sadece *FOXO3* gen ifadesi değil, bu gende bulunan bazı SNP'lerin de (rs317670452, rs15379317 ve C66716002T, C66716195T, A66716179G gibi) tavukların farklı yaşlardaki vücut ağırlığı ve göğüs kası ağırlığı gibi birçok büyüme ve karkas özellikleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2019b).

2.3.2.3. *CAPN3* geni (Calpain3)

Kalpainler, aktif olabilmek için Ca^{2+} 'a ihtiyaç duyan sitoplazmik sistein proteazlarıdır. Sinyal iletimi, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, membran füzyonu ve apoptoz gibi kalsiyum tarafından düzenlenen çeşitli hücresel süreçlerde görev almaktadırlar (Huang ve Wang, 2001; Sorimachi ve Suzuki, 2001). Yapılan çalışmalar, kalpainlerin, insanlardan mikroorganizmalara kadar tüm organizmalarda bulunan bir süper aile olduğunu göstermiştir (Suzuki vd., 2004). Bu enzimler sitozolde inaktif olarak bulunmakta ve artan hücresel Ca^{2+} seviyelerine yanıt olarak zarlardan geçiş yapmaktadırlar (Suzuki vd., 1995). *CAPN3*, kalsiyum bağımlı proteolitik sistemde yer alan, kas dokusuna özgü bir hücre içi proteazdır. Tavuklarda 5. kromozom üzerinde yer alan *CAPN3*, yaklaşık 25 kb uzunluğundadır ve 2433 bç'lik kodlama bölgesinden 810 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 423233). *CAPN3*'ün hücre iskeletinin şekillendirilmesi veya sinyal iletiminde yer alan proteinlerin (yani Desmin ve Vimentin) kataliz edilmesinde ve rejenerasyon süreçlerinde, ayrıca miyofibrillerin (kas dokusundaki protein iplikçikleri) organizasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Felicio vd., 2013; Pampouille vd., 2018). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *CAPN3*'ün ifade seviyesinin ve sahip olduğu polimorfizmlerin karkas özellikleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2012; Piorkowska vd., 2015; Kong vd., 2017; Pampouille vd., 2018).

Farklı tavuk ırklarının (ticari etlik ve yerli ırklar) *CAPN3* genindeki SNP polimorfizmlerinin karkas özellikleriyle ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Zhang vd., 2009), 8. ve 10. ekzonda yer alan iki SNP (sırasıyla 11818T>A ve 12814T>G) tespit edildiği ve 12814T>G polimorfizminin canlı vücut ağırlığı, karkas ağırlığı, göğüs kası ve

bacak kası ağırlığı ile önemli düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu iki SNP üzerinden oluşturulan 4 haplotipin (H1, TG; H2, TT; H3, AG ve H4, AT) karkas özellikleriyle ilişkili olduğu ve özellikle H1H4 ve H2H2 dihaplotipe sahip genotiplerin karkas özellikleri bakımından avantajlı olabileceği bildirilmiştir (Zhang vd., 2009). Bu çalışma ile *CAPN3*'ün karkas özellikleri bakımından hem majör etkili gen olduğu hem de seleksiyonda belirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

CAPN3 geninin doku spesifikliğini ve büyüme sırasındaki ifade profilini araştırmak için yapılan bir çalışmada (Zhang vd., 2012), Çin'in yerli bir tavuk ırkı ve ticari tavuk ırkının farklı yaş dönemlerinde (yerli ırk için 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 haftalık yaş, ticari için 10 haftalık yaş) ve farklı dokularında (göğüs kası, bacak kası, kap, beyin, karaciğer) gen ifadesi analizi gerçekleştirilmiştir. Yerli tavuk ırkında büyüme boyunca beyin dokusu hariç diğer dokularda *CAPN3* gen ifadesinde bir hafta artma diğer hafta azalma şeklinde bir gen ifadesi profili tespit edilmiştir. Diğer yandan göğüs ve bacak kası dokularında diğer dokulara kıyasla daha fazla gen ifade edildiği saptanmıştır. Ancak 10 haftalık yaşta ticari ırkın tüm dokularında hibrit ırka kıyasla daha fazla gen ifadesi tespit edilmiştir (Zhang vd., 2012).

Piorkowska vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada hızlı ve yavaş büyüyen iki tavuk ırkının göğüs kası dokusunda *CAPN3* geninin promotör ve 3'UTR bölgesinde 4 adet polimorfizm (promotör bölge için SNP g.322176G>A, 3'UTR için SNP c.176*C>T, SNP c.144*G>C ve bir adet delesyon CAGCCCTGCTT - c.137*_147*del) tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizlerle (TFSearch ver. 1.3 ve The rVista 2.0) bu bölgelerde meydana gelen dizi değişikliğinin bazı transkripsiyon faktörlerinin (p-300 proteini, ADR1, AP-1 SMAD4, LFA1) bağlanmasına engel olabileceği saptanmıştır. Ancak *CAPN3* gen ifadesi analizi sonrasında, bu polimorfizmlerin gen ifadesi seviyesi üzerinde bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmanın hızlı ve yavaş büyüyen iki tavuk ırkında gerçekleştirildiği dikkate alındığında, başka transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasıyla *CAPN3* gen ifadesinin sürdürülmüş olabileceği sonucuna varılmıştır (Piorkowska vd, 2014).

Sonraki yıllarda yem takviyelerinin *CAPN3* gen ifadesi üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri Çin'de son yıllarda oldukça popüler hale gelen yerli bir tavuk ırkında (Three-yellow tavuk ırkı) gerçekleştirilmiştir (Xue vd., 2022). Bir günlük yaşta 4 gruba ayrılan civcivler 70 gün boyunca 4 farklı yem ile beslenmiştir. Göğüs ve bacak kası dokularından yapılan *CAPN3* geninin ifade analizine göre organik selenyum (0.2 mg/kg maya-selenyum) ve/veya yüksek miktarda etkili mikroorganizma kullanımının (%5 *Lactobacillus* ve maya) *CAPN3* gen ifadesini artırdığını ve bununla beraber göğüs kası dokusunda *CAST* geninin (kalpain inhibitörü) ifadesini azalttığı tespit edilmiştir. Uygulanan bu yem içeriğinin kas lifi yoğunluğunu artırdığı ancak bunun yanında et gevrekliği ile negatif ilişkili olan lif çapını azalttığı saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında uygulanan rasyon içeriği, *CAPN3* gen ifadesini artırarak kas lifi çapını azalttığı, dolayısıyla et gevrekliğini ve et kalitesini artırdığı sonucuna varılmaktadır.

2.3.3. Tavuklarda et lezzeti üzerine etkili olan bazı genler

Et kalitesi sadece önemli bir ekonomik özellik değil, aynı zamanda hayvancılık üretiminde en kapsamlı değerlendirilen özelliklerinden biridir (Huang vd., 2022a). Son yıllarda tüketicilerin daha lezzetli tavuk ürünleri arayışına girmeleri, yetiştiricilerin yalnızca et verimine değil, et kalitesi ve lezzeti üzerine de yoğunlaşmalarının bir sonucudur. Et kalitesinin artırılmasına yönelik çalışmaların büyük çoğunluğu bazı biyokimyasal bileşiklerin kas dokularında üretilmesi ve depolanması süreçlerinin araştırılması üzerine gerçekleştirilmiştir (Yan vd., 2018; Kubota vd., 2019). Çalışmalar, etteki umami tadın, amino asitler (özellikle glutamik asit), inozin monofosfat (IMP) ve kas içi yağ miktarı ile yakından ilişkili olduğunu ve IMP içeriğinin etteki lezzet indeksi olarak kabul edilebileceğini ortaya çıkarmıştır (Huang vd., 2022a).

Et kalitesini etkileyen en önemli faktör olarak kabul edilen lezzet et aroması, umami ve aroma özellikleri ile karakterize edilmektedir. Umami tadın oluşumunda oldukça önemli bir role sahip olan IMP miktarı, et kalitesi ve tazeliğinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Blonde ve Spector, 2017; Gabriel vd., 2018). IMP biyosentezinin oldukça karmaşıktır ve birçok genin görev aldığı bildirilmiştir (Yan vd., 2018). Bu genlerden *ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8* ve *ATIC* genlerinin IMP biyosentezinde önemli roller üstlendikleri tespit edilmiştir (Zhang vd., 2018a; Zhang vd., 2020, Huang vd., 2022a).

2.3.3.1. *ADSL* geni (Adenilosüksinat liyaz)

ADSL geni tarafından kodlanan adenilosüksinat liyaz enzimi (*ADSL*), IMP sentezinde görev alan anahtar bir enzimdir (Huang vd., 2022a). Pürin nükleotidlerinin de novo sentezinde ve kas dokularında ATP/AMP (Adenozin trifosfat/ Adenozin monofosfat) oranının korunmasında önemli rol oynamaktadır.

Pürin nükleotidleri, enerji üretmek için kullanılan ATP'nin sentezine katılmaktadır. Bu nedenle, *ADSL* geni en fazla kas dokularında ifade edilmektedir (Xueyu vd., 2010; Lundy vd., 2010; Yuan vd., 2011; Xu, 2011; Huang vd., 2015; Yan vd., 2018; Zhang vd., 2018a; Kubota vd., 2019). Tavuklarda 1. kromozom üzerinde yer alan *ADSL*, yaklaşık 16 kb uzunluğundadır ve 1458 bç'lik kodlama bölgesinden 485 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 396540). Yapılan çalışmalar sonucunda tavuklarda embriyonik dönemden erişkin döneme kadar *ADSL* geninin ifadesinin kademeli olarak arttığı tespit edilmiştir (Kmoch vd., 2000; Huang vd., 2022a). Ayrıca tavukların kas dokusundaki IMP miktarıyla *ADSL* mRNA seviyesi ve gen polimorfizmleri arasında da önemli bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Ma vd., 2015; Zhang vd., 2018a).

Shu vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada Çin'in koruma altındaki 4 yerli tavuk ırkının (Silkies, Baier, Tibetan ve Xiaoshan) ve bir ticari ırkın (Recessive White) 12 haftalık yaşta göğüs kası dokusundaki IMP miktarı ile *ADSL* genindeki (2. ekzonda 3484C/T nükleotid pozisyonunda) polimorfizmlerin ilişkisi araştırılmıştır. Çalışılan tüm tavuk ırklarında homozigot genotipteki (TT) tavukların göğüs kası dokularında daha fazla IMP tespit edildiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan, ırk ya da ırk*genotip

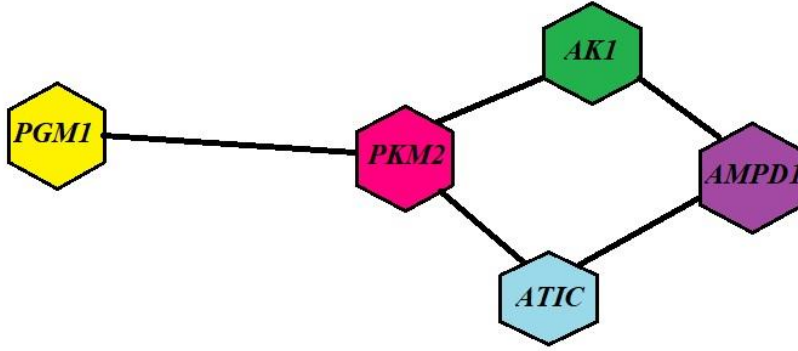
interaksiyonunun IMP miktarı üzerine etkisi olmadığı, bu nedenle tespit edilen SNP'nin doğrudan IMP miktarı ile ilişkilendirilebileceği ileri sürülmüştür.

Ma vd. (2015) tarafından Rugao tavuk ırkı üzerinde yapılan bir çalışmada *ADSL* geninin IMP biyosentezinde yer aldığı, ayrıca alanin-aspartat-glutamat ve pürin metabolizmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, *ADSL* gen ifadesinin bacak kası dokusundaki IMP miktarıyla pozitif ilişkili olduğu ve *ADSL* geniyle pozitif ilişkili olan diğer genlerin dolaylı da olsa IMP biyosentezini etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

Tavuklarda hızlı büyümenin en önemli dezavantajı ette meydana gelen kalite kusurlarıdır ve büyüme aynı hızda devam ederken kaliteyi korumak günümüzde hala bir zorluk olarak bildirilmektedir. Serbest yetiştiricilik sistemleri, sahip olduğu gezinme alanlarıyla tavuklarda daha düşük deri altı yağı ve daha düşük abdominal yağ birikimi sağlamaktadır. Bu nedenle gezen tavukların kafes sisteminde yetiştirilen tavuklara kıyasla daha üstün et gevrekliği ve et lezzetine sahip olduğu ileri sürülmektedir (Zhang vd., 2018a). Yetiştirme sistemlerinin et kalitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada tavukların (Lueyang black-bone tavuk ırkı) yetiştirildiği sistemlerin (serbest ve kafes) IMP miktarı ve IMP biyosentezinde görev alan genlerin ifade seviyeleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Özellikle market yaşı olarak belirtilen 120 günlük yaşta serbest yetiştiricilik sistemindeki tavukların hem bacak hem de göğüs kaslarında daha fazla IMP içerdiği tespit edilirken, bacak kaslarındaki *ADSL* gen ifadesinin serbest yetiştiricilik sisteminde yetiştirilen tavuklarda önemli düzeyde daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2018a).

2.3.3.2. *AMPD1* geni (Adenozin monofosfat deaminaz)

AMPD, kas dokularında AMP'nin hidrolik deaminasyonunu katalize ederek ATP'den IMP sentezlenmesinden sorumlu olan önemli bir enzimdir (Hu vd., 2015). AMPD enzimi üç gen (*AMPD1*, *AMPD2* ve *AMPD3*) tarafından kodlanmaktadır (Huang vd., 2022a). Tavukta 26. kromozom üzerinde yer alan *AMPD1*, yaklaşık 10 kb uzunluğundadır ve 2232 bç'lik kodlama bölgesinden 743 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 772125). Enerji metabolizmasında önemli bir rol oynayan *AMPD1* geni, iskelet kaslarında yüksek seviyede ifade edilmektedir. Bu gen, iskelet kası hücrelerinde ve kırmızı kan hücrelerinde ifade edilmediğinde, metabolik kas hastalığının ortaya çıktığı bildirilmiştir (Li vd., 2007; Huang vd., 2022a). Yapılan çalışmalarda *AMPD1* geninin, *AK1* ve *ATIC* genleri ile doğrudan ilişkili olduğu ve tavukların iskelet kaslarındaki IMP depolanmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Şekil 2.3) (Yan vd., 2018; Huang vd., 2022a). Ayrıca *AMPD1*'in IMP sentezindeki önemli rolü nedeniyle tavukların iskelet kaslarındaki IMP içeriği üzerine birçok çalışma yürütülmüştür (Xueyu vd., 2004; Shu vd., 2007, Shu vd., 2010; Hu vd., 2015; Yan vd., 2018; Zhang vd., 2018a; Gai vd., 2023).



Şekil 2.4. Jingyuan tavuk ırkının göğüs ve bacak kaslarındaki IMP'nin spesifik birikimini düzenleyen anahtar proteinlerin etkileşim analizi (Huang vd., 2022b'den uyarlanmıştır)

Etteki umami tadın büyük oranda IMP'den kaynaklandığının ortaya çıkarılması, araştırmacıları et lezzetiyle bilinen yerli ırkların IMP biyosentezine ve bu biyosentezde görev alan moleküler ajanları keşfetmeye yöneltmiştir. Bu yönelim hem hızlı büyüme nedeniyle düşük et kalitesine sahip ticari tavuk ırklarını ıslah edebilmek hem de yerli ırkların et kalitesi özelliklerini geliştirmek için oldukça önemlidir. Bu çalışmalardan biri Hu vd. (2015) tarafından Çin'in yerli tavuk ırklarından biri olan, yüksek protein içeriği, düşük yağ ve su tutma kapasitesine, ayrıca iyi bir tat ve aromaya sahip olduğu bildirilen Lingshan tavuk ırkında yapılmıştır. Çalışmada 60 günlük yaştaki yerli tavuk ırkının ve ticari tavuk ırkının (Fast partridge) göğüs kası dokusundaki IMP miktarı ile *AMPD1* gen polimorfizmleri ilişkilendirilmiştir. Lingshan tavuk ırkının göğüs kası dokusunun ticari hibritten önemli düzeyde daha fazla IMP içerdiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). Ayrıca her iki ırkın dişi bireylerinin göğüs kası dokusunda daha fazla IMP olduğu saptanmıştır (Lingshan tavuk ırkı için $P<0.05$). *AMPD1* geninin kodlanan bölgesinde 3 adet SNP (g.4064G/A (ekzon 2), g.5573A/G (ekzon 6) ve g.6805G/A (ekzon 8)) tespit edildiği ancak, 3 SNP için de amino asit dizisinde bir değişiklik meydana gelmediği tespit edilmiştir. Ancak, g.6805G/A polimorfizmi için, her iki tavuk ırkında farklı homozigot bireylerin (Lingshan tavuk ırkı için AA ve ticari tavuk ırkı için GG) daha fazla IMP içerdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, her iki tavuk ırkı için de sadece g.6805G/A nükleotid değişiminin IMP miktarıyla önemli düzeyde ilişkili olduğu saptanmıştır ($P<0.05$).

Tavukların et kalitesi ve lezzetini artırmak için uygulanan nükleik asit takviyesinin kas dokularında IMP miktarını etkileyebileceği bildirilmiştir (Wang vd., 2014). Bu bilgiler ışığında yapılan bir çalışmada (Yan vd., 2018), etlik piliçlerde IMP takviyesinin büyüme performansı ve lezzet ile ilgili bileşikler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yeme farklı oranlarda IMP eklenmiştir. Rasyona eklenen IMP miktarının, göğüs kasındaki serbest amino asitler (FAA) ($P<0.05$) ve aroma verici amino asitler (DAA- Asp, Glu, Gly ve Ala gibi) ($P<0.001$) bakımından önemli etkileri olduğu tespit edilmiştir ve bacak kası dokusunda en yüksek FAA ve DAA içeriğinin %2'lik IMP takviyesiyle sağlandığı bildirilmiştir. Diğer yandan göğüs kası dokusu için en yüksek *AMPD1* gen ifadesi, %2'lik IMP takviyesinde tespit edilmiştir. IMP takviyesinin (%2-3) piliçlerin büyüme performansına bir katkısı olmadığı, ancak et lezzetinin geliştirilmesi için umut verici olduğu vurgulanmıştır (Yan vd., 2018).

Zhang vd. (2018a) tarafından tavukların yetiştirme sistemlerinin göğüs ve bacak kası dokularındaki IMP miktarı ve *AMPD1* gen ifadesi üzerine etkisi incelenmiştir. Serbest yetiştiricilik sisteminde yetiştirilen 60 günlük yaştaki piliçlerin göğüs kası dokusundaki IMP miktarının, kafes sisteminde yetiştirilen piliçlere kıyasla daha fazla olduğu, ancak bacak kası dokusundaki IMP miktarının daha az olduğu tespit edilmiştir. Serbest yetiştiricilik sisteminde yetiştirilen tavukların her iki kas dokusundaki IMP miktarının 120 günlük yaşta daha fazla olduğu bildirilmiştir. Yetiştirme sistemleri arasında *AMPD1* gen ifadesi seviyesi bakımından 60 günlük yaşta önemli bir fark olmadığı, ancak 120 günlük yaşta serbest yetiştiricilik sisteminin bacak kası dokusundaki *AMPD1* gen ifadesini önemli düzeyde arttığı tespit edilmiş. Bacak kası dokusunda saptanan IMP miktarı ile *AMPD1* ifadesinin paralel bir şekilde artış göstermesi, bu genin dokularda IMP birikimiyle yakından ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda, dokularda biriken IMP miktarının, dondurulmuş tavuk ürünlerinin tazeliği üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Tavukların kesildikten sonra depolanma sürecine geçildiğinde ATP'nin kademeli olarak bozunmasıyla birlikte hızlı bir şekilde IMP sentezi meydana geldiği ve en üst noktaya ulaştığında azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Yüksek IMP miktarı etin iyi bir tazelik göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak, IMP'nin bozunmasıyla birlikte ortaya çıkan bazı metabolitlerin (ksantin ve ürik asit) etin tazelik kaybına neden olduğu bilinmektedir (Felicia vd., 2023). Bu nedenle, etin depolanma sürecinde maruz kaldığı sıcaklık ve depolanma süresinin IMP miktarını azaltabildiği ve bu durumun etin tazeliğini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (Huang vd., 2022a). Dolayısıyla IMP sentezinde görev alan genlerin ifade seviyesi ve sahip olduğu polimorfizmler de etin tazeliği üzerinde etkili olabilmektedir.

Yu vd. (2021) tarafından 8 haftalık yaştaki Qingjiaoma ırkı piliçlerin 60 gün boyunca -20 °C'de dondurulmasının, göğüs kası dokusundaki K değerine (ATP bozunmasıyla açığa çıkan metabolitlerin oranı) ve IMP miktarına etkisi ile *AMPD1* genindeki polimorfizmlerinin ilişkilendirilmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. *AMPD1* geninin promotör bölgesinde tespit edilen bir SNP'nin (c. -905G>A) tavuk eti tazeliğiyle ilişkili olduğu ve AA homozigot piliçlerin diğer genotiplere kıyasla (GG ve AG) daha düşük K değerine (yüksek tazelik) sahip olduğu tespit edilmiştir (P<0.001 ve P<0.05). *AMPD1* geninin promotör bölgesinde saptanan SNP'nin transkripsiyon bağlanma bölgesinde yer aldığı, bu nedenle farklı transkripsiyon faktörlerinin bağlanma afinitesini değiştirebileceği bildirilmiştir. Böylece *AMPD1* gen ifadesinin ve IMP miktarının artabileceği ileri sürülmüştür. Dolayısıyla da bu durumun etin tazeliğini belirleyen K-değerine etki edebileceği sonucuna varılmıştır (Yu vd., 2021).

Beijing-You tavuk ırkının et lezzetini ve et kalitesini düzenleyen metabolitlerin ve moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması için Gai vd. (2023) tarafından transkriptom ve metabolom analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı büyüme dönemlerinde (1, 56, 98, 120 günlük yaşlarda) toplanan göğüs kası dokularından elde edilen sonuçlarda *AMPD1* geninin de dahil olduğu 17 genin IMP biyosentezinde görev alan güçlü aday genler oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca doku örneklerinde tespit edilen IMP miktarı artışı ile *AMPD1* gen ifadesi artışı arasında güçlü bir korelasyon (0.65) olduğu saptanmıştır.

2.3.3.3. *AK1* geni (Adenilat kinaz)

Hem hayvanlarda hem de bitkilerde yaygın olarak bulunan adenilat kinaz (AK) enzimi, adenin nükleotid metabolizmasını düzenleyen ve hücrenin enerji dengesinin korunmasında önemli bir rol oynayan monomerik bir enzimdir. Yapılan çalışmalar sonucunda AK enziminin apoptoz ile de yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2020). Bugüne kadar AK geninin üç alt tipi tanımlanmıştır ve tavuklarda 17. kromozom üzerinde yer alan *AK1* geni, yaklaşık 5 kb uzunluğundadır ve 585 bç'lik kodlama bölgesinden 194 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 396002).

AK1 enzimi iskelet kaslarındaki hücrelerin sitoplazmasında yer alan temel AK alt tipi enzimlerden biridir (Tananbe vd., 1993) ve iskelet kaslarında hücre dışı adenin nükleotid havuzlarının düzenlenmesinden sorumludur (Rengaraj vd., 2013). Ayrıca, eşey hücrelerinin gelişimi için gerekli olan enerjinin karşılanması için ATP, ADP ve AMP gibi nükleotidlerin sentezinde görev aldığı (Rengaraj vd., 2013) ve hücre sinyal iletimini kontrol ettiği öne sürülmektedir (Choo vd., 2008). Yapılan çalışmalarda tavukların göğüs kaslarında, bacak kaslarına kıyasla *AK1* geninin anlamlı seviyede daha fazla ifade edildiği ve kaslardaki IMP miktarı ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır (Zhang vd., 2020; Huang vd., 2022b). Sonuç olarak, *AK1* geninin IMP depolanmasını pürin metabolizması yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak düzenlediği ifade edilmiştir (Huang vd., 2022b; Gai vd., 2023).

Çin'in koruma altına alınan tavuk ırklarından biri olan Jingyuan tavuk ırkının, amino asit ve yağ asitleri bakımından zengin olduğu ve "sağlıklı beslenme" niteliğinde ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir. Bu bağlamda Zhang vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada Jingyuan tavuk ırkının dişi ve erkek bireylerinin (180 gün yaş) göğüs ve bacak kası dokusundaki IMP biyosentezinde görev alan genler araştırılmıştır. Hem dişi hem de erkek bireylerin göğüs kaslarındaki IMP miktarının bacak kaslarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra yüksek IMP içeren göğüs kası ve düşük IMP içeren bacak kası dokularından izole edilen RNA'larda transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda *AK1* geni, iki grup arasında farklı ifade edilen genlerden biri olarak tanımlanmıştır ve pürin metabolik yolağında görev aldığı tespit edilmiştir. Gen ontolojisi analizinde *AK1*'in 35 moleküler fonksiyona ve 12 biyolojik sürece dahil olduğu saptanmıştır. Farklı ifade edilen genler arasındaki protein ilişki analizi sonucunda *ADSL*, *AMPD1* ve *AK1*'in de dahil olduğu 20 proteinin pürin metabolizmasında interaksiyon halinde olduğu bildirilmiştir. Son olarak dişi bireylerin hem göğüs hem de bacak kası dokusundaki IMP miktarıyla *AK1* gen ifadesi seviyesinin orta-güçlü pozitif korelasyon (sırasıyla 0.534 ve 0.538) gösterdiği bildirilmiştir ($P < 0.05$). Sonuçlar, *AK1* geninin aday belirteç gen olma potansiyeline sahip olduğunu ancak oldukça karmaşık olan ilgili biyolojik yollarının daha fazla aydınlatılması gerektiğini işaret etmektedir.

Zhang vd. (2020) tarafından yapılan çalışmanın devamı niteliğinde olan bir başka çalışmada, Jingyuan tavuk ırkının IMP mekanizmasının aydınlatılması için proteomik yaklaşımdan faydalanılmıştır (Huang vd., 2022b). Aynı şekilde 180 gün yaştaki tavukların göğüs ve bacak kası dokularındaki IMP ve önemli aday proteinlerin miktarları araştırılmıştır. Göğüs kası dokusunda *AK1* protein ifadesinin arttığı, ancak bacak kası dokusunda azaldığı tespit edilmiştir. Göğüs kası dokusunda tespit edilen IMP içeriği,

artan AK1 protein ifadesiyle tutarlı bulunmuştur. Buna ek olarak, AK1 proteininin, ADP birikimi ve metabolizmasında işlevsel olarak yer aldığı ve dolayısıyla pürin metabolizması yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak IMP birikimini düzenlediği ifade edilmiştir.

2.3.3.4. *ENTPD8* geni (Ektonükleosit trifosfat difosfohidrolaz 8)

Ektonükleosit Trifosfat Difosfohidrolaz 8 enzimi, *ENTPD8* geni tarafından kodlanan, hücre dışı nükleotidlerin konsantrasyonunda merkezi bir rol oynayan, nükleotidlerin gama ve beta-fosfat kalıntılarının hidrolizini katalize eden bir enzimdir (Huang vd., 2022a). Tavuklarda 17. kromozom üzerinde yer alan *ENTPD8* geni, yaklaşık 9 kb uzunluğundadır ve 1482 bç'lik kodlama bölgesinden 493 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 374095). Yapılan çalışmalarda *ENTPD8*'in IMP metabolizmasında yer alan birçok geni düzenlediği bildirilmiştir (Corfu vd., 1990; Zhang vd., 2018a; Huang vd.; 2022a). Özellikle tavukların bacak kasında yapılan çalışmalarda *ENTPD8*'in yaşla birlikte ifadesinin arttığı ve bu genin IMP de novo sentezinin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Ma vd., 2015; Zhang vd., 2018a).

Çin'in yerli tavuk ırklarından biri olan Rugao tavuk ırkı, etinin taze ve gevrek olmasının yansira yüksek stres direncine sahip bir ırk olarak tanımlanmıştır (Ma vd., 2015). Bu nedenle Rugao tavuk ırkının bacak kası dokusundaki IMP biyosentezinde görev alan genler ve biyolojik yolları zaman serisi mikrodizi analizi kullanılarak araştırılmıştır. Büyüme dönemi boyunca (2, 4, 6, 8, 10, 12 haftalık yaş) toplanan doku örneklerinde yapılan analiz sonucunda *ENTPD8* geninin IMP sentezi, ayrıştırılması ve kullanımına doğrudan katıldığı, ayrıca pürin ve pirimidin nükleotid metabolizmalarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. *ENTPD8* geninin IMP kurtarma yolağına (ITP kataliziyle önce IDP ve sonra IMP sentezi) pozitif ilişkili olarak dahil olan bir dizi gen (151 adet) tespit edilmiştir ve bu genlerden bazıları dolaylı ya da doğrudan transkripsiyon düzenleyici faktörler olarak tanımlanmıştır. Bu durum, *ENTPD8*'in birçok gen tarafından düzenlenebileceğini ve bu genlerin IMP metabolizmasıyla korelasyon gösterebileceği ileri sürülmüştür. Son olarak IMP biyosentezinin *ENTPD8* aracılığıyla karmaşık bir düzenleyici ağ tarafından etkilendiği sonucuna varılmıştır.

Zhang vd. (2018a) tarafından yapılan bir çalışmada *ENTPD8* gen ifadesinin serbest yetiştiricilik sisteminde yetiştirilen tavuklarda 120 günlük yaşta bacak kası dokusunda ciddi bir artış gösterdiği (kafes sistemine göre 16 kat) tespit edilmiştir. Bacak kası dokusundaki IMP miktarıyla birlikte değerlendirildiğinde *ENTPD8* geninin IMP ile ilişkili diğer genleri IMP kurtarma yolağı üzerinden düzenlediği ve bu yolla iskelet kaslarını etkilediği bildirilmiştir.

2.3.3.5. *ATIC* geni (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/imp cyclohydrolase)

ATIC enzimi IMP'nin de novo sentezinde görev alan tek bifoksiyonel enzimdir. Hem AICART (Aminoimidazol Karboksamid Ribonükleotit Transformilaz), hem de IMPC (IMP Siklohidrolaz) enzimlerinin katalitik aktivitesine sahiptir ve *ATIC* (*purH*) geni tarafından kodlanmaktadır (Huang vd., 2022a). Tavuklarda 7. kromozom üzerinde

yer alan *ATIC* geni, yaklaşık 18 kb uzunluğundadır ve 1782 bç'lik kodlama bölgesinden 593 amino asit kodlanmaktadır (NCBI Gen ID: 396091). *ATIC*, IMP sentezinde önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır (Huang vd., 2022a).

Shu vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada beş farklı tavuk ırkının (Recessive White, Silkies, Baier, Tibetan ve Xiaoshan) 12 haftalık yaşta göğüs kası dokusundaki IMP miktarıyla *ATIC* gen polimorfizmi arasındaki ilişki araştırılmıştır. *ATIC* geninde tespit edilen iki SNP'den (ekzon 9'da 8023 nükleotid pozisyonunda A/T değişimi ve ekson 16'da 17446 nükleotid pozisyonunda T/C değişimi), T17446C polimorfizminin IMP içeriği ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında *ATIC* geninin aday bir belirteç olduğu veya kas dokusunda IMP içeriğini etkileyen majör bir gene bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer bir çalışmada Baier tavuk ırkında tespit edilen aynı SNP'nin, *GPAT-AIRC* geninde tespit edilen SNP ile birlikte IMP miktarı üzerinde daha yüksek bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Shu vd., 2010).

Ma vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada zaman serisi mikro dizi analiziyle tavukların bacak kası dokusunda ifade edildiği tespit edilen ve IMP sentezi, ayrıştırılması ve kullanımı ile ilişkilendirilen genlerden biri de *ATIC*'dir. *ATIC* geninin IMP biyosentezinde 3 farklı genle birlikte ifade edildiği tespit edilmiştir. Gen ontolojisi analizi sonucunda *ATIC* geninin 1C metabolizmasında (one carbon pool by folate) ve pürin metabolizmasında yer aldığı bildirilmiştir.

Zhang vd. (2018a) tarafından yapılan bir çalışmada, Lueyang black-bone tavuk ırkında *ATIC* geninin serbest yetiştiricilik sisteminden 60 ve 120 günlük yaşlarda önemli seviyede etkilendiği tespit edilmiştir. Serbest yetiştiricilik sisteminin IMP sentezinde yer alan enzimlerin ifade seviyelerini iyileştirdiğini, dolayısıyla tavuklarda IMP'nin de novo sentezini hızlandırdığını bildirmişlerdir.

Yan vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada tavukların rasyonuna eklenen %2'lik IMP takviyesinin bacak kası dokusunda *ATIC* gen ifadesini önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Huang vd. (2022b) tarafından 180 günlük yaşta Jingyuan tavuk ırkının bacak ve göğüs kası dokularında yapılan proteomik analizi sonucunda *ATIC* proteinin bacak kası dokusunda yüksek seviyede (2.56 kat) ifade edildiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). *ATIC* proteinin doğrudan ya da dolaylı olarak IMP sentezi ve katalizinde görev aldığı ve bu nedenle Jingyuan tavuk ırkının bacak kası dokusunda IMP depolanmasını düzenleyen anahtar bir protein olabileceği sonucuna varılmıştır.

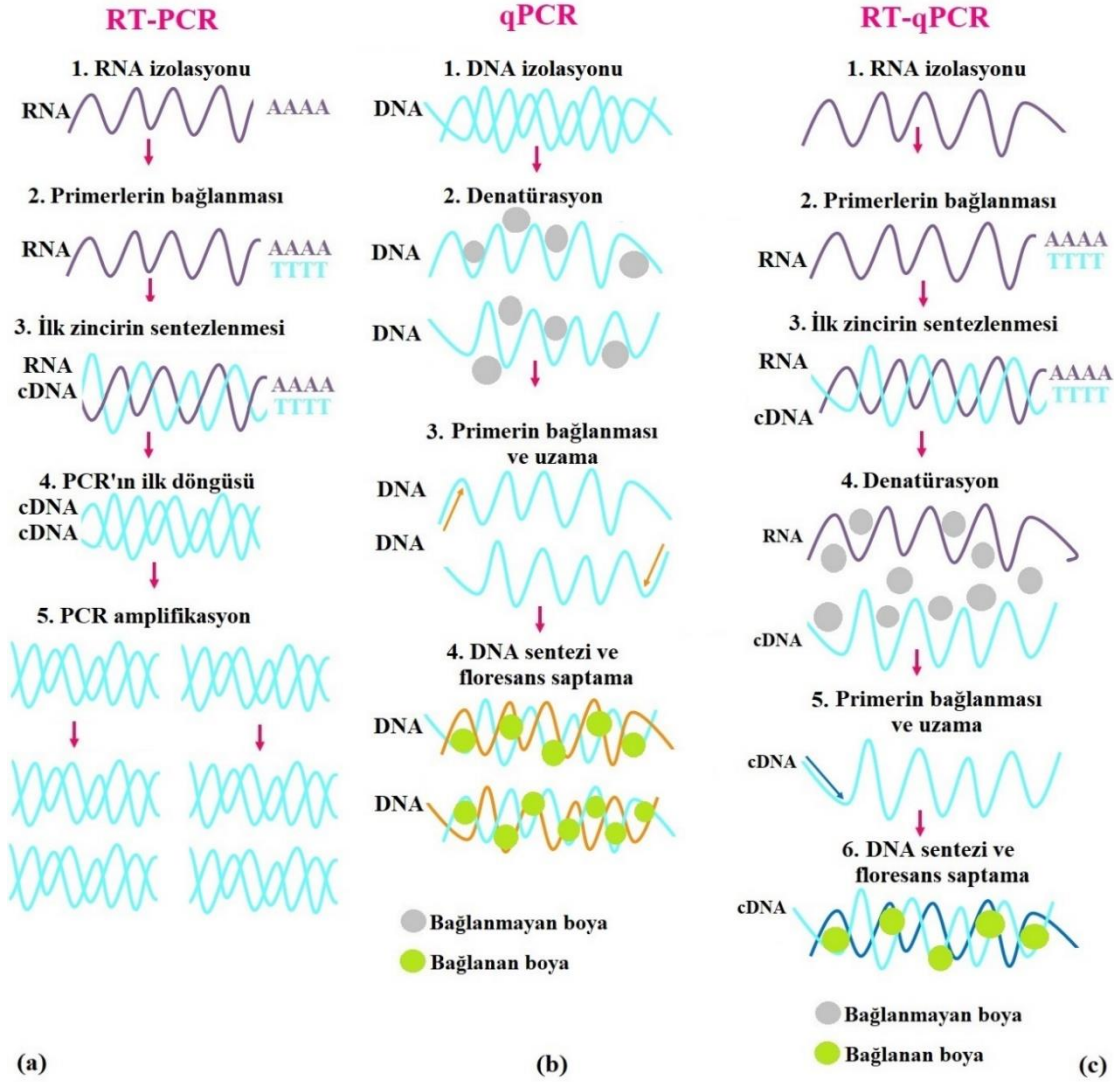
2.4. Gen İfadelerinin Belirlenmesinde Kullanılan RT-qPCR Analizi

Genler, fonksiyonel bir ürün üretebilen DNA dizisinin tanımlanmış bölümleridir. Bunlar belirli enzimler tarafından okunarak mesajcı RNA'ya ("mRNA") aktarılmaktadır (transkripsiyon) ve ardından mRNA dizisinin bir amino asit dizisine (protein) translasyonu gerçekleşmektedir. Genlerin transkripsiyon ve translasyon seviyeleri, hücreden hücreye ve ayrıca ilgili hücre tipinin farklılaşma/aktivasyon durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca, ortaya çıkan gen ürünlerinin miktarı yalnızca ilgili

hücre tipindeki dahili faktörlere değil, aynı zamanda hücresel mikro-çevredeki çok sayıda faktöre bağlıdır. Gen ifadesinin gücü, bir numune içerisinde belirli bir zamanda kaç tane transkripsiyon ürününün mevcut olduğu belirlenerek ölçülebilmektedir. Bu amaçla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de RT-qPCR'dır (Ters Transkripsiyon-Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) (Krause vd., 2021).

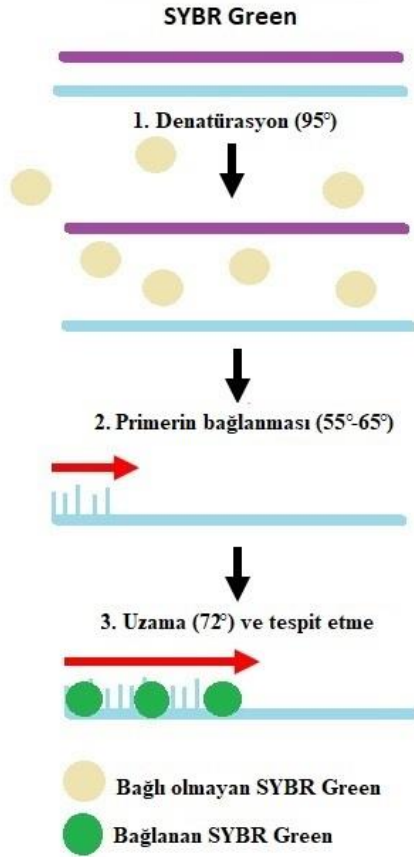
RT-PCR, qPCR ve RT-qPCR arasındaki kavram karmaşasını ortadan kaldırmak için Bustin vd, (2009) tarafından "*The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*" isimli bir makale yayınlanmıştır. Çoğu zaman karıştırıldığı gibi, RT-PCR'ın gerçek-zamanlı PCR'ı değil, yalnızca ters transkripsiyon PCR'ı tanımlamak için kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Bustin vd., 2009). Diğer yandan qPCR analizi için "Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu" ifadesinin ve RT-qPCR analizi için "Ters Transkripsiyon-qPCR" ifadesinin kullanılması önerilmiştir (Bustin vd., 2009; Adams vd., 2020).

RT-PCR analizinde RNA ve ters transkriptaz enziminin kullanılmasıyla, tek iplikli bir cDNA (tamamlayıcı DNA) kopyası üretilmektedir. Daha sonra standart bir PCR tabanlı amplifikasyon analiziyle bir DNA polimeraz tarafından tek zincirli cDNA çift zincirli olarak çoğaltılmaktadır (Şekil 2.4 (a)). Bu teknik, ilgilenilen genlerin moleküler klonlanmasında kullanılsa da yaygın olarak RT-qPCR analizinin ilk aşaması olarak hizmet etmektedir (Adams vd., 2020). qPCR analizinde DNA'nın gerçek zamanlı olarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilerek, ilgilenilen DNA dizilerinin kopya sayısının belirlenmesi amaçlanmaktadır (Şekil 2.4 (b)). RT-qPCR analizinde ise, cDNA'nın şablon olarak kullanılmasıyla bir qPCR reaksiyonunda RNA seviyelerinin ölçülmesi için RT-PCR ve qPCR analizleri birleştirilmektedir ve böylece gen ifade değişiklikleri tespit edilmektedir (Şekil 2.4 (c)) (Adams, 2020). Analiz, her PCR döngüsü sırasında üretilen DNA miktarıyla orantılı olan floresans sinyalindeki artışın ölçülmesine dayanmaktadır (Nolan vd., 2006).



Şekil 2.5. Üç farklı PCR analizinin reaksiyon basamakları; (a); RT-PCR, (b); qPCR, (c); RT-qPCR (Adams, 2021'den uyarlanmıştır)

RT-qPCR analizi üç basamaktan oluşmaktadır: (i) RNA'nın ters transkriptaz enzimiyle cDNA'ya dönüştürülmesi, (ii) cDNA'nın PCR ile amplifikasyonu ve (iii) amplifikasyon ürünlerinin gerçek zamanlı miktarının belirlenmesi (Gibson vd., 1996; Nolan vd., 2006). qPCR analizinde amplifikasyonun kantitatif olarak tespit edilmesi için diziye özgü olmayan floresans tabanlı bir boya ya da diziye özgü prob hibridizasyonu sistemi kullanılmaktadır. SYBR Green, en yaygın interkalasyon boyasıdır ve yeni sentezlenen DNA zincirinin çift iplikli yapısına girerek bir floresans sinyali yaymaktadır (Adams vd., 2020). Analiz sırasında ne kadar çok cDNA üretilirse, o kadar çok floresans algılanmaktadır. SYBR Green tabanlı PCR analizinde gerçekleşen analiz basamakları ve gen ifadesi tespiti Şekil 2.6'da verilmiştir.

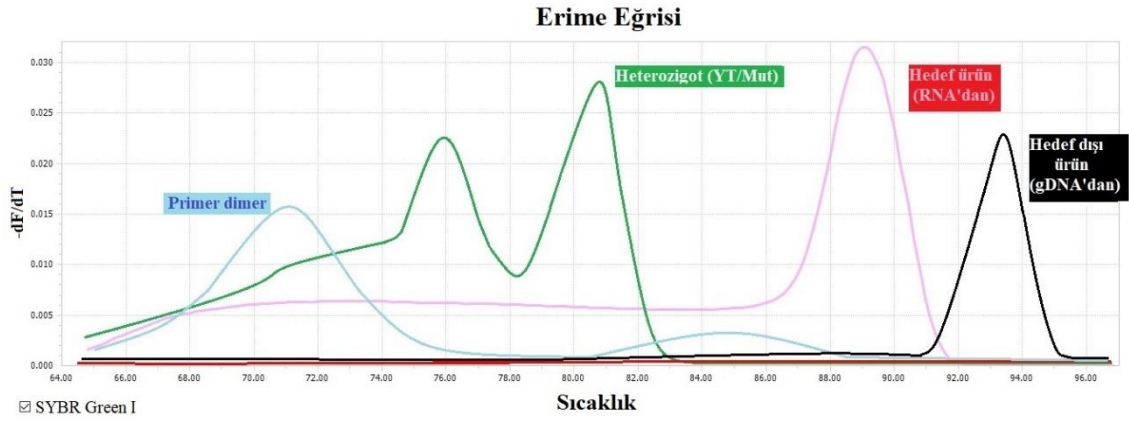


Şekil 2.6. SYBR Green kullanılarak gerçekleştirilen RT-qPCR analizinin reaksiyon basamakları (Adams, 2021’den uyarlanmıştır)

İnterkalasyon boyaları prob hibridizasyonuna dayalı boyalar kadar (TaqMan prob gibi) spesifik değildir ve bu nedenle, tespit edilen sinyalin gerçekten ilgilenilen hedef mRNA olduğundan emin olmak için bir erime eğrisi analizi gerektirmektedir (Adams, 2020). Erime eğrisi analizi, RT-qPCR analizinin son aşamasıdır. Bu aşamada çoğaltılan fragmentler (amplikonlar) belirli bir sıcaklık aralığında (genellikle 55°C-95°C arasında) kademeli olarak inkübe edilmektedirler. Böylece amplikonların büyüklüğü ve içerdiği %GC oranına göre dsDNA'nın (çift zincirli DNA) helikal yapısı bozulmaktadır ve tek iplikli yapıya dönüşmektedir. Çift iplikli cDNA'nın denatürasyonu ile birlikte floresans boya salınmaktadır ve her amplifiye edilmiş ürün için floresans boyanın salındığı andaki sıcaklığa karşılık gelen T_m (erime sıcaklığı) değerleri saptanmaktadır. Böylece her amplikon, sahip olduğu dizinin özgünlüğü sebebiyle karakteristik tek pik vermektedir (erime eğrisi tepe noktası).

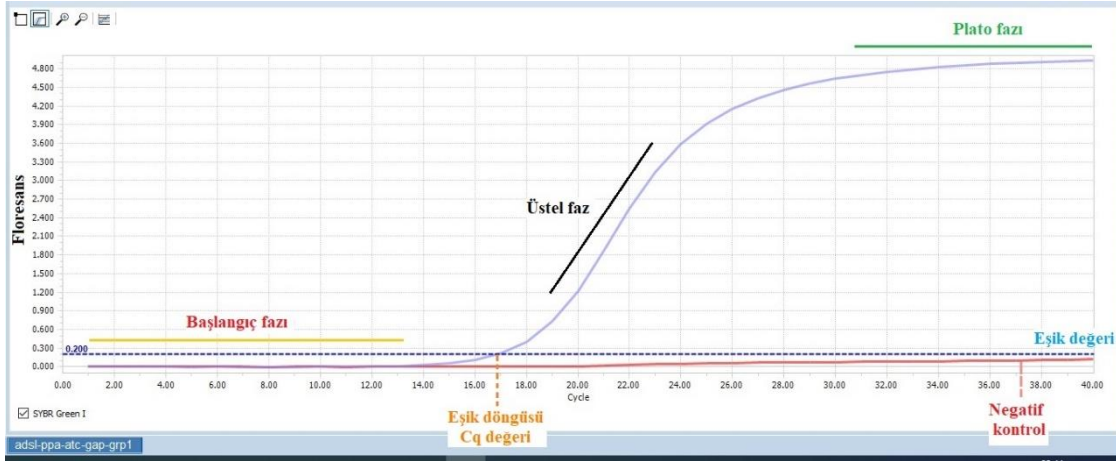
Erime eğrisinin tepe noktaları, erime eğrisinin diferansiyeli (ilk negatif türev ($-dF/dT$)) alınarak hesaplanmaktadır (Bustin vd., 2009; Nolan ve Bustin, 2013). Bu tepe noktaları, bir elektroforez jeli üzerindeki bantlara benzetilmektedir ve bir çalışmanın sonunda ürünlerin niteliksel olarak izlenmesine imkan sağlamaktadır. Kısa primer dimerleri, daha uzun hedef amplikon ürünlerine göre daha düşük sıcaklıkta erimektedir.

Dolayısıyla, herhangi bir kontaminasyon, genomik DNA kalıntısı ya da spesifik olmayan ampliconlar olmadığı takdirde tek bir cDNA türünün (spesifik bir primer çiftinden üretilen) tek bir pik ile sonuçlanması beklenmektedir. Aksi durumda analizin farklı DNA türlerinden veya primer dimerlerinden dolayı, iki veya daha fazla pik vererek sonuçlanması muhtemeldir Ririe vd., 1996; Orrù vd., 2006; Cheong vd., 2009; Ahmed vd., 2017 (Şekil 2.7). Bu durum, primerlerin dikkatli bir şekilde tasarlanmasını ve uygun program/yazılım/veri tabanı ile doğrulanmasını zorunlu hale getirmektedir.



Şekil 2.7. RT-qPCR analizi sonucunda elde edilen erime eğrisi grafiğinde tespit edilebilecek olası fragmentler

qPCR döngüsünün gerçek zamanlı tespiti, başlangıç, üstel ve plato fazlarını içeren bir amplifikasyon eğrisi ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.8). Bu eğri kantitasyonun temelini oluşturmaktadır. Amplifikasyon başladığında, floresans seviyesi düşüktür ve bu değer temel floresans seviyesini ayarlamak için kullanılmaktadır. Reaksiyon üstel büyümeye doğru ilerledikçe, floresans taban çizgisinden önemli ölçüde daha yüksek olan bir seviyeye ulaşır; buna eşik değeri denir. Numunenin bu eşiği geçtiği nokta C_q değeri olarak kaydedilmektedir (Bustin vd., 2009), bu nedenle eşik değeri kantitasyon için oldukça önemlidir (Adams vd., 2020). Eşik değeri, üstel fazda ayarlanmaktadır, böylece okuma sırasında elde edilen C_q değerleri, plato fazındaki reaktif eksikliklerinden kaynaklanabilecek okuma hatalarından etkilenmemektedir.



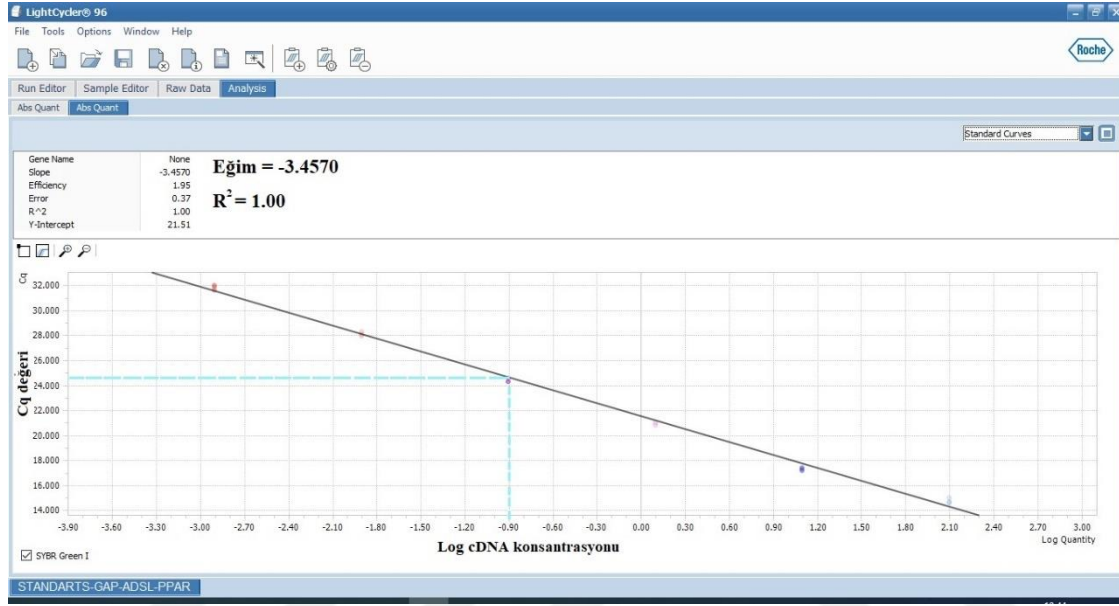
Şekil 2.8. RT-qPCR analizinin gerçek zamanlı tespiti sonrası oluşan başlama, üstel ve plato fazları

Amplifikasyon başladıktan sonra başlangıç materyalinde ne kadar çok hedef gen ürünü varsa, C_q değeri de o kadar düşük olur. Yani başlangıçta ne kadar çok hedeflenen ürün varsa o kadar hızlı amplifikasyon başlayacak ve floresans ışınları da erken tespit edilecek. Böylece daha küçük C_q değerleri ölçülecektir. Floresans ve amplifiye edilen ürün miktarı arasındaki bu korelasyon, geleneksel son nokta PCR analizlerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü korurken, geniş bir dinamik aralıkta hedef moleküllerin doğru miktarının belirlenmesine izin vermektedir (Nolan ve Bustin, 2013). Kantitasyondaki diğer önemli faktör, tüm numunelerde biyolojik koşullara yanıt olarak değişmeden tutarlı bir konsantrasyonda var olan endojen referans olarak değerlendirilen bir referans geninin kullanılmasıdır. Genellikle endojen referans olarak *GAPDH* ve β -*aktin* gibi genler kullanılmaktadır. Hedef mRNA miktarının belirlenmesi için referans genin ve ilgilenen genin C_q değerleri kullanılmaktadır. Bu nedenle iki genin de PCR amplifikasyon verimliliklerinin güçlü ve birbirine yakın olması oldukça önemlidir.

PCR amplifikasyon verimliliği, ilgilenilen hedef genin endojen referans gen aracılığıyla göreceli kantitatif mRNA seviyesinin belirlenmesi için hesaplanması gereken en önemli değerdir ve standart eğri grafiği (slope-eğim değeri) aracılığıyla belirlenmektedir. Çünkü bu tür bir kalibrasyon, ortalama PCR verimliliğinin, analitik duyarlılığın ve testin sağlamlığının basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir göstergesini sağlamaktadır.

Amplifikasyon verimliliği, belirli bir dilüsyon serisinde hazırlanan cDNA konsantrasyonlarına karşılık gelen C_q değerlerine karşı çizilen standart eğrinin eğim değerinden hesaplanmaktadır (Şekil 2.9). Spesifik olarak, ilk cDNA konsantrasyonunun logaritması ($\log_{10}$) x eksenine ve C_q değeri y eksenine çizildiğinde elde edilen eğim değeri ile PCR verimliliği, $E = 10^{-1/\text{eğim}} - 1$ olarak hesaplanmaktadır. Teorik olarak maksimum korelasyon katsayısının (R^2) 1'e yakın (veya %100'e yakın) olduğu durumlarda ürün miktarının her döngüde ikiye katlandığı varsayılmaktadır (Nolan vd., 2006). Dolayısıyla, PCR verimliliğinde meydana gelecek farklılıklar, farklı eğimlere sahip kalibrasyon eğrileri üretecektir. Sonuç olarak, şablon miktarları değiştikçe hedef

genlerin ve referans genlerin C_q değerleri arasındaki farklar sabit kalmayacak ve bağıl konsantrasyonların hesaplamaları hatalı olacak ve yanıltıcı sonuçlara yol açacaktır (Bustin vd., 2009). Bu nedenle, güvenilir bir PCR analizi gerçekleştirmek için hem endojen referans genin hem de hedef genin PCR verimliliğinin 1'e eşit ya da çok yakın olması gerekmektedir. Çünkü, hedef genin göreceli kantitatif mRNAsinin hesaplanmasında endojen kontrol geninin C_q değeri, normalizasyon hesaplamasında ($2^{-\Delta C_q}$) kullanılmaktadır. Bu nedenle amplifikasyon verimliliklerinin 1'e eşit ya da yakın olması oldukça kritiktir (Schmittgen ve Livak, 2008).



Şekil 2.9. cDNA standartları için yapılan RT-qPCR analizinden elde edilen standart eğri grafiği; PCR verimliliği 0.94 (%94)

Literatürde kabul edilebilir PCR verimliliği %93 ile %105 arasında, eğim değeri -3,2 ile -3,5 arasında ve R^2 değeri $\geq 0,98$ olarak bildirilmiştir (Nolan vd., 2006; Kuang vd., 2018). Diğer yandan, amplifikasyon sonunda $C_q > 40$ olarak hesaplanan örnekler, düşük amplifikasyon yani düşük hedef gen ürünü göstergesi nedeniyle şüphelidir ve genellikle analiz dışı bırakılması önerilmektedir. Çünkü bu veriler ya geçerli sonuçları ortadan kaldıracak kadar çok düşük ya da yanlış pozitif sonuçları artıracak kadar çok yüksek olabilmektedir (Burns ve Valdivia, 2008; Bustin vd., 2009).

RT-qPCR analizinden elde edilen verileri analiz etmek için, mutlak ve göreceli olmak üzere seçilebilecek iki tür kantitasyon yöntemi bulunmaktadır (Adams vd., 2020). Mutlak kantitasyonda, her reaksiyon log konsantrasyonları ve C_q değerleri kullanılarak standart bir eğrinin oluşturulduğu endojen referans gen ve ilgilenilen hedef gen için bilinen bir konsantrasyon standardı gerektirmektedir. Bu standart eğri daha sonra bilinmeyen deneysel numunelerin konsantrasyonunu ölçmek için ve genellikle DNA kopya sayısını belirlemek için kullanılmaktadır.

Göreceli kantitasyon yaklaşımı, endojen referans gen ile ilgilenilen gen arasındaki oranın hesaplanmasını sağlayan kantitasyondur. Bu ölçümün doğruluğu endojen referans gene bağlıdır; bu nedenle, hatalı sonuçları önlemek için referans genin C_q değerlerinin tüm biyolojik numunelerde değişmeden kalması çok önemlidir. İlgilenilen genin mRNA seviyesinin tespit edilmesi için referans gen ve ilgilenilen gen arasındaki C_q değeri farkı ($2^{-\Delta C_q}$) hesaplanmaktadır ve bu yöntem ΔC_q yöntemi ($2^{-\Delta C_q}$) olarak adlandırılmaktadır (Schmittgen ve Livak, 2008). Referans genin C_q değeri, numune yüklemedeki hataları ortadan kaldırmak için ilgilenilen genin C_q değerinden çıkartılmaktadır. Bu çıkartma işlemi ile tüm numuneler için özgün ΔC_q değerleri üretilmektedir. Daha sonra elde edilen ΔC_q değeri, PCR verimliliğinin 1 olması (1'e yakın olması) gerektiği varsayılarak, gen ifadesi seviyesi değeri olarak $2^{-\Delta C_q}$ değeri şeklinde hesaplanmaktadır (Schmittgen ve Livak, 2008). Eğer farklı iki örneğin hedef mRNA seviyesi karşılaştırılacaksa $2^{-\Delta C_q}$ değerleri kullanılmaktadır, ancak bir örneğin zamana bağlı değişen gen ifadesi seviyesi karşılaştırılacaksa $2^{-\Delta C_q(\text{son örnek})} / 2^{-\Delta C_q(\text{ilk örnek})}$ hesaplaması kullanılmaktadır (Schmittgen ve Livak, 2008). Bu karşılaştırmanın doğru yapılması için endojen referans ve hedef genin karşılaştırılabilir PCR verimliliklerine sahip olması gerekmektedir (Bustin vd., 2009).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmanın materyalini Tarım ve Orman Bakanlığı'na ait konservasyon sürüsünden sağlanan ve Sinop ili Gerze ilçesinde bulunan Hacıkadı Üretim A.Ş. tesisinde yetiştirilen Gerze tavuğu bireyleri ve aynı şartlar altında yetiştirilen ticari hibrit (Cobb 500) bireyler oluşturmuştur. Üretim tesisinde birbirine en uzak şekilde konumlandırılan 5'er bölmeli alanlarda (4m²) her bölmede 20 civciv olacak şekilde her iki ırk için 100'er piliç yetiştirilmiştir. Gerze tavuk ırkına ait bireyler 0-2 haftalık, 2-10 haftalık ve 10-20 haftalık dönemlerde, hibrit ırka ait bireyler 0-3 haftalık, 3-6 haftalık ve 6-8 haftalık dönemlerde sırasıyla %22, %20, %19 protein ve 3100 kcal/kg, 2850 kcal/kg ve 2700 kcal/kg enerji içeriklerine sahip olan aynı yemlerle ad libitum olarak beslenmiştir (Şekil 3.1). Literatürde bildirildiği gibi (San vd., 2021) her iki ırk aynı fizyolojik yaşa geldiklerinde iki farklı büyüme döneminde *Pectoralis major* kasından doku örneklerinin toplanması planlanmıştır. Gerze tavuğu ve hibrit ırk üzerinde yapılan önceki çalışmalardan elde edilen bilgiler, iki genotipin fizyolojik yaşlarına göre örneklem zamanlarının saptanmasında kullanılmıştır. Buna göre Gerze tavuk ırklarından 70 günlük ve 140 günlük yaşlarda, hibrit ırk tavuklarından 28 günlük ve 56 günlük yaşlarda örneklem yapılmıştır (Çizelge 3.1). Doku örnekleri toplanmadan önce her iki ırkın bireylerinden canlı ağırlık ölçümü yapılmıştır. Çalışma için her iki ırktan dişi bireyler seçilmiştir. Özellikle ilk örneklem dönemi için cinsiyetin belirlenmesinde PCR analizinden faydalanılmıştır. Her iki ırk için örneklem dönemlerinden bir hafta önce ortalama canlı ağırlığa sahip bireylerden tüy örnekleri alınarak Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü laboratuvarına ulaştırılmıştır. Tüyden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra cinsiyet kromozomlarına özgü primerler (CDH-2550F; 5'-GTTACTGATTCGCTCTACGAGA-3', CDH-2718R; 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') kullanılarak PCR analizi yapılmıştır (Fridolfsson ve Ellegren, 1999). PCR sonrası fragmentler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek civcivlerin cinsiyeti belirlenmiştir. İlk örneklem grubunda çalışılan civcivlerin cinsiyet tayini için PCR sonrası agaroz jel görüntüsü Şekil 2.1'de sunulmuştur. Analiz sonucunda her deneme grubu ve her ırk için ortalama canlı ağırlığa sahip 4 adet dişi birey deney materyali olarak seçilmiştir.

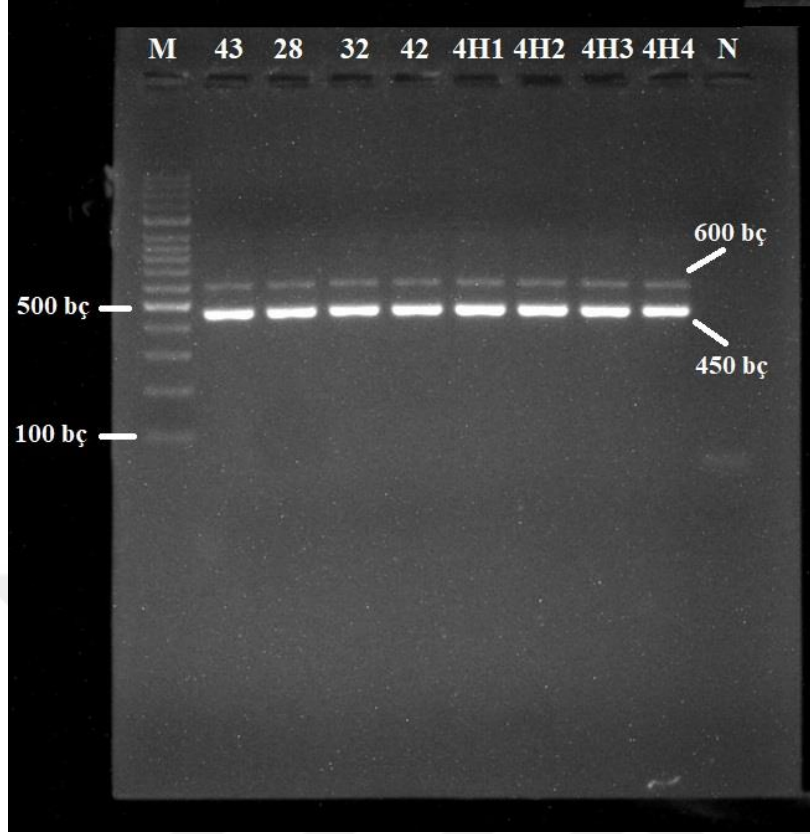


Şekil 3.1. Hacıkadı Üretim A.Ş. tesisinden Gerze tavuk ırkına ait görüntüler

Çizelge 3.1. Deney gruplarına ait örneklem zamanları, ırklar ve birey sayıları

İrk	İlk Örneklem Grubu	İkinci Örneklem Grubu
Gerze	4 birey (70. Gün)	4 birey (140. Gün)
Hibrit	4 birey (28. Gün)	4 birey (56. Gün)

**Şekil 3.2.** Tüyden DNA izolasyonu, PCR analizi ve agaroz jel elektroforezi



Şekil 3.3. Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait ilk örneklem dönemindeki civcivlerin cinsiyet analizi sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü; **M:** Belirteç; **43, 28, 32, 42** numaralı bantlar Gerze tavuk ırkına ait örnekler; **4H1, 4H2, 4H3, 4H4** numaralı bantlar hibrit tavuk ırkına ait örnekler; **N:** Negatif kontrol

3.1.1. Araç ve gereç

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'na ait Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Doku örneklerinin homojenizasyonu için Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde bulunan ultrasonikatör (Branson Sonifier, USA) cihazı kullanılmıştır. Gen ifadelerinin kantitatif analizi için Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarı'nda bulunan RT-qPCR cihazı (Roche, Switzerland) kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan tüm laboratuvar ekipmanları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan ekipmanlar

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli	Mevcut Olduğu Kurum/Kuruluş	Kullanım Amacı
Soğutmalı Santrifüj (Hettich 320E, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	DNA izolasyonu ve PCR analizlerinde ısıya hassas örneklerin bozulmadan santrifüj edilerek çöktürülmesi
Mini Santrifüj (Hettich-Micro 120, BioRad, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	RNA izolasyonu ve PCR analizlerinde örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Branson Sonifier 450 Ultrasonic Cell Distributor w/ Converter and Enclosure (Branson Sonifier, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarı	Dokuların parçalanması ve RNA izolasyonu
-20°C derin dondurucu (NF450, Vestel, Türkiye)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Çeşitli sarf malzemelerin saklanması
-80°C derin dondurucu (Thermo Scientific, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Doku ve RNA örneklerinin saklanması
Biodrop µlite (Biodrop µlite)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	RNA örneklerinin saflık ve yoğunlukların ölçülmesi
Prima-TRIOTM (HIMEDIA, SA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	cDNA sentezi ve PCR analizinde kullanılması
LightCycler® System (Roche, Switzerland)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Genlerin kantitatif düzeyde ifade seviyelerinin belirlenmesi
Jel görüntüleme (GEN-BOX, Türkiye)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	RNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Otoklav (50 L, TOMY-SX500E, TOMY Lab, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu

Devamı Arkada

Çizelge 3.2'nin devamı

Hassas terazi (DESI-TM600, Türkiye)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Doku örneklerinin ve tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerin tartılması
Yatay elektroforez sistemi (BioRad, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	RNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin agaroz jel sisteminde tespit edilmesi,
Elektroforez güç kaynağı (BioRad, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Elektroforez işlemi için gerekli kesintisiz düzenli elektrik akımının sağlanması
Manyetik karıştırıcı (MTOPS-M300, Türkiye)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Tampon çözeltilerin hazırlanması
Vorteks (Thomas Scientific, USA)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Tampon çözeltilerin hazırlanması ve RNA izolasyonu
Otomatik pipet seti (Eppendorf)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Mikro seviyede sıvı karışımların hazırlanması
Mikro dalga fırın (ARÇELİK)	Akdeniz Ün. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarları	Agaroz jel hazırlanması

3.1.2. Tamponların ve solüsyonların hazırlanması

Çalışmaya başlamadan önce gerekli olan tüm tampon ve kimyasallar steril bir şekilde hazırlanmış ve uygun koşullarda muhafaza edilmiştir.

3.1.2.1. 1X TAE (Tris Asetat EDTA) tamponunun hazırlanması

Genel olarak agaroz jel elektroforezinde DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin veya büyük fragmentlerin ayrılması için TAE tamponu kullanılmaktadır. Öncelikle 50X yoğunluktaki stok solüsyonu (EcoTech, Türkiye) 1X yoğunluğa seyreltilmiştir. 1X konsantrasyonda 1 litre tampon hazırlanması için; 50X konsantre stoktan 20 ml alınarak üzeri 980 ml' ddH₂O (çift distile su) ile tamamlanmıştır.

3.1.2.2. %2'lik Agaroz jel hazırlanması

Çalışma süresince tüm fragmentlerin PCR sonrası kontrolünde yatay agaroz jel elektroforez sistemi (Biorad, USA) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan agaroz (Bioshop, Kanada) jelin yoğunluğu çalışılan genlerin fragment büyüklükleri nedeniyle (115 bp-600 bp) %2 olarak ayarlanmıştır; hassas terazide 2 gr agaroz tartılarak 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde homojen oluncaya kadar karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırınında (Arçelik, Türkiye) kaynatılmasına kadar ısıtılıp daha sonra soğuması için bekletilmiştir. Yeterince soğuduktan (50°C) sonra içerisine 1.2 µl Etidyum bromür (EtBr) (Sigma-Aldrich, Almanya) eklenerek iyice karıştırılmıştır. EtBr homojen bir şekilde agaroz jelle karıştırıldıktan sonra elektroforezin jel kasetine dökülerek soğuması ve jelleşmesi için beklenmiştir.

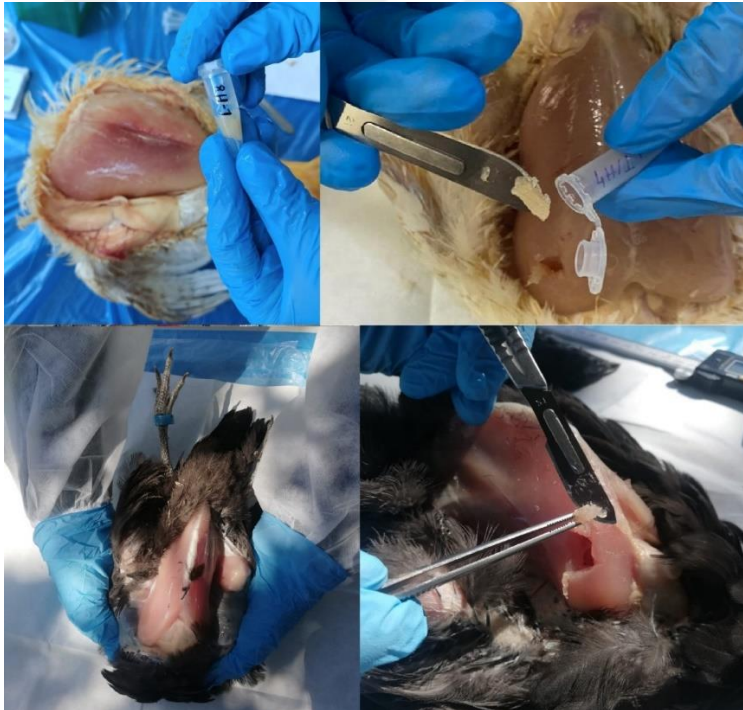
3.1.2.3. DEPC'li tampon hazırlama

Diethylpyrocarbonate (DEPC) solüsyonu (BioBasic, Canada), RNA izolasyonu esnasında ve sonrasında RNaz enziminin çalışma ortamından, yüzeylerden, ekipmanlardan ve solüsyonlardan uzaklaştırılması için kullanılmıştır. 1 ml DEPC solüsyonu 1000 ml otoklavlanmış ddH₂O eklenerek % 0,1'lik DEPC'li su hazırlanmıştır. Solüsyon bir gece boyunca manyetik karıştırıcı (ile oda sıcaklığında çözülmeye bırakılmıştır. DEPC'li su otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Pectoralis major* kas dokusu örneklerinin toplanması

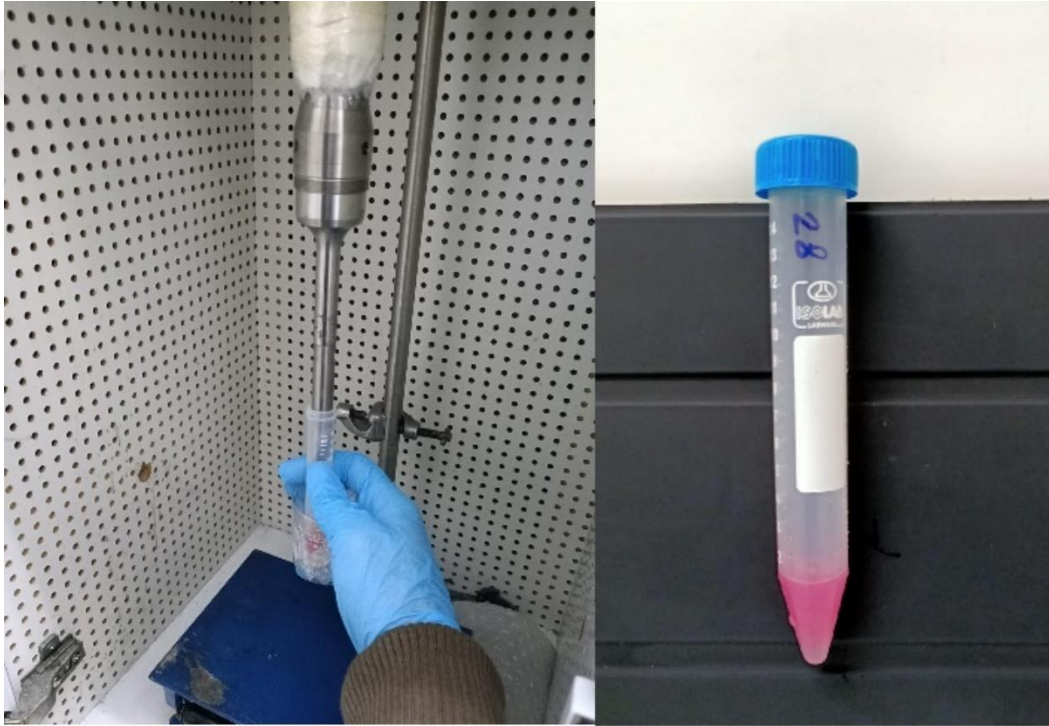
Gerze tavuk ırkı ve hibrit tavuk ırkı için belirlenen büyüme dönemlerinde deney gruplarını oluşturacak dişi bireyler seçildikten sonra çok hızlı bir şekilde kesim işlemi gerçekleştirilerek tüm kanın akışı sağlanmıştır, ardından sol *Pectoralis major* kasının aynı noktasından doku örnekleri (500 mg) toplanmıştır (Şekil 3.2) (Mazzoni vd., 2015). Hayvanların kesilmesi ve doku örneklerinin toplanması Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 1410/2021.03.006 protokol numaralı izni ile gerçekleştirilmiştir. Toplanan örnekler Akdeniz Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarı'na 24 saat içerisinde ulaştırılana kadar nükleik asit koruyucu olarak görev yapan ticari bir DNA/RNA Shield™ (Zymo Research, USA) içerisinde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Hacıkadı Üretim A.Ş. tesisinde Gerze ve hibrit tavuk ırklarından *Pectoralis major* kas dokusu örneklerinin toplanması

3.2.2. Toplanan doku örneklerinin parçalanması ve homojenizasyonu

Sinop ili Gerze ilçesinde bulunan Hacıkadı Üretim A.Ş. üretim tesislerinden toplanan ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'na ait Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarı'na getirilen doku örnekleri 300 mg olacak şekilde tartılıp falkon tüplere aktarılmıştır. Toplanan doku örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirmek için Direct-zol™ RNA Miniprep Plus Kit ((Product Supplied w/ 50 ml TRI Reagent); R2071, Zymo Research, USA)) kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan TRI Reagent® solüsyonundan her tüpe 1 ml aktarılmıştır ve örnekler ultrasonikatör cihazı (Branson Sonifier, USA) kullanılarak buz üzerinde homojenize edilmiştir (10 saniyede bir 10-15 saniye soğutularak homojenizasyon uygulanmıştır) (Şekil 3.2). Örnekler tamamen homojen bir görünüm kazanana kadar doku örneklerinin parçalanması sağlanmıştır.



Şekil 3.5. Doku örneklerinin ultrasonikatör ile homojenizasyonu

3.2.3. Doku örneklerinden RNA izolasyonu

Homojenize edilen doku örneklerinden Direct-zol Miniprep Plus RNA Extraction Kit (ZYMO, R2071, USA) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).

Kit içeriği aşağıda sıralanmıştır.

- 1- TRI Reagent®
- 2- Direct-zol™ RNA
- 3- PreWash Buffer
- 4- RNA Wash Buffer
- 5- DNase I3
- 6- DNA Digestion Buffer

- 7- DNase/RNase-Free Water
- 8- Zymo-Spin™ IIICG Columns
- 9- Collection Tubes



Şekil 3.6. Doku örneklerinden RNA izole etmek için kullanılan ticari kit

Ticari kit içerisinde bulunan solüsyonlar aşağıda sıralandığı gibi izolasyonda kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

- 1- 40 ml Direct-zol™ RNA PreWash konsantre solüsyonu üzerine 10 ml etanol (%95-100) eklenmiştir.
- 2- 12 ml RNA RNA Wash konsantre solüsyonu üzerine 48 ml %100 etanol eklenmiştir.
- 3- 275 µl DNaz/RNaz içermeyen su Liyofilize DNaz I enzimine eklenmiş ve nazikçe alt üst edilerek tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır ve hemen -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Kit protokolü;

- 1- Yaklaşık 300 mg doku örneklerinin üzerine 1000 µl TRI Reagent® eklenerek ultrasonikatör yardımıyla iyice homojenize edilmiştir.
- 2- 1000 µl homojenizat, RNaz içermeyen bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 13.000 x g’de 30 saniye santrifüj edilerek proteinlerin çöktürülmesi ve açığa çıkan genetik materyalin süpernatant içinde toplanması sağlanmıştır.
- 3- Santrifüj sonrası oluşan üst fazdan, yani süpernatanttan 700 µl alınarak RNaz içermeyen yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 4- Homojenize örneğin üzerine 700 µl %99’luk etanol eklendikten sonra nazikçe pipetasyon yapılmıştır.
- 5- Lizat, bir toplama tüpü içindeki Zymo-Spin™ IIICG kolonuna aktarıldıktan sonra 13.000 x g’de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılacak şekilde altta toplanan süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 6- Kolona 400 µl RNA yıkama tamponu eklendikten sonra 13.000 x g’de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

7- RNaz içermeyen temiz bir tüpe, 5 µl DNase I (6 U/µl), 75 µl DNA Wash Buffer eklendikten sonra hafifçe ters-düz çevrilerek karıştırılmıştır. Karışım doğrudan membrana aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

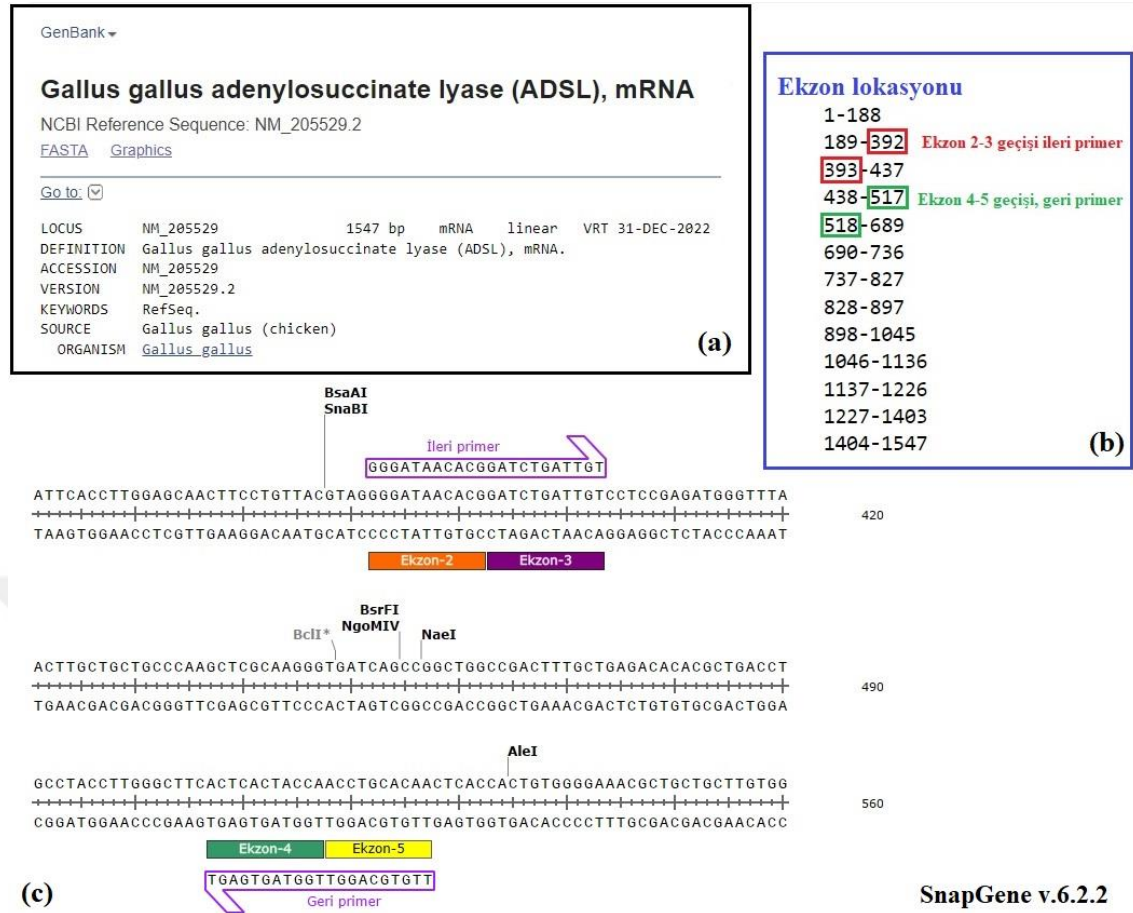
8- 400 µl Direct-zol™ RNA ön yıkama tamponu eklendikten sonra 13.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta toplanan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra bu adım tekrar edilmiştir.

9- Kolona 700 µl RNA yıkama tamponu eklendikten sonra 13.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüm süpernatantın kolondan akışı sağlandığında kolon RNaz içermeyen temiz bir tüpe aktarılmıştır.

10- RNA'yı kolondan indirmek için, doğrudan kolon matrisine 80 µl DNaz/RNaz içermeyen su eklendikten sonra 13.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. RNA'ların yoğunluğu ve saflıkları Biodrop µLite (Biochrom, UK) cihazı ile ölçülmüştür. RNA örnekleri hızlıca -80°C'de (Thermo Fisher, USA) muhafaza edilmiştir.

3.2.4. RT-qPCR analizi için primerlerin tasarlanması ve kullanıma hazırlanması

RT-qPCR'da kullanılacak 12 çift primerin tasarlanması için NCBI, GenBank, Primer3 Plus, SnapGene Viewer v.6.2.2 ve Amplify4 v.1.0 (Mac OSX 10.9) yazılımları kullanılmıştır (Şekil 3.4). RT-qPCR analizinde genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için primerler, ilgili genlerin ekzon başlangıç ve bitiş dizilerini tamamlayacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.7). 12 genin mRNA dizileri GenBank veri tabanından .fas uzantılı dosya olarak indirilmiştir ve ayrıca veri tabanı üzerinden ekzon dizilerinin lokasyonu alınmıştır. Daha sonra SnapGene Viewer v.6.2.2 yazılımında .fas uzantılı mRNA dosyaları açılarak her ekzon bitişine ve diğer ekzonun başlangıç dizisine denk gelecek şekilde (her iki ekzon için en az 7 en fazla 12 baz tamamlayacak şekilde) uygun primer çiftleri tasarlanmıştır.

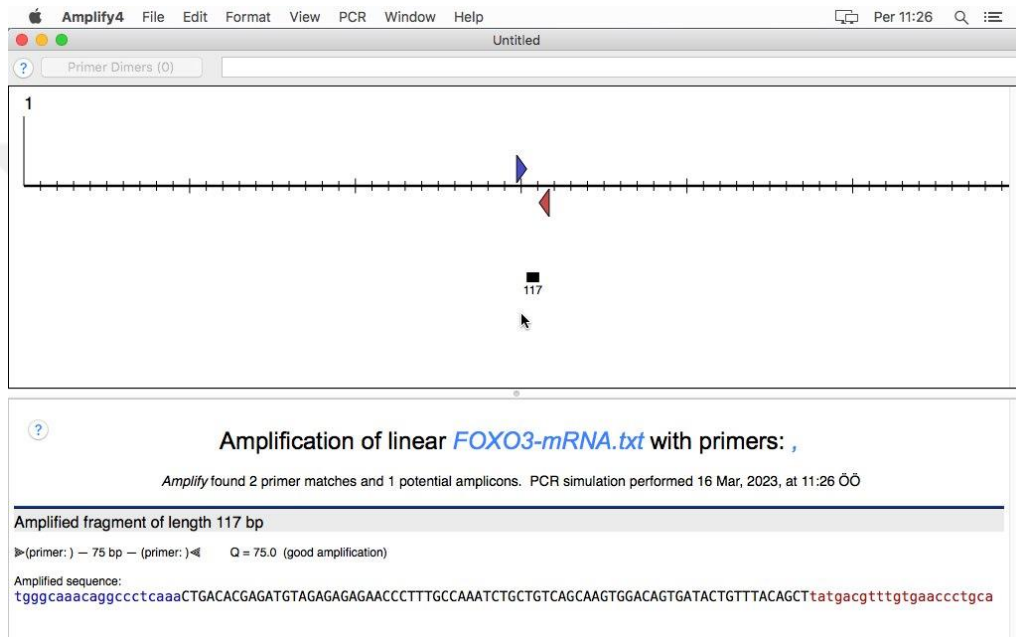


Şekil 3.7. Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımı; **a)** GenBank veritabanındaki ADSL geninin referans mRNA dizisi erişim bilgileri; **b)** ADSL geninin ekzon dizilerinin başlangıç ve bitiş noktalarındaki nükleotid pozisyonları; **c)** SnapGene yazılımında ADSL geni için tasarlanan primerlerin konumu

Ekzon geçiş noktalarında uygun primer çiftleri tasarlanamayan genler için, NCBI veri tabanından genin uzun intron dizileri (>2 kb) seçilerek intronun her iki yanındaki ekzon dizilerinden faydalanılmıştır. Ekzon geçişine denk gelen primerin pozisyonuna göre, diğer primer intronun öncesinde ya da sonrasında yer alan ekzonun içinde kalacak şekilde uygun primer çiftleri tasarlanmıştır. Böylece genomik DNA kalıntısı olsa dahi tez çalışmasında kullanılan polimerazın bu uzunlukta bir ampikonu üretmesi mümkün olmayacaktır. Örneğin *LPL* geni için tasarlanan primerler genomik DNA'da 3839 bp uzunluğunda bir ampikona denk gelirken (cDNA uzunluğu 115 bp), *ATIC* geni için tasarlanan primerler 70 kb uzunluğunda bir ampikona denk gelmektedir (cDNA uzunluğu 216 bp).

Primer çiftleri tasarlanırken 100-250 bp uzunluğunda olmasına ve GC oranının %45-60 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Tasarlanan primerlerin amplifikasyon gücü, dimer ya da üzerine katlanma (hairpin) gibi değerleri Primer3 Plus yazılımında kontrol edilmiştir. Güçlü bağlanma ve düşük dimer ya da katlanma gösteren primer çiftleri son olarak Amplify4 v.1.0 yazılımında test edilmiştir (Şekil 3.8). Değerlendirmeler yapılırken seçilecek primer çiftlerinin bağlanma gücünün çok iyi ya da iyi seviyede olmasına dikkat

edilmiştir. Ayrıca zayıf ya da çok zayıf güçte spesifik olmayan ampikon üretme potansiyeline sahip primer çiftleri analiz dışı bırakılmıştır. Nihai olarak, 12 gen için başarılı olarak kabul edilen 12 primer çifti tasarlanmıştır (Çizelge 3.3). Hizmet alımı şeklinde temin edilen primerler (liyofilize) öncelikle üretici firmanın talimatlarına göre belirtilen miktarlarda ddH₂O eklenerek çözündürülmüş ve 100 µM stok primerler hazırlanmıştır. RT-qPCR’da kullanıma hazır stoklar oluşturmak için ana stoktan 10 µl alınarak üzerine 90 µl ddH₂O eklenmiştir ve 10 µM kullanım stokları hazırlanmıştır. Ardından primerler vortekslenip santrifüj edildikten sonra -20°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılacak primerlerin dizileri, çoğalttıkları fragment uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.8. Amplify4 programında tasarlanan *FOXO3* genine özgü primer tasarımı ve ampikon dizisi

Çizelge 3.3. Primerlerin dizisi, ampikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları

Gen Adı	Primer dizisi (5'-3')	Uzunluk	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Lokasyon	GenBank Erşim Numarası
<i>GAPDH</i>	F:GTCTTATGACCACTGTCCATGC	174 bç	60	Ekson 7-8 geçişi	NM_20430 5.2
	R:TTCCAGTAAGCTTCCCATTTCAG			Ekson 8-9 geçişi	
<i>ADSL</i>	F:GGGATAACACGGATCTGATTGT	146 bç	60	Ekson 2-3 geçişi	NM_20552 9.2
	R:TTGTGCAGGTTGGTAGTGAGT			Ekson 4-5 geçişi	
<i>AK1</i>	F: GCATGTCGACAGAAAACTGAAGC	223 bç	60	Ekson 2-3 geçişi	NM_20510 9.3
	R: AGCACCGTGTCCAGGGGAA			Ekson 4-5 geçişi	

Devamı Arkada

Çizelge 3.3'ün devamı

CAPN3	F: CAAGGAGAATTAGGTGATTGCTG	143 bç	58	Ekson 2-3 geçişi	NM_001004405.3
	R: TAGCGCCAAAAGTGAAGTGAA			Ekson 3-4 geçişi	
MSTN	F: TGCCTACGGAGTCTGATTTTCT	129 bç	58	Ekson 1-2 geçişi	NM_001001461.2
	R: GGACTTGCCTCAAGTATATCCA			Ekson 2 içinde	
SCD	F:CCAGCGGAGATACTACAAGC	142 bç	57	Ekson 4-5 geçişi	NM_204890.2
	R:GGCATTGAGCCCTAAGGTGTA			Ekson 5 içinde	
LPL	F: TGCCCTACAAAGTCTTCCATTA	115 bç	58	Ekson 6-7 geçişi	NM_205282.2
	R: TCACTCTCGTCTAGAGTGCC			Ekson 7 içinde	
PPAR γ	F: TAAGTGAGATCGCCCAGGT	164 bç	60	Ekson 7-8 geçişi	XM_046925952.1
	R: CGTTACAATTTGTCTGAGGTCCGT			Ekson 8 içinde	
ENTPD8	F:ACTGTGAATGGATCTGGCATCT	188 bç	57	Ekson 3-4 geçişi	NM_204247.3
	R:TGCTCAGCTTTTGTGCTGTT			Ekson 5 içinde	
AMPD1	F:CCCAGGATTTATGATGTGTTTCAG	145 bç	57	Ekson 10-11 geçişi	NM_001396624.1
	R:CCGTGATGTGGCGTAGAAA			Ekson 11-12 geçişi	
ATIC	F: AGGAGGACGTGTGAAAACCC	216 bç	61	Ekson 3 içinde	NM_205178.2
	R: CGGAGCAAGGCAACTCCTC			Ekson 6 içinde	
FOXO3	F: TGGGCAAACAGGCCCTCAAA	117 bç	61	Ekson 1-2 geçişi	XM_040668652.2
	R: TGCAGGGTTCACAAACGTCATA			Ekson 2 içinde	

3.2.5. RNA'dan cDNA sentezi

RNA'lardan cDNA elde edilmesinde OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials (abm), Canada) kullanılmıştır (Şekil 3.5). cDNA elde edilmesi için kullanılan reaktifler ve miktarları Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.9. RNA örneklerinden cDNA elde edilmesi için kullanılan ticari kit

Çizelge 3.4. cDNA kitinin bileşenleri ve miktarları

Reaktif	Miktar
RNA	1 µg
OneScript® Plus RTase	1 µl
5X RT Buffer	4 µl
Random Primers (10 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
ddH ₂ O	20 µl'ye tamamlanmıştır.

Kit protokolü;

- 1- RNA ve tüm reaktifler 0,2 ml hacimli bir mikrosantrifüj tüpünde yavaşça karıştırılmıştır ve tüm hazırlık süreci buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.
- 2- Karışım sırasıyla 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- 3- Son durumda 20 µl hacimde 1000 ng cDNA elde edilmiştir (50 ng/µl).
- 4- Elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6. cDNA'ların ve primerlerin kontrol edilmesi

RNA izolasyonundan sonra elde edilen cDNA örneklerinin kontrol edilmesi amacıyla endojen referans geni olarak seçilen *GAPDH* genine özgü tasarlanan primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu amaçla Gerze tavuk ırkı için 39 numaralı örnek, hibrit ırk için 8H4 numaralı örnek seçilmiştir. PCR için 2×Super Taq PCR Master Mix (Biotek, China) kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.5'te, sıcaklık döngü

programı Çizelge 3.6’da verilmiştir. PCR sonrasında elde edilen amplikonların büyüklüğü ve bütünlüğü %2’lik agaroz jelde yürütülerek (80 Volt, 80 dakika) doğrulanmıştır. Başarılı bir amplifikasyon sağlandıktan sonra aynı cDNA örnekleri, 12 adet gene özgü tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR sonrasında elde edilen amplikonların büyüklüğü ve bütünlüğü %2’lik agaroz jelde yürütülerek (80 Volt, 80 dakika) doğrulanmıştır.

Çizelge 3.5. PCR analizinde kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
cDNA	5 µl
RealQ Pus 2X Master Mix	325 µl
Primer (Forward) (10 µM)	16.25 µl
Primer (Reverse) (10 µM)	16.25 µl
ddH ₂ O	162.5 µl

Çizelge 3.6. PCR analizi için uygulanan sıcaklık döngü programı

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	4 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	35
Bağlanma	59.4 °C (<i>GAPDH</i> primerlerinin bağlanma sıcaklığı)	30 saniye	
Uzama	72 °C	40 saniye	
Son uzama	72 °C	10 dakika	1

3.2.7. RT-qPCR analizi

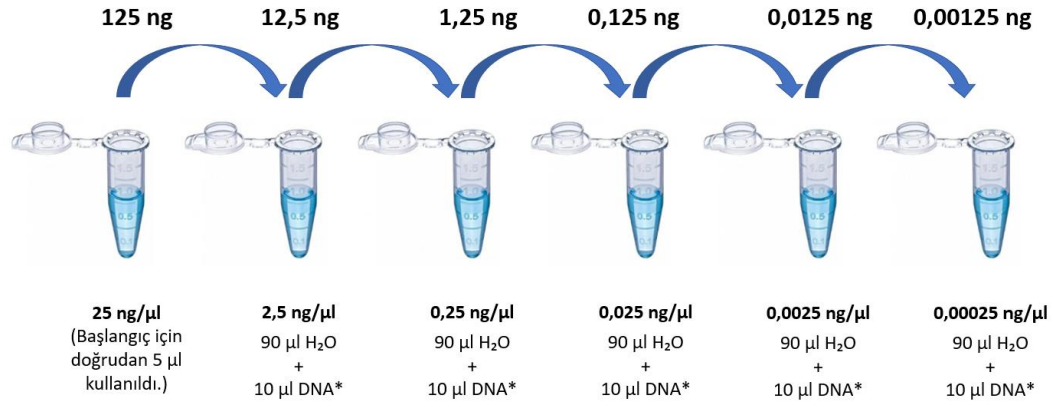
3.2.7.1. Primerler için standart eğri oluşturulması

İki adet cDNA örneği kullanılarak (39 numara ve 8H4) PCR analizi ile tüm primerler doğrulandıktan sonra RT-qPCR analizi aşamasına geçilmiştir. Hem 12 adet gene özgü tasarlanan primerlerin RT-qPCR analizindeki verimliliğinin belirlenmesi hem de en uygun cDNA konsantrasyonunun tespit edilmesi amacıyla bir ön çalışma olarak standart eğri analizi yapılmıştır. RT-qPCR analizinde SYBR Green floresan tabanlı bir polimeraz kit olan RealQ Pus 2X Master Mix Green (Ampliqon, Denmark) kullanılarak Gerze tavuk ırkından 43 numaralı örnek ile bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Gerze tavuk ırkının 43 numaralı cDNA örneği 6 farklı dilüsyonda (1:10 oranda; 125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,125 ng, 0,0125 ng, 0,00125 ng) seyreltilmiştir ve 12 adet primer çifti kullanılarak RT-qPCR analizi yapılmıştır (Şekil 3.10). En az ilk 4 dilüsyon için başarılı amplifikasyon vermeyen primerler için 1:4 ve 1:8 oranlarında 6 dilüsyon cDNA numunesi ile çalışma yinelenmiştir (sırasıyla *SCD* ve *CAPN3* genlerine ait primerler için). Tüm primerler için ilk dilüsyon örneklerinde 50 ng/μl ana stok cDNA örneği 1:1 oranda seyreltilerek 25 ng/μl cDNA ara stoğu oluşturulmuştur ve başlangıç dilüsyonu olarak doğrudan 5 μl kullanılmıştır. Böylece tüm standart dilüsyonlar için (1:10, 1:8 ve 1:4 oranlarında) başlangıç cDNA örneği 125 ng olarak ayarlanmıştır.

1:10 oranında seyreltilen cDNA dilüsyon serisi için ikinci dilüsyon örneği ara stok cDNA'dan (25 ng/μl) 10 μl alınarak üzerine 90 μl ddH₂O eklenerek 2,5 ng/μl konsantrasyonda cDNA elde edilmiştir. Bu şekilde her cDNA dilüsyonu bir önceki dilüsyondan 10 μl alınarak ve 90 μl ddH₂O eklenerek hazırlanmıştır. RT-qPCR analizi için son hacimde her cDNA dilüsyonundan 5 μl kullanılmıştır (125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,125 ng, 0,0125 ng, 0,00125 ng).

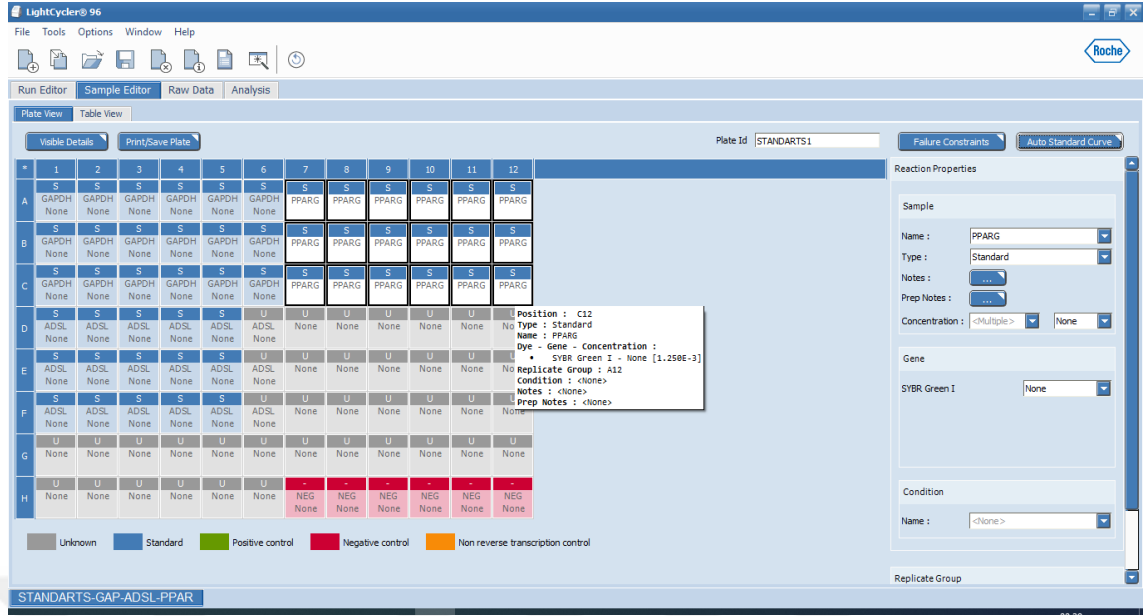
1:8 oranında seyreltilen cDNA dilüsyon serisi için ikinci dilüsyon örneği ara stok cDNA'dan (25 ng/μl) 12,5 μl alınarak üzerine 87,5 μl ddH₂O eklenmiştir ve 3,125 ng/μl konsantrasyonda cDNA elde edilmiştir. Bu şekilde her cDNA dilüsyonu bir önceki dilüsyondan 12,5 μl alınarak ve 87,5 μl ddH₂O eklenerek hazırlanmıştır. RT-qPCR analizi için son hacimde her cDNA dilüsyonundan 5 μl kullanılmıştır (125 ng, 15,625 ng, 1,95312 ng, 0,24414 ng, 0,03051 ng, 0,03814 ng). Bu dilüsyon serisi yalnızca *SCD* genine özgü tasarlanan primerler ile kullanılmıştır.

1:4 oranında seyreltilen cDNA dilüsyon serisi için ikinci dilüsyon örneği ara stok cDNA'dan (25 ng/μl) 25 μl alınarak üzerine 75 μl ddH₂O eklenerek 6,25 ng/μl konsantrasyonda cDNA elde edilmiştir. Bu şekilde her cDNA dilüsyonu bir önceki dilüsyondan 25 μl alınarak ve 75 μl ddH₂O eklenerek hazırlanmıştır. RT-qPCR analizi için son hacimde her cDNA dilüsyonundan 5 μl kullanılmıştır (125 ng, 31,25 ng, 1,25 ng, 7,8125 ng, 1,95312 ng, 0,48828 ng). Bu dilüsyon serisi yalnızca *CAPN3* genine özgü tasarlanan primerler ile kullanılmıştır.



Şekil 3.10. Standart eğri analizi için 1:10 konsantrasyonda oluşturulan 6 farklı cDNA dilüsyonu; Tüplerin altında belirtilen konsantrasyonlar seyreltilen cDNA miktarlarını belirtmektedir. Standart eğri için her dilüsyondan 5 µl hacimde cDNA kullanılmıştır. Tüplerin üzerinde belirtilen konsantrasyonlar RT-qPCR analizinde kullanılan son cDNA miktarlarıdır.

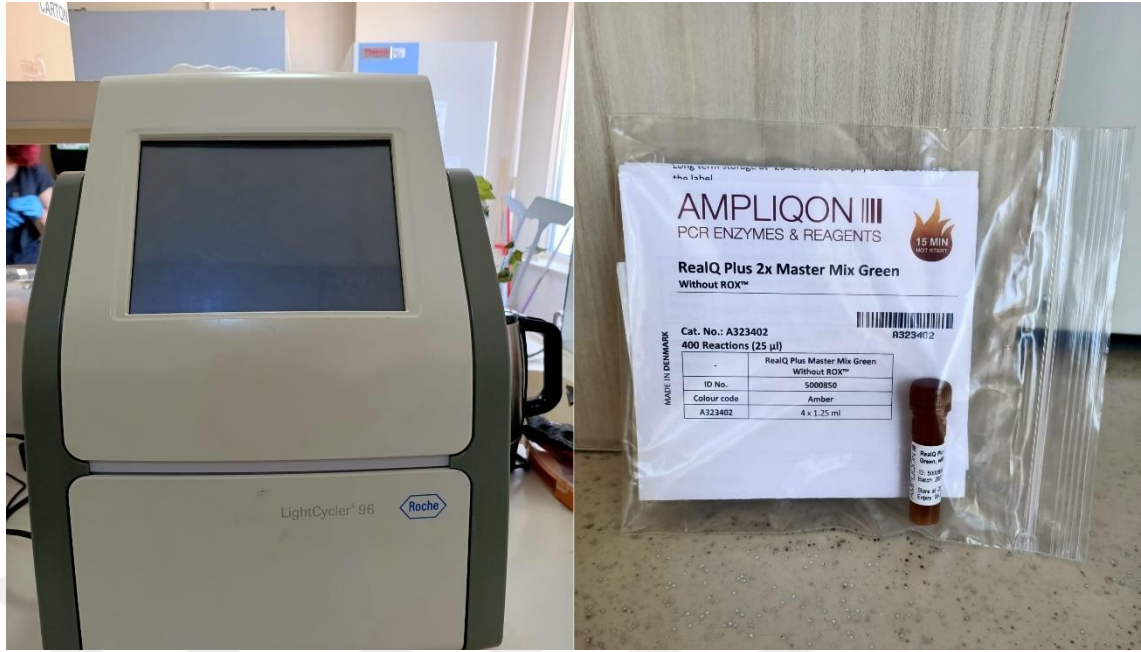
Standart eğri analizi için LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımında 96'lık plate üzerinde cDNA örneklerinin dilüsyon oranları, bulunduğu kuyucuklar ve döngü programı bilgileri girilmiştir (Şekil 3.11). Her 96'lık plate için 3 gen (3 primer çifti) çalışılmıştır. Her gen için, her dilüsyon 3 tekrerrür olarak şekilde (6 dilüsyon x 3 tekrerrür, 18 örnek) analiz edilmiştir. Negatif örnek 6 tekrerrür olarak çalışılmıştır. Negatif örnekler için cDNA yerine aynı miktarda (5 µl) ddH₂O kullanılmıştır. RT-qPCR analizi için ticari kitin yönergeleri doğrultusunda 24 örneklik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (her gen için ayrı ayrı hazırlanmıştır). Kullanılan reaktifler ve miktarları Çizelge 3.7'de verilmiştir. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 20 µl aktarılmıştır ve üzerine her dilüsyondan 5 µl cDNA eklenmiştir. RT-qPCR analizi LightCycler® 96 System (Roche, Switzerland) cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. GAPDH, ADSL ve PPAR γ primerleri için cDNA dilüsyon değerlerinin LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımına girilmesi

Çizelge 3.7. Standart eğri analizi için hazırlanan 24 örneklilik reaksiyon bileşenleri ve miktarları (bir primer çifti için)

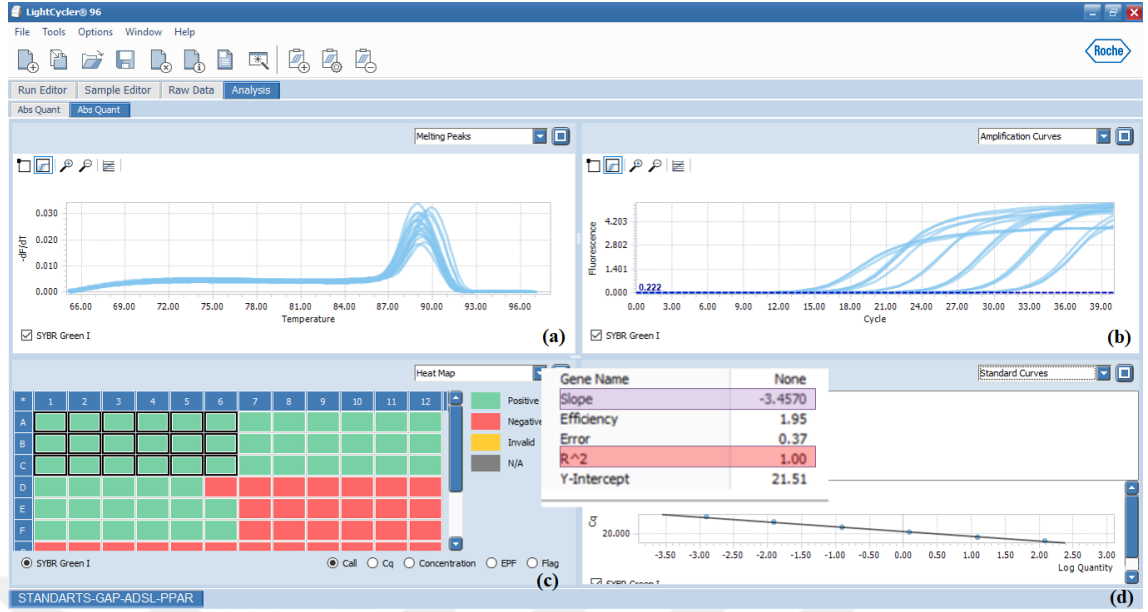
Reaktif	Miktar
RealQ Pus 2X Master Mix	325 μ l
Primer (Forward) (10 μ M)	16.25 μ l
Primer (Reverse) (10 μ M)	16.25 μ l
ddH ₂ O	162.5 μ l



Şekil 3.12. Standart eğri analizi için kullanılan RT-qPCR cihazı ve SYBR Green tabanlı master mix

Analiz sonucunda cDNA içerisinde herhangi bir genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı ya da primerlerin spesifik olmayan bölgelere bağlanıp başka bir ampikon üretip üretmediği analizi sırasında oluşturulan ve LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımı tarafından hazırlanan erime eğrisi grafikleri ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.13.a). Ayrıca, analiz sonunda her kuyucuktaki primer çiftinin amplifikasyon başarı tablosu (Şekil 3.13.b) ve primerlerin çoğalttığı ampikondan oluşturulan amplifikasyon eğrisi grafiği elde edilmiştir (Şekil 3.13.c). cDNA dilüsyonuna karşılık gelen C_q değerleri LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımı tarafından belirlenmiştir. Tüm genler için R^2 değeri ≥ 0.99 'u sağlayana kadar RT-qPCR analizi tekrarlanmıştır (Şekil 3.13.d). RT-qPCR analizinin verimliliği program tarafından standart eğri çizelgesinde verilen eğim değeri kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.13.d). Her primer çifti için RT-qPCR verimliliği aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Wang vd., 2023).

$$E = (10^{(-1/slope)} - 1) \times 100 \quad (3.1)$$



Şekil 3.13. 6 farklı dilüsyonda hazırlanan cDNA'ların *GAPDH* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-qPCR analiz sonucunun LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımında incelenmesi; **a)** Erime eğrisi grafiği; **b)** Amplifikasyon eğrisi grafiği; **c)** Isı haritası (kırmızı kutular başarısız ya da negatif örnekler, yeşil kutucuklar başarılı amplifikasyon gösteren örnekler); **d)** Standart eğri grafiği (Slope-eğim değeri ve R² değeri)

3.2.7.2. RT-qPCR analizi ile genlerin ifadelerinin belirlenmesi

Standart eğri analizi sonucunda tüm primerler için 4, 5 ya da 6 dilüsyon cDNA ile $R^2 > 0.99$ sağlanmıştır ve 12 primer çifti için en verimli çalışılan cDNA konsantrasyonu 125 ng olarak belirlenmiştir. Ardından her iki ırktan (Gerze ve hibrit tavuk ırkları) toplanan 16 adet *Pectoralis major* kas dokusundan elde edilen cDNA'lardaki 11 adet genin ifade seviyesi (*GAPDH* endojen referans geni olarak kullanıldı) RT-qPCR analizi ile tespit edilmiştir. Gen ifadelerinin belirlenmesinde SYBR Green floresan tabanlı bir polimeraz kiti (RealQ Plus 2X Master Mix Green, Ampliqon, Denmark) ve Lightcycler 96 System (Roche, Switzerland) cihazı kullanılmıştır. Tüm RT-qPCR analiz reaksiyonları 96'lık plate içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her cDNA örneği 3 tekerrür olarak çalışılmıştır. Kit bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.8'de verilmiştir. RT-qPCR analizi için uygulanan sıcaklık döngü programı Çizelge 3.9'da verilmiştir. Analiz sonucunda her bir örnek ve tekerrür için çalışılan tüm primerler bakımından gen ifadesi miktarları C_q değerleri olarak LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımı tarafından belirlenmiştir. RT-qPCR analizi sonucundan elde edilen ampikonlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir (EK 73-80).

Çizelge 3.8. RT-qPCR analizi için kullanan kitin bileşenleri ve miktarları

Reaktif	Miktar
cDNA	125 ng
RealQ Pus 2X Master Mix	12.5 µl
Primer (Forward) (10 µM)	0.5 µl
Primer (Reverse) (10 µM)	0.5 µl
ddH ₂ O	25 µl'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.9. RT-qPCR analizi için uygulanan sıcaklık döngü programı

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	15 dakika	1
İki Aşamalı Amplifikasyon	95 °C 57-61 °C (Primere özgü bağlanma sıcaklığı)	30 saniye 30 saniye	40
Erime	95 °C	10 saniye	1

3.2.7.3. Göreceli kantitatif mRNA seviyelerinin belirlenmesi

Göreceli kantitatif mRNA seviyesinin belirlenmesinde bir dizi denklemden yararlanılmaktadır. Schmittgen ve Livak (2008) tarafından geliştirilen $2^{-\Delta C_q}$ yöntemi, kontrol ve muamele gruplarının ya da bir deneme grubunun zamana bağlı gen ifadesi değişikliklerinin ($2^{-\Delta C_q}$) karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının toplanan tüm doku örneklerine ait göreceli kantitatif mRNA seviyeleri $2^{-\Delta C_q}$ yöntemine göre hesaplanmıştır. Her iki tavuk ırkının büyüme boyunca sahip olduğu gen ifadesi değişimi $2^{-\Delta C_q(\text{ikinci dönem})} / 2^{-\Delta C_q(\text{ilk dönem})}$ (kat değişimi) yöntemine göre hesaplanmıştır (Schmittgen ve Livak, 2008). $2^{-\Delta C_q}$ değerinin hesaplanması için öncelikle RT-qPCR analizinin üstel fazında gerçekleşen amplifikasyonu tanımlayan ilk denklem oluşturulmuştur (3.1).

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n \quad (3.1)$$

X_n , amplifikasyonun n 'inci döngüsünde hedef mRNA'nın miktarını temsil etmektedir. X_0 , hedef mRNA'nın başlangıç miktarını temsil etmektedir. E_x , hedef mRNA'nın PCR verimliliğini ve n döngü sayısını temsil etmektedir. Eşik döngüsü (C_q), amplifiye edilen hedef mRNA miktarının sabit bir eşiğe ulaştığı kesirli döngü sayısıdır. Bu nedenle denklem aşağıdaki şekilde düzenlenmektedir;

$$X_q = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{q,x}} = K_x \quad (3.2)$$

X_q , hedef molekülün eşik sayısıdır. $C_{q,x}$, hedef mRNA'nın amplifikasyonu için eşik döngü sayısını temsil etmektedir ve K_x , bu denklemden elde edilen bir sabittir. Endojen referans gen için de benzer bir eşitlik oluşturulduğunda aşağıdaki denklem elde edilmektedir.

$$R_q = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{q,R}} = K_R \quad (3.3)$$

R_q , referans molekülün eşik sayısıdır. R_0 , referans mRNA'nın başlangıç miktarını temsil etmektedir. E_R , referans mRNA'nın PCR verimliliğini temsil etmektedir. $C_{q,R}$, referans mRNA'nın amplifikasyonu için eşik döngü sayısını temsil etmektedir ve K_R , bu denklemden elde edilen bir sabittir. X_q değeri R_q değerine bölündüğünde;

$$\frac{X_q}{R_q} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{-C_{q,x}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{-C_{q,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K \quad (3.4)$$

Hedef mRNA ve endojen referans mRNA amplifikasyon verimliliklerinin eşit olduğu varsayıldığında;

$$E_x = E_R = E \quad (3.5)$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{q,x} - C_{q,R}} = K \quad (3.6)$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_q} = K \quad (3.7)$$

X_N , hedef mRNA'nın normalize edilmiş miktarına eşittir (X_0/R_0) ve ΔC_q , hedef ve referans mRNA için C_q değerleri arasındaki farka ($C_{q,x} - C_{q,R}$) eşittir. Denklem yeniden düzenlendiğinde aşağıdaki eşitlik elde edilmektedir.

Yeniden düzenlenen denkleme göre;

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_q} \quad (3.8)$$

Buraya kadar oluşturulan denklemler aslında $2^{-\Delta C_q}$ değerini vermektedir. Çünkü hedef ve endojen referans mRNA'ların PCR verimliliklerinin 1'e yakın olması gerektiği bildirilmektedir ($E \sim 1$ ya da %93-105 arasında olması gerekmektedir (Nolan vd., 2006; Schmittgen ve Livak, 2008, Kuang vd., 2018)). Bu durumda denklem aşağıdaki son halini almaktadır;

$$\text{Göreceli Kantitatif mRNA miktarı} = 2^{-\Delta C_q} \quad (3.9)$$

Örneğin ADSL geninin Gerze ve hibrit tavuk ırkı için göreceli kantitatif ifade seviyesi aşağıdaki adımlar uygulanarak hesaplanmıştır;

$$\Delta C_{q\text{Gerze,ADSL}} = C_{q\text{ortalama,ADSL}} - C_{q\text{ortalamaGAPDH}} \text{ (normalizasyon)} = 2^{-\Delta C_{q\text{Gerze,ADSL}}}$$

$$\Delta C_{q\text{Hibrit,ADSL}} = C_{q\text{ortalama,ADSL}} - C_{q\text{ortalama,GAPDH}} \text{ değeri (normalizasyon)} = 2^{-\Delta C_{q\text{Hibrit,ADSL}}}$$

ADSL geninin Gerze tavuk ırkı için büyüme boyunca sergilediği göreceli kantitatif mRNAsinin kat değişimi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır;

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta Cq_{\text{Gerze son dönem, ADSL}}} / 2^{-\Delta Cq_{\text{Gerze ilk dönem, ADSL}}}$$

3.2.8. İstatistik analizler

Gerze ve hibrit tavuk ırklarından elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri bakımından ($2^{-\Delta Cq}$) ırk içi ya da ırklar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı SPSS v.23 yazılımı kullanılarak bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiştir (Schmittgen ve Livak, 2008; Zhang vd., 2012). İki örneklem grubunun ortalamasını karşılaştırmak için kullanılan bağımsız örneklem t-testi aşağıdaki bir dizi hesaplama ile analiz edilmektedir (Kim, 2015; Ross ve Willson, 2017).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad (3.12)$$

$$t = df = n_1 + n_2 - 1 \quad (3.13)$$

$$s_1^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_1} (x_j - \bar{x}_1)^2}{n_1 - 1} \quad (3.14)$$

$$s_2^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_2} (x_j - \bar{x}_2)^2}{n_2 - 1} \quad (3.15)$$

t: t değeri

df: Serbestlik derecesi

x₁: 1. grubun ortalaması

x₂: 2. grubun ortalaması

s₁: 1. grubun varyans değeri

s₂: 2. grubun varyans değeri

n₁: 1. grubun örnek sayısı

n₂: 2. grubun örnek sayısı

Normal dağılım göstermeyen veriler parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile SPSS v.28 yazılımında hesaplanmıştır (McKnight ve Najab, 2010).

$$U = n_1 n_2 \frac{n_1 + 1}{2} - R_1 \quad (3.16)$$

U: U değeri

n₁: 1. grubun örnek sayısı

n₁: 2. grubun örnek sayısı

R₁: 1. grubun sıralanmış değerlerinin toplamı

Gen ifadesi üzerine ırk, yaş ve ırk*yaş interaksiyonun etkisinin önem seviyesi tek değişkenli varyans analizi SPSS v.28 yazılımının Genel Doğrusal Model modülü ile test edilmiştir (SPSS, 2007). Grup varyansları (3.17) ve standart sapma değerleri (3.18) aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır (Lee vd., 2015; Kim vd., 2015).

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2 \quad (3.17)$$

σ^2 : Varyans değeri
 x_i : i'ninci değer
 μ : Grup ortalaması
 N : Gruptaki örnek sayısı

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2} \quad (3.18)$$

σ : Standart sapma değeri
 x_i : i'ninci değer
 μ : Grup ortalaması
 N : Gruptaki örnek sayısı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. RNA Örneklerinin Saflık ve Yoğunluklarının Tespit Edilmesi

Çalışmada kullanılan doku örneklerinin toplanması için her iki örneklem döneminde Gerze ve hibrit tavuk ırklarının canlı ağırlıkları ölçülmüştür. Gerze tavuk ırkı için ilk ve ikinci örneklem dönemi canlı ağırlıkları sırasıyla $691 \pm 26,78$ g ve $1865 \pm 35,66$ g, hibrit tavuk ırkı için ilk ve ikinci örneklem dönemi canlı ağırlıkları sırasıyla $891 \pm 15,79$ g ve $2145 \pm 22,47$ g olarak tespit edilmiştir. Her iki tavuk ırkından ortalama canlı ağırlığa sahip 4 dişi bireyin *Pectoralis major* kas dokusundan doku örnekleri toplanarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Nükleik asitlerin saflıklarının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçümler sonucunda 260/280 ve 260/230 nm dalga boyunda elde edilen absorbans oranları değerlendirilmektedir. 260/280 nm dalga boyundaki absorbans oranının RNA için ~2.0 olması saflık değerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu oranın DNA’da ~1.8 olmasının nedeni timin nükleotidinin urasil nükleotidine göre daha düşük bir absorbans oranına sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Timin: 1.47; Urasil: 4.00) (Sanchez vd., 2015). 260/230 nm dalga boyundaki absorbans oranı, nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Beklenen 260/230 değerleri genellikle 2.0-2.2 aralığında olmalıdır (Sanchez vd., 2015). Gerze ve hibrit tavuk ırklarının *Pectoralis major* kas dokusundan elde edilen RNA örneklerinin saflık ve yoğunları Çizelge 4.1’de verilmiştir. RNA izolasyonu sonrası örneklerin 260/280 ve 260/230 nm dalga boyundaki absorbans oranları izole edilen RNA’ların “saf” olarak nitelendirilebilecek aralıklarda olduğunu göstermektedir. RNA örneklerinin miktarları 167 ng – 1.2 µg arasında tespit edilmiştir. Her örnek için elde edilen RNA miktarları, cDNA sentezi için yeterli miktarda RNA izolasyonu gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.1. Gerze tavuk ırkının ve ticari hibrit ırkın *Pectoralis major* kas dokusundan elde edilen RNA örneklerinin saflık ve yoğunlukları

İrk	Örnek Kodu	260/230	260/280	Yoğunluk (ng/µl)
Gerze	43	2.02	2.04	296
Gerze	28	2.16	2.04	706
Gerze	32	2.09	2.00	196
Gerze	42	2.11	2.01	256
Gerze	31	2.09	2.09	300
Gerze	33	2.19	2.00	1116
Gerze	34	2.17	2.06	1204
Gerze	39	2.10	2.04	608
Hibrit	4H1	2.17	2.04	392
Hibrit	4H2	2.16	2.01	303
Hibrit	4H3	2.18	2.03	274
Hibrit	4H4	2.19	2.01	696
Hibrit	8H1	2.15	2.01	136

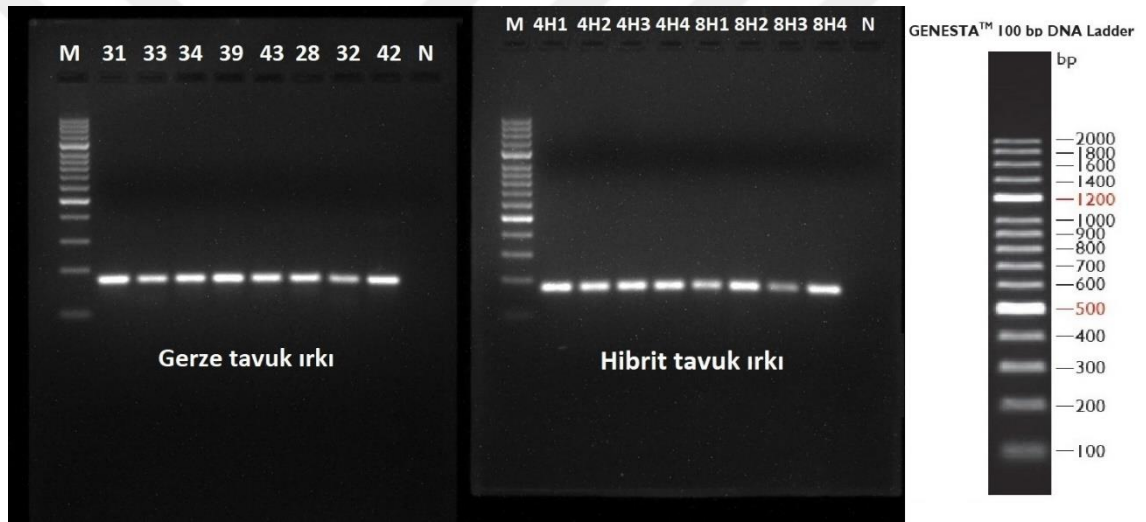
Devamı Arkada

Çizelge 4.2'in devamı

Hibrit	8H2	2.19	2.04	1470
Hibrit	8H3	2.13	2.01	167
Hibrit	8H4	2.17	2.04	855

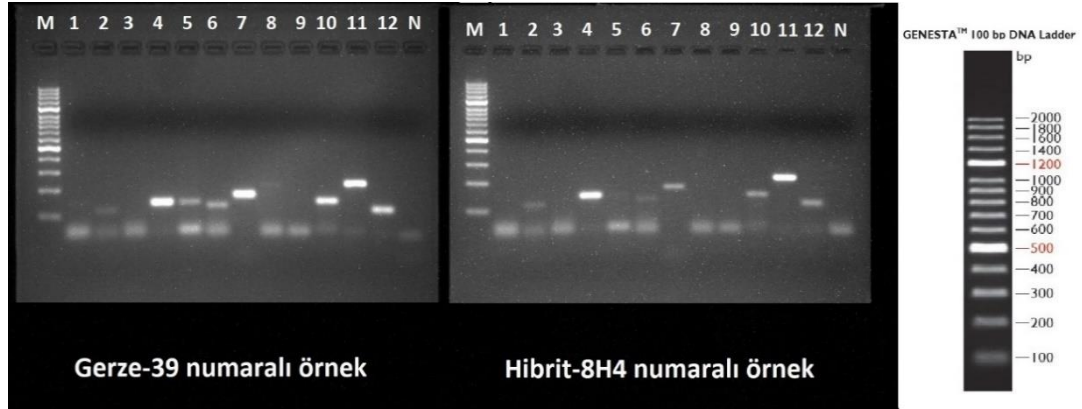
4.2. RT-PCR Analizi (cDNA ve Primerlerin Kontrol Edilmesi)

Gerze tavuk ırkına ve hibrit ırka ait 16 adet RNA örneğinden (Gerze: 8, Hibrit: 8) RT-PCR analizi kullanılarak cDNA elde edilmiştir ve tüm cDNA örneklerinin kontrol edilmesi amacıyla endojen referans geni olarak seçilen *GAPDH* genine özgü tasarlanan primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR sonrası örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek *GAPDH* geni için hedeflenen bölgenin (174 bp) tüm örneklerde başarılı bir şekilde çoğaltıldığı doğrulanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin *GAPDH* primerleri ile çoğaltılan ampliconlarının agaroz jel görüntüsü; Genesta 100 bp ladder (GeneAll, Korea)

Daha sonra 12 adet genin mRNA dizisine özgü tasarlanan primerler kullanılarak Gerze tavuk ırkı için 39 numaralı örnek, hibrit tavuk ırkı için 8H4 numaralı örneklerde PCR uygulanmıştır. PCR sonrası elde edilen ampliconlar agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Yalnızca 4 gen için amplifikasyon tespit edilememiştir. Ancak diğer tüm primerler başarılı bir şekilde bağlanarak beklenen fragment büyüklüğü aralıklarında (115 bp ile 223 bp arasında) ampliconlar çoğaltılmıştır.



Şekil 4.2. 39 ve 8H4 numaralı örneklerin 12 adet primer kullanılarak yapılan PCR analizinden elde edilen ampliconlara ait agaroz jel görüntüsü: **1) SCD; 2) LPL; 3) ENTPD8; 4) AMPD1; 5) CAPN3; 6) MSTN; 7) GAPDH; 8) ATIC; 9) PPAR γ ; 10) ADSL; 11) AK1; 12) FOXO3; N) Negatif; Genesta 100 bp ladder (GeneAll, Korea)**

RT-qPCR analizinde düşük miktarda dahi gen ifadesi tespit edilebilirken, geleneksel PCR’da tespit edilememesinin birçok nedeni vardır. Bunlardan bazıları; dokulardan örnekleme yapıldığı dönemde hedeflenen genin ifade edilmemiş olması ya da agaroz jelde tespit edilemeyecek kadar az yoğunlukta olması, PCR ile RT-qPCR analizleri arasındaki uygulama, döngü sayısı ve sistem farklılıkları olarak örneklendirilebilir. Bu nedenle bant tespit edilemeyen genlerin aslında diğerlerinden daha az ifade edilmiş olma ihtimali göz önüne alınarak bir sonraki aşamada tüm genlerin RT-qPCR analiziyle ifadelerinin tespit edilmesi uygun görülmüştür.

4.3. RT-qPCR Analizi

RT-PCR analiziyle Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin ve 12 adet primer çiftinin kontrol edilip doğrulanmasından sonra tüm cDNA örnekleri ve tüm genler için RT-qPCR analizi aşamasına geçilmiştir. RT-qPCR analizinde öncelikle primerlerin PCR verimliliğini tespit etmek ve PCR verimliliği açısından doğru cDNA konsantrasyonunu belirlemek için bir ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmada Gerze tavuk ırkının 43 numaralı örneğine ait cDNA numunesi kullanılmıştır. 6 dilüsyon serisi (1:10, 1:8 (*SCD* primer çifti için) ve 1:4 (*CAPN3* primer çifti için) oranlarda) olarak hazırlanan cDNA örnekleri ile tüm primer çiftleri kullanılarak RT-qPCR analizi yapılmıştır. Böylece sabit primer konsantrasyonuna karşılık seyreltilmiş cDNA örneklerinin PCR verimlilikleri, standart eğri, erime eğrisi ve amplifikasyon eğrisi grafikleri elde edilmiştir.

4.3.1. Standart eğri

Gerze ırkına ait 43 numaralı örneğin 6 farklı dilüsyonda (125 ng, 12,5 ng, 1,25 ng, 0,125 ng, 0,0125 ng, 0,00125 ng) seyreltilen cDNA numuneleri, 12 primer çifti kullanılarak RT-qPCR’da analiz edilmiştir. Analiz sonucunda LightCycler® 96 SW 1.1 yazılımı kullanılarak cDNA dilüsyonuna karşılık gelen C_q değerleri ile standart eğri grafikleri oluşturulmuştur. PCR verimlilikleri, standart eğri grafiğinde verilen eğim (slope) değerleri üzerinden hesaplanmıştır.

Literatürde kabul edilebilir RT-qPCR amplifikasyon verimliliği, %93 ile %105 arasında, eğim değeri -3,2 ile -3,5 arasında ve $R^2 \geq 0,98$ olarak bildirilmiştir (Nolan vd., 2006; Kuang vd., 2018). Eğim değeri her bir cDNA girdisinin log10 değerine karşılık, amplifikasyon sonucunda elde edilen C_q değerlerinin oluşturduğu eğimdir (Kuang vd., 2018). Literatürde, 20 ile 30 arasında C_q değeri ile sonuçlanan RT-qPCR analizi için primer ve cDNA konsantrasyonlarının ana çalışma için seçilmesi önerilmektedir (Nolan vd., 2006). Ancak C_q değeri yüksek olan reaksiyonlarda, qPCR reaksiyonlarını farklı primer konsantrasyonları ile çalıştırmak ve en düşük C_q değerini veren konsantrasyonu kullanmak gerektiği bildirilmiştir (Kuang vd., 2018).

Yapılan doktora tez çalışmada her primer çifti için 6 farklı dilüsyonda cDNA kullanılarak standart eğri grafikleri oluşturulmuştur (EK-1; EK-12). *CAPN3* ve *SCD* genine özgü primerler kullanılarak 1:10 oranında 6 dilüsyon seyreltilen cDNA ile yapılan RT-qPCR analizi başarısız sonuçlanmıştır. Bu nedenle *CAPN3* primerleri için 1:4, *SCD* primerleri için 1:8 oranında 6 dilüsyon cDNA kullanılarak analiz tekrar edilmiştir.

Standart eğri analiz sonuçlarına göre; *AK1* ve *GAPDH* genleri için yapılan RT-qPCR analizinde ilk 6 dilüsyon cDNA'da amplifikasyon tespit edilirken, *AMPD1*, *ADSL* ve *CAPN3* geni için ilk 5 dilüsyon cDNA'da amplifikasyon tespit edilmiştir. *SCD*, *ENTPD8*, *ATIC*, *PPAR γ* , *MSTN*, *FOXO3* ve *LPL* genleri için ilk 4 dilüsyon cDNA'da amplifikasyon tespit edilmiştir.

AK1, *AMPD1*, *ADSL*, *SCD*, *ENTPD8*, *ATIC*, *MSTN*, *FOXO3* ve *LPL* genleri için R^2 değeri 0.99 olarak hesaplanırken, *GAPDH*, *CAPN3* ve *PPAR γ* genleri için R^2 değeri 1.00 olarak hesaplanmıştır. Standart eğri grafiğindeki eğim değeri, tüm primer çiftleri için -3,1899 ile -3,47 olarak elde edilmiştir. Primerlerin RT-qPCR verimliliği ($E = (10^{(-1/\text{eğim})} - 1) \times 100$) %94,17 ile 105,82 aralığında tespit edilmiştir. Dolayısıyla, tüm primer çiftleri için literatürde belirtilen kabul edilebilir PCR verimlilikleri sağlanmıştır.

4.3.2. Erime eğrisi

Literatürde iyi tasarlanmış bir primer çiftinin RT-qPCR analizi sonucunda spesifik olarak tek bir ürün amplifiye edeceği bildirilmiştir (Bustin vd., 2009; Adams vd., 2020). Bu doktora tez çalışmada tüm primerler için öncelikle standart eğri analizi gerçekleştirilmiş ve bu analizden primerlerin spesifikliğini kontrol etmek amacıyla erime eğrisi grafikleri elde edilmiştir (EK-13; EK-24). Tüm erime eğrisi grafiklerinde beklenen sıcaklıklardan tek tipte pikler elde edilmiştir. Bu sonuçlar primerlerin tek ampikon ürettiklerini, herhangi bir gDNA kontaminasyonu ya da spesifik olmayan ampikonların çoğaltılmadığını doğrulamaktadır.

4.3.3. Amplifikasyon eğrisi

Bu çalışmada 6 farklı dilüsyonda hazırlanan cDNA örnekleriyle (Gerze ırkına ait 43 numaralı cDNA örneği) 12 adet gen için tasarlanan primer çiftleri kullanılarak yapılan standart eğri analizinden amplifikasyon eğrisi grafikleri de elde edilmiştir (EK-25; EK-36). Tespit edilen C_q değerleri cDNA dilüsyonu azaldıkça artış göstermiştir. Bu durum düşük cDNA konsantrasyonlarında floresans sinyali almak için daha fazla PCR döngüsüne ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bu nedenle endojen referans gen olarak seçilen *GAPDH* primer çifti için tüm cDNA dilüsyonlarında amplifikasyon tespit edilirken (6 dilüsyon için C_q değerleri 15-32 arasında), hedef genlerden biri olan *CAPN3*

primer çifti için 5 dilüsyonda (25-32), SCD primer çifti için sadece 4 dilüsyonda (C_q değerleri 29-39 arasında) amplifikasyon tespit edilmiştir.

Sonuç olarak 12 gen için ilk 4, 5 ve 6 dilüsyon cDNA'dan başarılı bir şekilde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. 43 numaralı örnekten elde edilen bu sonuçlar kullanılan primer konsantrasyonunun uygulanan cDNA dilüsyonlarında başarılı bir şekilde amplifikasyon gerçekleştirdiğini göstermiştir. Bu doğrultuda çalışmanın bir sonraki aşamasında diğer cDNA örneklerinde, 12 adet genin en düşük ifade seviyelerinde dahi tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle 16 adet *Pectoralis major* kas dokusundan elde edilen cDNA örnekleri 1:1 oranda seyreltilerek (son hacimde 125 ng olacak şekilde) ana çalışmaya başlanmıştır.

4.4. RT-qPCR Analizi ile Genlerin İfadelerinin Belirlenmesi

Gerze ve hibrit tavuk ırklarının her iki örneklem dönemine ait gen ifadesi analizi sonucunda elde edilen veri sonuç ekranı, erime eğrisi ve amplifikasyon eğrisi grafikleri ilk örneklem dönemi için EK-37-48 ve ikinci örneklem dönemi için EK-49-60'ta verilmiştir. Erime eğrisi grafikleri hedef mRNA fragmentleri dışında bir amplifikasyon olmadığını (her gen için özgün sıcaklıklarda oluşan özdeş pikler) göstermiştir. Ayrıca 12 farklı genin oluşturduğu amplifikasyon eğrileri, hedef mRNA'ların (özdeş cDNA konsantrasyonları) benzer PCR verimliliklerine sahip olduğunu göstermiştir (Schmittgen ve Livak, 2008). Gerze ve hibrit tavuk ırklarından iki örneklem döneminde toplanan doku örneklerine ait 12 adet genin RT-qPCR analizi sonuçları, C_q (minimum, maksimum, ortalama) ve ΔC_q değerleri olarak sırasıyla Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. Tüm doku örnekleri için yapılan analizler değerlendirildiğinde elde edilen minimum ve maksimum C_q değerleri (sırasıyla 15.16 ve 39.04) literatürde bildirilen kullanılabilir referans C_q değerleri arasında yer almaktadır (Burns ve Valdivia, 2008; Bustin vd., 2009).

Çizelge 4.3. Gerze tavuk ırkının iki örneklem döneminden elde edilen C_q değerleri ile ΔC_q değerleri

Gerze (10 haftalık yaş)	GAPDH	ADSL	PPARG	ATIC
Minimum C_q	16.83	23.38	28.04	30.29
Maksimum C_q	17.36	24.63	34.32	32.05
Ortalama $C_q \pm SS$	17.07 $\pm$ 0.8	23.95 $\pm$ 0.39	31.01 $\pm$ 1.98	30.91 $\pm$ 0.65
Ortalama $\Delta C_q \pm SS$		6.875 $\pm$ 0.49	13.94 $\pm$ 1.91	13.83 $\pm$ 0.77
	GAPDH	ENTPD8	SCD	AMPD1
Minimum C_q	15.83	34.75	27.77	21.98
Maksimum C_q	17.64	36.43	30.72	22.94
Ortalama $C_q \pm SS$	16.94 $\pm$ 0.66	35.65 $\pm$ 0.52	29.57 $\pm$ 1.10	22.45 $\pm$ 0.35
Ortalama $\Delta C_q \pm SS$		18.70 $\pm$ 0.69	12.62 $\pm$ 1.59	5.51 $\pm$ 0.95
	GAPDH	MSTN	CAPN3	LPL
Minimum C_q	16.66	24.74	22.8	29.76
Maksimum C_q	17.11	27.9	25.27	32.19
Ortalama $C_q \pm SS$	16.910 $\pm$ 0.14	26.67 $\pm$ 1.24	23.53 $\pm$ 1.00	30.76 $\pm$ 0.9
Ortalama $\Delta C_q \pm SS$		9.76 $\pm$ 1.15	6.61 $\pm$ 0.97	13.85 $\pm$ 0.88

Devamı Arkada

Çizelge 4.2'nin devamı

	GAPDH	AK1	FOXO3	
Minimum C _q	17.11	20.25	23.99	
Maksimum C _q	17.76	21.59	26.12	
Ortalama C _q ± SS	17.40±0.19	20.94±0.5	24.73±0.79	
Ortalama ΔC _q ± SS		3.53±0.64	7.32±0.81	
Gerze (20 haftalık yaş)	GAPDH	ADSL	PPARG	ATIC
Minimum C _q	15.16	21.73	29.85	28.67
Maksimum C _q	17.33	23.61	32.88	30.57
Ortalama C _q ± SS	16.31±0.76	22.80±0.64	31.70±0.9	29.65±0.59
Ortalama ΔC _q ± SS		6.48±0.22	15.38±0.7	13.34±0.27
	GAPDH	ENTPD8	SCD	AMPD1
Minimum C _q	16.11	34.63	28.5	21.38
Maksimum C _q	17.34	36.79	30.59	22.17
Ortalama C _q ± SS	16.55±0.44	35.52±0.67	29.72±0.72	21.74±0.32
Ortalama ΔC _q ± SS		18.97±0.65	13.17±0.77	5.18±0.37
	GAPDH	MSTN	CAPN3	LPL
Minimum C _q	15.92	24.49	22.3	28.71
Maksimum C _q	17.69	25.3	23.11	30.04
Ortalama C _q ± SS	16.93±0.62	24.91±0.29	22.81±0.28	29.38±0.48
Ortalama ΔC _q ± SS		7.97±0.53	5.87±0.39	12.45±0.20
	GAPDH	AK1	FOXO3	
Minimum C _q	16.45	21.87	25.12	
Maksimum C _q	18.93	23.93	26.64	
Ortalama C _q ± SS	17.74±0.82	22.79±0.73	26.12±0.58	
Ortalama ΔC _q ± SS		5.05±0.23	8.37±0.43	

SS: Standart sapma

NOT: ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Hibrit tavuk ırkının iki örneklem döneminden elde edilen C_q değerleri ile ΔC_q değerleri

Hibrit (4 haftalık yaş)	GAPDH	ADSL	PPARG	ATIC
Minimum C _q	16.94	25.93	32.51	31.99
Maksimum C _q	18.08	27.86	37.05	36.91
Ortalama C _q ± SS	17.62±0.42	26.87±0.65	34.83±1.66	34.24±1.80
Ortalama ΔC _q ± SS		9.25±0.42	17.21±1.66	16.62±1.52
	GAPDH	ENTPD8	SCD	AMPD1
Minimum C _q	16.94	36.36	31.25	23.05
Maksimum C _q	17.58	39.04	35.13	28.07
Ortalama C _q ± SS	17.38±0.21	37.89±0.67	33.32±1.40	25.15±1.56
Ortalama ΔC _q ± SS		20.51±0.71	15.94±1.28	7.77±1.75

Devamı Arkada

Çizelge 4.3'ün devamı

	GAPDH	MSTN	CAPN3	LPL
Minimum C _q	16.92	29.63	25.63	31.59
Maksimum C _q	17.73	36.98	30.70	36.13
Ortalama C _q ± SS	17.41±0.31	32.51±2.90	27.82±1.76	33.43±1.65
Ortalama ΔC _q ± SS		15.10±2.66	10.41±1.52	16.02±1.43
	GAPDH	AK1	FOXO3	
Minimum C _q	17.40	21.87	24.87	
Maksimum C _q	18.81	25.37	29.81	
Ortalama C _q ± SS	18.07±0.47	23.26±1.23	27.03±1.75	
Ortalama ΔC _q ± SS		5.19±1.02	8.96±1.52	
Hibrit (8 haftalık yaş)	GAPDH	ADSL	PPARG	ATIC
Minimum C _q	15.65	24.74	28.99	30.16
Maksimum C _q	18.41	27.53	36.18	33.89
Ortalama C _q ± SS	17.02±1.06	26.21±1.04	32.53±2.07	31.72±1.33
Ortalama ΔC _q ± SS		9.19±0.8	15.51±1.50	14.70±0.78
	GAPDH	ENTPD8	SCD	AMPD1
Minimum C _q	16.06	35.48	30,89	21,13
Maksimum C _q	17.55	37.50	33,03	24,26
Ortalama C _q ± SS	16.77±0.54	36.58±0.57	32,26±0.71	22,73±1.11
Ortalama ΔC _q ± SS		19.81±0.53	15,49±0.51	5,96±0.80
	GAPDH	MSTN	CAPN3	LPL
Minimum C _q	15,98	25.97	26.83	30.02
Maksimum C _q	18,19	32.94	28.88	33.76
Ortalama C _q ± SS	17,08±0.84	29.23±2.46	27.52±0.8	31.64±1.23
Ortalama ΔC _q ± SS		12.16±1.8	10.45±1.43	14.56±0.51
	GAPDH	AK1	FOXO3	
Minimum C _q	17.06	22.94	26.46	
Maksimum C _q	19.19	26.30	30.92	
Ortalama C _q ± SS	17.93±0.78	24.22±1.20	28.64±1.58	
Ortalama ΔC _q ± SS		6.29±0.47	10.71±0.99	

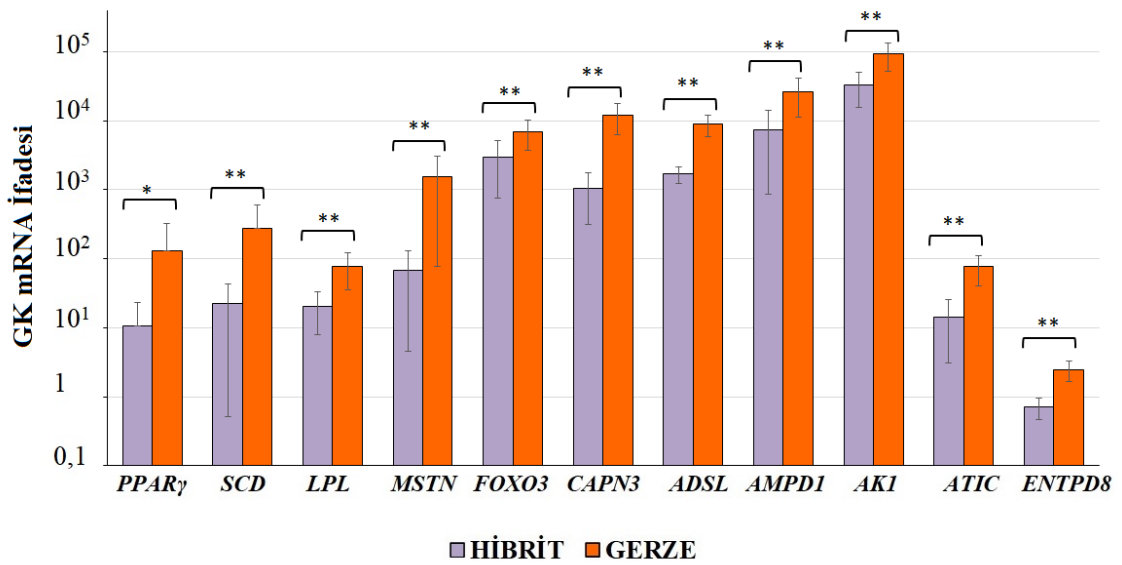
SS: Standart sapma

NOT: ΔC_q değerleri, hedef genin C_q değerinden endojen referans genin C_q değeri çıkarılarak hesaplanmıştır.

11 adet genin mRNA seviyeleri, Gerze ve hibrit tavuk ırklarının iki farklı büyüme döneminden elde edilen C_q değerlerinden $2^{-\Delta C_q}$ değerinin hesaplanmasıyla belirlenmiştir (Schmittgen ve Livak, 2008). Elde edilen ifade seviyeleri “göreceli kantitatif (GK) mRNA seviyeleri” olarak tanımlanmıştır ve sonuçlar $2^{-\Delta C_q} \times 1000000$ şeklinde logaritmik ölçekte sunulmuştur (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6). Elde edilen $2^{-\Delta C_q}$ değerleri bakımından ırklar arasında ve her ırkın büyüme dönemleri arasındaki fark bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca, her iki ırkın büyüme sonunda gösterdikleri gen ifadesi seviyelerindeki değişiklikler log₂ tabanında hesaplanarak kat değişimi şeklinde sunulmuş (Jebessa vd., 2018) (Şekil 4.7); elde edilen gen ifadesi seviyelerine ırk,

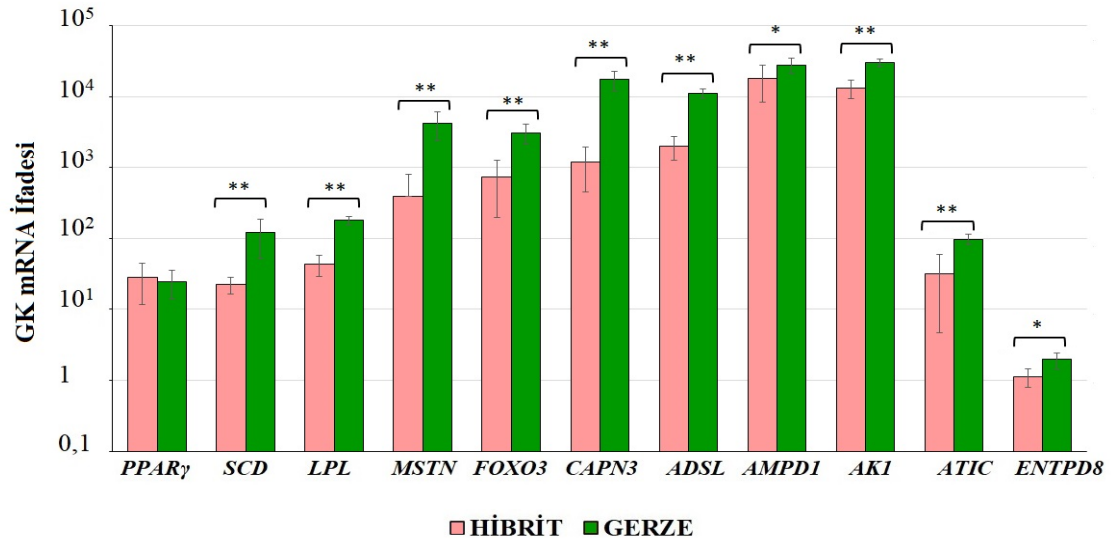
yaş ve ırk*yaş interaksiyonun etkisi tek değişkenli varyans analizi ile test edilmiştir (Çizelge 4.4).

İlk örneklem döneminden (Gerze; 10 haftalık yaş, Hibrit; 4 haftalık yaş) elde edilen mRNA seviyelerinin normal dağılım testi istatistikleri EK-61’de verilmiştir. Normal dağılım gösteren *ADSL*, *LPL*, *AK1* ve *FOXO3* genlerine t-testi uygulanmıştır (EK-62). T-testi sonucunda iki ırk arasında 4 genin de ifade seviyelerindeki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.001$). Normal dağılım göstermeyen diğer genler için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Test sonucunda diğer 7 genin de ifade seviyelerindeki farklar anlamlı bulunmuştur (EK-63) ($P<0.05$ ve $P<0.001$). Elde edilen veriler, ilk örneklem dönemi için tüm genlerin hibrit ırka kıyasla Gerze tavuk ırkında anlamlı seviyede daha fazla ifade edildiğini göstermiştir (Şekil 4.3).



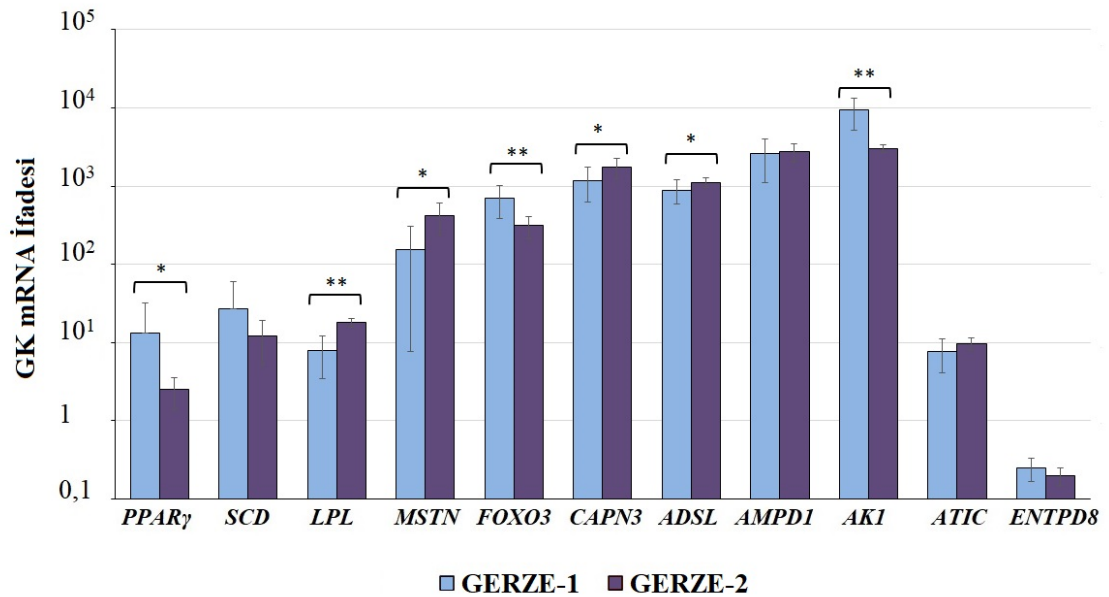
Şekil 4.3. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: $P<0.05$, **: $p<0.001$).

İkinci büyüme döneminden (Gerze; 20 haftalık yaş, Hibrit; 8 haftalık yaş) elde edilen mRNA seviyelerinin normal dağılım testi istatistikleri EK-64’te verilmiştir. Normal dağılım gösteren *ADSL*, *ENTPD8*, *SCD*, *AMPD1*, *LPL* ve *AK1* genlerine t-testi uygulanmıştır (EK-65). T-testi sonucunda 6 genin de ifade seviyelerindeki farklar önemli bulunmuştur ($P<0.05$ ve $P<0.001$). Normal dağılım göstermeyen diğer genler için Mann-Whitney U testi uygulanmış (EK-66), test sonucunda *PPARγ* geni hariç diğer genlerin ifade seviyelerindeki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.001$). Elde edilen veriler, *PPARγ* geni hariç diğer genlerin hibrit ırka kıyasla Gerze tavuk ırkında anlamlı seviyede daha fazla ifade edildiğini göstermektedir ($P<0.05$ ve $P<0.001$). *PPARγ* geninin ifade seviyesi Gerze tavuk ırkında hibrit ırka kıyasla daha az saptanmış ancak bu fark anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.4).



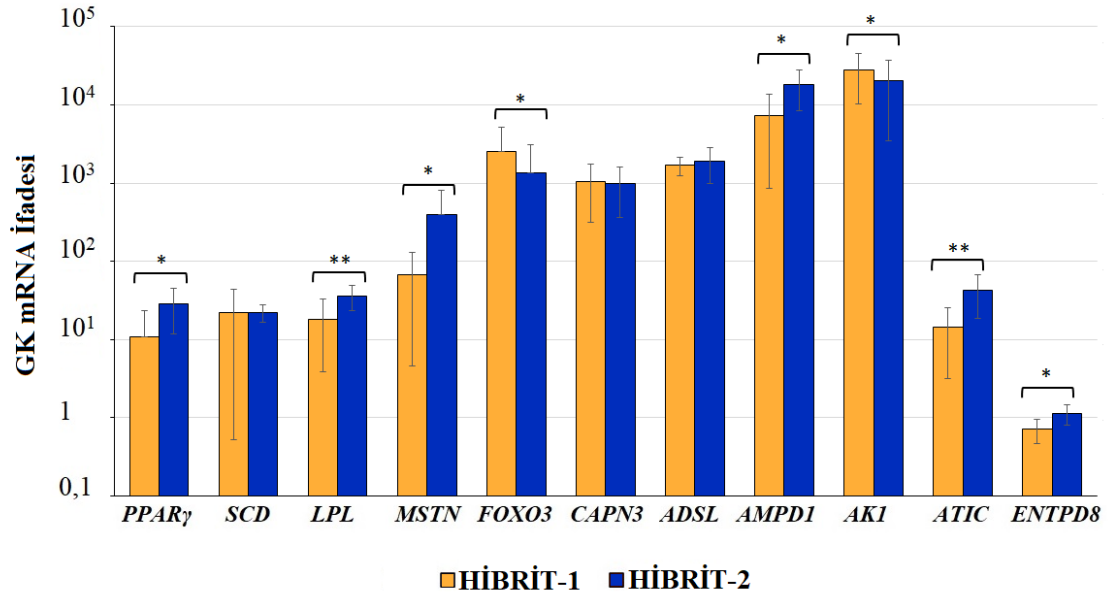
Şekil 4.4. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ikinci örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: $P<0.05$, **: $p<0.001$).

Gerze tavuk ırkının iki yaş dönemi örnekleminden (10 haftalık yaş ve 20 haftalık yaş) elde edilen mRNA seviyelerinin normal dağılım testi sonuçları EK-67’de verilmiştir. *ADSL*, *ATIC*, *ENTPD8*, *AMPD1*, *LPL*, *AK1* ve *FOXO3* genleri bakımından yaş dönemleri arasındaki fark t-testi ile analiz edilmiştir (EK-68). T-testi sonucunda *ADSL*, *LPL*, *AK1* ve *FOXO3* genlerinin ifade seviyelerindeki farklar anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$ ve $P<0.001$). Normal dağılım göstermeyen diğer genler için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır (EK-69). Test sonucuna göre *PPARγ*, *MSTN* ve *CAPN3* genlerinin ifade seviyelerindeki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.5).



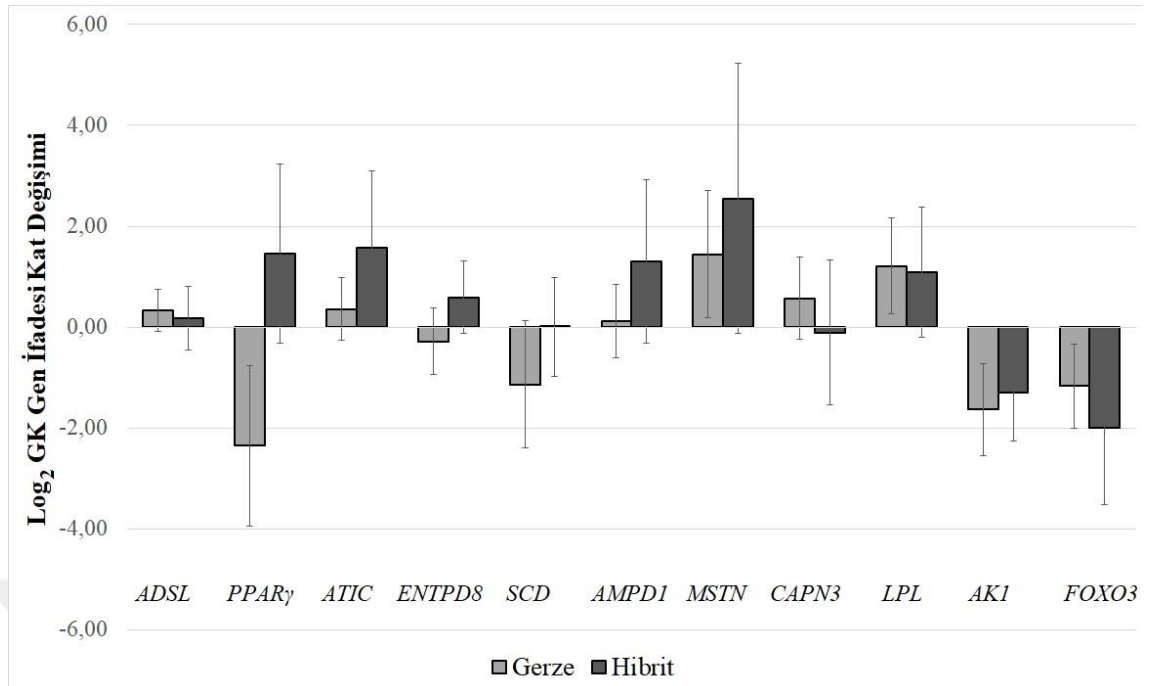
Şekil 4.5. Gerze tavuk ırkının her iki örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: $P<0.05$, **: $p<0.001$).

Hibrit tavuk ırkının iki yaş dönemi örnekleminde (4 haftalık yaş ve 8 haftalık yaş) elde edilen mRNA seviyelerinin normal dağılım testi istatistikleri EK-70’te verilmiştir. *ADSL*, *LPL* ve *AK1* genlerinin yaş dönemleri arasındaki ifade edilme farkı t-testi ile analiz edilmiştir (EK-71). T-testi sonucunda *LPL* ve *AK1* genlerinin ifade seviyelerindeki fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.001$). Normal dağılım göstermeyen diğer genler için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır (EK-72). Test sonucunda *PPAR γ* , *ATIC*, *ENTPD8*, *AMPD1*, *MSTN* ve *FOXO3* genlerinin ifade seviyelerindeki fark anlamlı bulunmuştur ($P < 0.001$ ve $P < 0.05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Hibrit tavuk ırkının her iki örneklem döneminden 11 adet gen için elde edilen göreceli kantitatif mRNA seviyeleri (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$).

Gerze ve hibrit tavuk ırkının iki örneklem dönemindeki gen ifadesi seviyeleri kat değişimi olarak incelenmiştir (Şekil 4.7). Gerze tavuk ırkında en fazla artış gösteren gen *MSTN* iken, en fazla azalma gösteren gen *PPAR γ* ’dır. Hibrit tavuk ırkında en fazla artış gösteren gen yine *MSTN* iken, en fazla azalma gösteren gen *FOXO3* olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, iki ırk birlikte değerlendirildiğinde *PPAR γ* , *ENTPD8*, *SCD* ve *CAPN3* genlerinin ifadeleri birbirine zıt yönelim göstermiştir. Gerze tavuk ırkında bu genler arasında sadece *CAPN3* geninde artış gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem dönemine kıyasla sahip oldukları $\log_2$ tabanında göreceli kantitatif gen ifadesinin kat değişimi

Gerze ve hibrit tavuk ırklarında tespit edilen gen ifadesi seviyelerine yaş, ırk ve yaş*ırk etkileri tek değişkenli varyans analizi ile test edilmiştir. Çizelge 4.2’de her iki ırkın gen ifadelerinin ortalaması ve standart sapma değerleri önem seviyeleri ile birlikte sunulmuştur. Tek değişkenli varyans analizi sonucunda *ENTPD8* ve *SCD* genlerinin ifade seviyelerinin sadece ırk faktöründen etkilendiği, *ADSL*, *ATIC*, *AMPD,1* *FOXO3* genlerinin ırk ve yaş faktörlerinden etkilendiği, *PPAR γ* gen ifadesinin ırk ve ırk*yaş etkisiyle etkilendiği ve *MSTN*, *CAPN3*, *LPL* ve *AK1* genlerinin ifade seviyelerinin ırk, yaş ve ırk*yaş etkisiyle etkilendiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının iki örneklem dönemi için gen ifadelerinin ($2^{-\Delta C_q}$) ortalama değerleri üzerine ırk, yaş ve ırk*yaş interaksyonu faktörlerinin etkisine ilişkin tek değişkenli varyans analiz tablosu

	Yaş (hafta)	N	ADSL±SS	PPARγ±SS	ATIC±SS	ENTPD8±SS
İrk			**	*	**	**
Gerze	10	4	0.00895921± 0.00289841	0.00013544± 0.000169973	0.00007650± 0.00003303	0.00000259± 0.00000118
	20	4	0.01124643± 0.001807471	0.00002648± 0.00001717	0.00009800± 0.000193017	0.00000213± 0.00000095
Hibrit	4	4	0.00170357± 0.00045533	0.00001141± 0.00001168	0.00001453± 0.00001033	0.00000076± 0.000000049
	8	4	0.00192602± 0.00084158	0.00003140± 0.00002653	0.00004301± 0.00002263	0.00000115± 0.00000040
Yaş			*	ÖD	**	ÖD
1	10/4	8	0.00533139± 0.00422495	0.00007342± 0.00013378	0.00004552± 0.00003968	0.00000168± 0.00000129
2	20/8	8	0.00663644± 0.00488758	0.00002892± 0.00002200	0.00007035± 0.00003454	0.00000163± 0.00000086
İrk x Yaş			ÖD	*	ÖD	ÖD
Genel ortalama		16	0.00598392± 0.00456729	0.00005117± 0.00009747	0.00005793± 0.00003888	0.0000165± 0.00000108
	Yaş (hafta)	N	SCD±SS	AMPD1±SS	MSTN± SS	CAPN3± SS
İrk			**	**	**	**
Gerze	10	4	0.00027137± 0.000293113	0.02592937± 0.01353382	0.00156215± 0.00134221	0.01189384± 0.00519855
	20	4	0.00012358± 0.00006708	0.02821070± 0.006589151	0.00423970± 0.00174309	0.01761005± 0.00492304
Hibrit	4	4	0.00002295± 0.00002164	0.00746971± 0.00632112	0.00006761± 0.00000057	0.00105584± 0,00072
	8	4	0.00002295± 0.00000737	0.01834527± 0.00919280	0.00039631± 0.00037497	0.00098070± 0.00067196
Yaş			ÖD	*	**	*
1	10/4	8	0.00014716± 0.00023961	0.01669954± 0.01398584	0.00081488± 0.00120244	0.00647484± 0.00661928
2	20/8	8	0.00007216± 0.00006765	0.2310971± 0.00943041	0.00231800± 0.00231815	0.00939898± 0.00906423
İrk x Yaş			ÖD	ÖD	**	*
Genel ortalama		16	0.00010966± 0.00017825	0.001990463± 0.01223652	0,00156644± 0.00197842	0.00793691± 0.00798940

Devamı Arkada

Çizelge 4.5'in devamı

	Yaş (hafta)	N	LPL± SS	AK1± SS	FOXO3± SS
Irk			**	**	**
Gerze	10	4	0.00007797± 0.00003904	0.09484516± 0.04351760	0.00703622± 0.00296249
	20	4	0.00018015± 0.00002367	0.03050062± 0.00500467	0.00313514± 0.00097541
Hibrit	4	4	0.00002049± 0.00001172	0.03270405± 0.01563401	0.00292979± 0.00203706
	8	4	0.00004368± 0.00001368	0.01337096± 0.00369400	0.00073819± 0.00049926
Yaş			**	**	**
1	10/4	8	0.00004923± 0.00004070	0.06377461± 0.04505521	0.00492598± 0.00321559
2	20/8	8	0.0011191± 0.00007222	0.2193579± 0.00974940	0.00193667± 0.00143980
Irk x Yaş			**	*	ÖD
Genel ortalama		16	0.00008057± 0.00006608	0.04285520± 0,3855953	0.00343133± 0.00289068

1: İlk Örneklem Dönemi (Gerze:10 haftalık yaş ve Hibrit: 4 haftalık yaş). 2: İkinci Örneklem Dönemi (Gerze:20 haftalık yaş ve Hibrit: 8 haftalık yaş). SS: Standart Sapma. ÖD : Önemli değil. *: Önemli P<0.05. **: Önemli P<0.001

4.4.1. Tavuklarda lipid metabolizmasında görev alan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi (*PPAR γ* , *SCD*, *LPL*)

PPAR γ geni ağırlıklı olarak yağ hücrelerinde ifade edilmektedir ve bazı transkripsiyon faktörleri ile birlikte yağ hücrelerinin olgunlaşması ile ilgili süreçlere katılmaktadır (Liu vd., 2010). Diğer yandan, *PPAR γ* geninin yağ hücrelerinin farklılaşması sırasında önemli ölçüde ifadesinin arttığı ve bu nedenle çalışmalarda popüler adipojenik belirteç olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Li vd., 2019a).

PPAR γ geni, dokulardaki kas içi yağ miktarıyla yakından ilişkilendirilmektedir (Zhang vd., 2014; Fu vd., 2014; Liu vd., 2019). Daha önce yapılan çalışmalarda abdominal yağ dokusunda *PPAR γ* gen ifadesinin yaşla birlikte arttığı saptanmıştır (Sato vd., 2004, Sato vd., 2009; Sun vd., 2014). Benzer sonuçların alındığı başka bir çalışma ise Fu vd. (2014) tarafından Beijing-You (BJY) tavukları üzerinde yapılmıştır. BGY tavuk ırkı yazarlar tarafından yüksek yağ içeriğine ve iyi bir lezzetli ete sahip yerel tavuk ırkı olarak tanımlanmıştır. Çalışmada, BGY tavuk ırkının göğüs kasındaki *PPAR γ* mRNA seviyesinde yaşa (0, 4, 8, 14 ve 20 haftalık yaşlarda) bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı ancak 20 haftalık yaşta diğer yaşlara kıyasla önemli düzeyde artış tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca 8, 14 ve 20 haftalık yaşlarda *Pectoralis major* kas dokusundaki kas içi yağ oranında önemli düzeyde artış tespit edilmiştir.

Bu doktora tez çalışmasında, *PPAR γ* mRNA seviyesinin Gerze tavuk ırkında yaşla birlikte azalırken (kat değişimi: 2.35) ($P<0.05$), hibrit tavuk ırkında arttığı (kat değişimi: 1.46) tespit edilmiştir ($P<0.05$). Üzerinde çalışılan iki ırkın aynı çevre şartları altında ve aynı koşullarda yetiştirildiği göz önüne alındığında, elde edilen sonuçlar arasındaki fark ırkların sahip olduğu spesifik farklılığı ortaya koymaktadır. Tez çalışmasında *PPAR γ* gen ifadesine ırkın ve ırk*yaş interaksiyonunun etkisi olduğu sonucu da bu varsayımı desteklemektedir. Çünkü Grashorn ve Closternmann (2002), yoğun ve yaygın üretim sistemlerinde yetiştirilen tavuklardaki et kalitesi farklılıklarının doğası gereği çoğunlukla genetik olduğunu, üretim ortamının (sıcaklık hariç) daha az önemli olduğunu bildirmiştir (Grashorn ve Serini, 2006). Bu çıkarımı doğrulayabilecek bir başka çalışma da Tunim vd. (2021) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada saf yerli tavuk ırkı, melez tavuk ırkı ve etlik hibrit tavuk ırklarının farklı yaşlarda yağ depolama oranları ve *PPAR γ* mRNA seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek kas içi yağ miktarı ve *PPAR γ* gen ifadesi seviyesi etlik tavuk ırkında tespit edilmiştir. Melez tavuk ırklarından elde edilen sonuçlarda, etlik tavuk ırkı kullanılarak yapılan melezlemenin *PPAR γ* gen ifadesinde önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında ise aksine, *PPAR γ* mRNA seviyesinin ilk örneklem dönemi için Gerze tavuk ırkında hibrit ırka kıyasla önemli düzeyde daha fazla ($P>0.05$), ancak ikinci örneklem döneminde ise önemsiz seviyede daha az ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu farklılığın, her iki ırkın incelenen kas dokularındaki farklı kas içi yağ miktarından kaynaklanmış olma ihtimali yüksektir. Tavuklarda kas içi yağ oranı, et lezzeti üzerinde oldukça etkilidir ve Gerze tavuk ırkının sahip olduğu karakteristik et lezzetine *PPAR γ* geninin etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle her iki ırkın kas dokusundaki kas içi yağ miktarı ile *PPAR γ* ifade seviyesi birlikte incelenmelidir. Böylece her iki ırkın *PPAR γ* gen ifadesi profilleriyle dokulardaki kas içi yağ miktarı arasındaki ilişki daha bilgi verici olacaktır. Özellikle ilk örneklem dönemi için Gerze tavuk ırkında daha fazla *PPAR γ* gen ifadesinin tespit edilmesi, bu gen ile ilişkili olan diğer

transkripsiyon faktörlerinin de (özellikle *C/EBPα*) ifade seviyelerinin ve interaksiyonlarının araştırılması bakımından önemlidir. Çünkü ikinci örneklem döneminde *PPARγ* mRNA seviyesinin azalmasında, promotör bölgeye bağlanabilen transkripsiyon faktörlerinin türü ya da miktarının etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Her iki tavuk ırkının sergilediği farklı gen ifadesi profilinin altında yatan diğer bir sebep *PPARγ* gen ifadesi seviyesine etki edebilecek olan *PPARγ* geninin promotör bölgesindeki metilasyon profilidir (Sun vd., 2014). *PPARγ* geninin promotör bölgesindeki CpG dinükleotidlerine bağlı olan muhtemel metil gruplarının sayısı, transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi ve gen ifadesinin düzenlenmesi bakımından oldukça önemlidir.

Gerze tavuk ırkı ve hibrit ırk arasındaki gen ifadesi farklılıklarının başka bir sebebi de Liu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada ileri sürülen *Pectoralis major* kas dokusundaki farklı lipid biriktirme modellerinde yer alan genetik mekanizmalardır. Çalışma kapsamında Çin'de yüksek kaliteli bir tavuk ırkı olarak tanımlanan ve yüksek kas içi yağ depolama kapasitesine sahip olduğu bildirilen Jingxing-Huang tavuk ırkının (98 günlük) *Pectoralis major* kas dokusundaki lipid metabolizmasında görev alan genlerin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda yüksek kas içi yağ depolanmasının yüksek trigliserid içeriğine sahip olmakla yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla yüksek ya da düşük trigliserid içeriğinin lipid depolanmasını düzenleyen anahtar yollardaki farklılıklardan ileri geldiği bildirilmiştir. Ayrıca *LPL*, *SCD* ve *PPARγ* gibi genlerin yüksek trigliserid içeriğine sahip tavuklarda önemli seviyede yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir. Steroid biyosenteziyle ilişkilendirilen bu genlerin *Pectoralis major* kas dokusunda yağ hücrelerinin oluşması ve farklılaşması süreçlerinde görev alan çok sayıda genin ifadesini artırdığı tespit edilmiştir.

Benzer bir çalışma ile Chen vd. (2017) Wuhua tavuk ırkının özellikle dişi bireylerinde 150 günlük yaşta *Pectoralis major* kas dokusundaki kas içi yağ miktarının ve *PPARγ* gen ifadesinin en yüksek seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir. Ayrıca plazmadaki trigliserid miktarının *Pectoralis major* kası bakımından kas içi yağ seçimi için potansiyel bir indeks olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, *PPARγ* geninin dişi bireylerde kas içi yağ bakımından seleksiyon için aday bir gen olabileceği vurgulanmıştır.

Kas içi yağ, doğrudan kaslardaki yağ miktarını temsil etmektedir ve esas olarak trigliseridlerden (TG'ler) oluşmaktadır. Ancak aynı zamanda kas içi yağ çeşitli fosfolipidler ve kolesterol de içermektedir. Bu karmaşık özelliğinden dolayı, kas içi yağ birikiminde yer alan anahtar genlerin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi son derece zordur (Liu vd., 2018). Ayrıca, kas içi yağ miktarıyla ilişkilendirilen *PPARγ* izoformlarının (*PPARγ1* ve *PPARγ2*) ifade seviyelerinin belirlenmesi ve yağ hücrelerinin olgunlaşması süreciyle ilişkilendirilmesi oldukça kritiktir (Mu vd., 2020). Dolayısıyla Gerze ve hibrit tavuk ırkları arasındaki *PPARγ* ifade seviyesindeki farklılıkların aynı zamanda *Pectoralis major* kas dokusundaki farklı trigliserid içeriklerine ve dolayısıyla farklı miktarlarda kas içi yağ miktarına sahip olmalarından kaynaklandığı ihtimalini güçlendirmektedir.

PPARγ gen ifadesindeki artışın, dokulardaki kas içi yağ miktarını artırmakla sonuçlanması araştırmacıları tavukların canlı ağırlıkları ile *PPARγ* gen ifadesi

seviyelerini ilişkilendirmeye yönlendirmiştir. Zhang vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada 7 generasyon yetiştirilen White Plymouth Rock ırkı tavukların düşük (LWS) ve yüksek canlı ağırlığa (HWS) sahip bireylerinin 56 günlük yaşta göğüs ve bacak kaslarındaki *PPAR γ* gen ifadesi seviyeleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgularda HWS bireylerin birim alanda daha fazla yağ hücresine sahip olmasına rağmen LWS bireylerden daha düşük miktarda *PPAR γ* gen ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Gerze ve hibrit tavuk ırkları arasındaki *PPAR γ* gen ifadesi seviyesindeki farklılıkların birim alanda sahip oldukları farklı yağ hücresi miktarından da kaynaklanabileceğine işaret etmektedir.

Lezzetli ve kaliteli et tüketimine yönelik artan tüketici talepleri, araştırmacıları yüksek lezzet özelliklerine sahip yerel tavuk ırklarını geliştirmeye yöneltmiştir. Bu tavuk ırklarından biri olan Çin'in Qingyuan tavuk ırkının yavaş büyüme performansı nedeniyle üretim maliyetlerinin nispeten yüksek olduğu bildirilmiştir. Li vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada Qingyuan tavuğunun et kalitesi özelliklerini geliştirmek amacıyla 119 gün yaştaki tavuklara 30 günlük Rutin (flavonoid) diyet takviyesi uygulanmıştır. Araştırma sonunda Rutin takviyesinin 22 haftalık yaştaki tavukların *Pectoralis major* kas dokusunda *PPAR γ* geni dahil olmak üzere birçok genin ifadesini önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda Rutin takviyesinin Qingyuan tavuklarının et kalitesini, yağ asidi profillerini ve özellikle antioksidan kapasitesini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Gerze tavuk ırkının mevcut durumda sergilediği *PPAR γ* gen ifadesi profili, yerli tavuk ırkımızın farklı diyet içerikleriyle et kalitesinin göğüs ve bacak kası dokularında geliştirilebilme potansiyeli olduğunu ve *PPAR γ* geninin bir belirteç olarak işlevselliğinin araştırılması gerekliliğini işaret etmektedir.

Son olarak, Sinop iline özgü bir ırk olan Gerze tavuk ırkının ilk örneklem dönemi için *PPAR γ* mRNA seviyesi ile ilgili elde edilen bulgular bu ırkın lipid metabolizmasının ve dolayısıyla et kalitesi ve lezzeti potansiyelinin geliştirilebileceği sinyalini vermektedir. Bu sebeple, Gerze tavuk ırkının farklı dokulardaki *PPAR γ* geniyle pozitif/negatif korelasyon gösteren genlerin, öncül yağ hücrelerinin olgunlaşması ve farklılaşmasının pozitif/negatif düzenleyicisi olan miRNA'ların (gga-miR-140-5p, gga-miR-223 ve gga-miR-18b-3p gibi) (Zhang vd., 2018b; Sun vd., 2019; Nematbakhsh vd., 2021; Sun vd., 2021) ve doğal PPAR agonistlerinin (bazı gliserofosfolipid molekülleri) (Li vd., 2023) araştırılması gerekmektedir.

Daha önceki çalışmalarda, tavuklarda kas içi yağ depolanması ile ilgili çok sayıda aday gen (*PPAR*'lar, *FABP*'ler, *LPL*, *SCD*, *KLF*'ler ve *ACSL*'ler) tanımlanmıştır (Cui vd., 2012; Liu vd., 2017; Li vd., 2019b; Wang vd., 2019; Liu vd., 2019). Bu genlerin birçoğunun trigliserid birikimi ile ilişkili olduğu ve trigliserid metabolizmasını düzenleyerek kas içi yağ birikiminde önemli bir rol oynayabilecekleri bildirilmiştir (Liu vd., 2019). Bu genlerden biri olan *SCD*, steroid biyosentezinde görev alan palmitik asit ve stearik asidi, palmitoleik ve oleik asite dönüştüren ve böylece yağ asidi sentezinde önemli bir hız sınırlayıcı enzim kodlayan gendir (Liu vd., 2019). Palmitoleik ve oleik asit en bol bulunan hücresel uzun zincirli yağ asitleridir (LCFA'lar) ve esas olarak trigliseridlerin bileşenleri olarak kullanılmaktadır (Hodson vd., 2008). Liu vd. (2019) tarafından etlik tavuk ırkında yapılan bir çalışmada yüksek trigliserid içeren *Pectoralis major* kas dokularında *SCD* ve *ELOVL7* genlerinin ifade seviyelerinin düşük trigliserid içeren dokulardan çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, artan yağ asidi sentezinin, trigliseridlerin sentezini ve birikmesini destekleyebileceğini göstermektedir.

(Liu vd., 2019). Diğer yandan *SCD* geninin farklı tavuk ırklarının göğüs kası ve karaciğer dokusundaki yüksek yağ asidi içerikleriyle yakından ilişkilendirildiği ve potansiyel belirteç aday gen olarak vurgulandığı çalışmalar da bulunmaktadır (Maharani et al., 2013; Furqon et al., 2017; Gunawan et al., 2018; Gunawan vd., 2019).

Bu çalışmada Gerze tavuk ırkının her iki büyüme dönemi için toplanan doku örneklerinde *SCD* geninin hibrit ırka kıyasla önemli düzeyde daha fazla ifade edildiği saptamıştır ($p<0.001$). Diğer yandan Gerze tavuk ırkının ikinci örneklem döneminde ilk örneklem dönemine kıyasla *SCD* mRNA seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir (kat değişimi: 1.23) ancak bu fark anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Hibrit tavuk ırkında ise yaş dönemi örneklemeleri arasında *SCD* gen ifadesi seviyesinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Li vd. (2019b) tarafından yapılan çalışmada *SCD* geninin lipid depolanması ve iskelet kasındaki yağ asidi bileşenleriyle önemli düzeyde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda *SCD* gen ifadesinin yağ asidi içeriği yüksek göğüs kası dokularında daha fazla ifade edildiği rapor edilmiştir ($P<0.05$). Bu sonuçlar Gerze tavuk ırkının hibrit ırka kıyasla *Pectoralis major* kas dokusundaki yağ asidi miktarının daha fazla ve yağ asidi bileşenlerinin farklı olabileceğini işaret etmektedir.

Diğer yandan farklı tavuk ırklarında yapılan çalışmalarda *SCD* genindeki bazı SNP'lerin, incelenen dokudaki yağ asidi miktarı ve bileşenleriyle yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Maharani vd., 2013; Furqon vd., 2017; Jin vd., 2020). Bu çalışmalarda farklı tavuk ırklarında tespit edilen SNP'ler, farklı yağ asidi içerikleriyle ilişkilendirilmiştir. Yapılan tez çalışmasında, tek değişkenli varyans analizi sonucunda *SCD* gen ifadesine yalnızca ırk faktörünün önemli düzeyde ($P<0.001$) etki ettiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Gerze tavuk ırkının karakteristik et lezzetinin, kas dokusundaki muhtemel SNP'lerin etkisiyle ortaya çıkmış olabileceğine dair bir ipucu olarak değerlendirilebilir.

İlk örneklem döneminde Gerze tavuk ırkının daha fazla *SCD* gen ifadesine sahip olması, her iki ırkın *SCD* genindeki promotör bölgesinin dizi farklılıklarından da kaynaklanabilmektedir. Çünkü promotör bölgesindeki dizi farklılıkları, transkripsiyon faktörlerinin çeşidini ve bağlanabileceği bölge sayısını, dolayısıyla gen ifadesi miktarını etkilemektedir (Liu vd., 2023). Bu nedenle, her iki ırkın *SCD* geninin çekirdek promotör bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörlerinin tespit edilmesi ve literatürde yakından ilişkilendirilen çoklu doymamış yağ asidi sentezi üzerine etkisinin incelenmesi oldukça kritiktir (Liu vd., 2023). Bu çalışmalar *SCD* geninin ifade seviyesinin ya da sahip olduğu polimorfizmlerinin, ırk, yaş, cinsiyet ve dokuya bağlı olarak lipid metabolizmasına etkisinin ortaya çıkarılmasına da katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak etin lezzet, sululuk ve gevreklik özelliklerine önemli bir katkı sağlayan kas içi yağ depolanmasında *SCD* geninin de etkin ve anahtar bir rol oynaması Gerze tavuk ırkının et kalite özelliklerinin araştırılmasında bu genden faydalanma potansiyelini ortaya koymaktadır.

Gerze tavuk ırkının her iki örneklem dönemi için hibrit ırka kıyasla önemli seviyede daha yüksek ifade edildiği tespit edilen genlerden biri de *LPL* genidir ($p<0.001$). Ayrıca her iki ırkın ikinci örneklem döneminde *LPL* ifade seviyesi önemli düzeyde artış

göstermiştir ($p<0.001$). Benzer bir sonuç D'Ander vd. (2013) tarafından yapılan çalışmadan elde edilmiştir. Dört farklı dokudan sadece *Pectoralis major* kas dokusunda *LPL* geninin yavaş büyüyen tavuk ırkında (Xinghua tavuk ırkı) daha fazla ifade edildiğini bildirmişlerdir. Bunun aksine, Huang vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise *Pectoralis major* kas dokusunda ticari ırkın yerli tavuk ırkından (Guangxi san-huang tavuk ırkı) daha fazla mRNA seviyesi tespit edildiği ve dokulardaki *LPL* enzim aktivitesinin de paralel sonuçlar verdiği bildirilmiştir.

LPL, lipid metabolizmasının anahtar genlerinden biridir (Huang vd., 2016). Her ne kadar *LPL* geninin ifade seviyesi kas içi yağ depolanması ile yakından ilişkilendirilse de (Maharani et al., 2013; Furqon et al., 2017; Gunawan et al., 2018; Gunawan vd., 2019; Liu vd., 2019) lipid metabolizması ve PPAR sinyal yolağı oldukça karmaşıktır ve bu yolda pek çok gen görev almaktadır (Nematbakhsh vd., 2021; Li vd., 2023). Dolayısıyla Gerze tavuk ırkında tespit edilen yüksek *LPL* gen ifadesi et lezzeti açısından önemli potansiyeli işaret etse de her iki tavuk ırkının gen ifadesi seviyelerinin ilgili dokudaki kas içi yağ miktarı ile ilişkilendirilmesi daha güvenilir sonuçlar sağlayabilecektir.

Yapılan tez çalışmasında her iki tavuk ırkı da büyüme dönemleri boyunca benzer bir *LPL* gen ifadesi profili sergilemişlerdir. *LPL* gen ifadesi iki örneklem dönemi boyunca, Gerze tavuk ırkında 1.21 kat, hibrit tavuk ırkında 1.09 kat artış göstermiştir (Şekil 4.7). Ancak Gerze tavuk ırkının, her iki örneklem döneminde hibrit tavuk ırkına kıyasla önemli düzeyde daha fazla *LPL* gen ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$). Bu genin her iki ırkta farklı seviyelerde ifade edilmesinin, gen ifadesinin düzenlenmesi mekanizmalarındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu varsayımı doğrulayan bir çalışmada, *LPL* gen ifadesinin ve dokulardaki yağ miktarının, promotör bölgedeki CqG dinükeotidlerindeki farklı metilasyon profilleriyle düzenlenebildiği bildirilmiştir (Xing. Vd, 2011). Bu bilgiler ışığında Gerze tavuk ırkının *LPL* gen ifadesinin ve dolayısıyla iskelet kaslarındaki kas içi yağ oranının et lezzetine katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda *LPL* enziminin trigliseridleri parçalayarak yağ asitleri olarak depoladığı (Xing vd., 2011), ayrıca *LPL* gen ifadesinin, enzim aktivitesinin ve kas içi yağ miktarının yaş ve ırk faktörlerinden etkilendiği bildirilmiştir (Huang vd., 2016). Literatürle paralel olarak, Gerze ve hibrit tavuk ırklarındaki *LPL* gen ifadesi üzerine ırk, yaş ve ırk*yaş interaksiyonun önemli seviyede etkili olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$) (Çizelge 4.3). Ayrıca, em ırklar arasında hem de ırkların büyüme dönemleri arasında *LPL* gen ifadesi seviyesi önemli düzeyde artış göstermiştir ($P>0.001$). Bu bilgiler göz önüne alındığında, Gerze tavuk ırkında tespit edilen yüksek *LPL* gen ifadesi seviyesi, çalışılan dokudaki yağ asidi miktarı ve bileşenleri üzerinde etkili olmuş olabilir. Bu durum Gerze tavuk ırkının et lezzeti/kalitesi özelliğini etkileyen önemli bir faktör olarak değerlendirilebilir.

Diğer yandan, *LPL* genindeki polimorfizmlerin de gen ifadesi ve kas içi yağ miktarıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2023). Dolayısıyla, Gerze ve hibrit tavuk ırklarının farklı gen ifadesi seviyelerinin, *LPL* gen polimorfizmlerinden de kaynaklanmış olabileceği ihtimali oldukça güçlüdür.

Son olarak, Gerze ve hibrit tavuk ırklarının lipid metabolizmasını düzenleyen ve *LPL* gen ifadesi üzerinde etkili olan genlerin veya miRNA'ların (Zhai vd., 2023) ifade seviyeleri farklılık gösterebilmektedir. Bu sebeple *LPL* gen ifadesi seviyelerinde farklılık tespit edilmiş olması da muhtemeldir.

Sonuç olarak, *LPL* gen ifadesi bakımından Gerze tavuk ırkının önemli bir potansiyeli işaret ettiğini söylemek mümkündür. Bundan sonra yapılması gerekenler ise Gerze tavuk ırkının *LPL* gen karakterizasyonunu ortaya çıkarmak, gen ifadesi seviyelerinin kas içi yağ miktarı ve yağ asidi çeşitleri bakımından (lezzet için oldukça kritik) ilişkisini tespit etmek ve belirteç aday gen olabilme potansiyelini araştırılması olarak değerlendirilmiştir.

4.4.2. Tavuklarda büyüme ve gelişme üzerinde etkili olan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi (*MSTN*, *FOXO3*, *CAPN3*)

MSTN geni, iskelet kası büyümesinin negatif bir düzenleyicisi olarak kasların gücünü ve kalitesini etkilemede önemli bir rol oynamaktadır (Dushyanth vd., 2016, Wu vd., 2018; Kim vd., 2020). Dolayısıyla kas büyümesi ve gelişmesini baskılayan *MSTN* geninin yumurtacı ya da nispeten yavaş gelişen yerli ırklara göre hibrit ırklarda (hızlı büyüyen) daha az ifade edilmesi beklenen bir sonuçtur. Bhattacharya vd. (2015), Dushyang vd. (2016) ve Wu vd., (2018) tarafından yapılan çalışmalara benzer olarak Gerze tavuk ırkının her iki büyüme döneminde *MSTN* geni hibrit ırka kıyasla önemli seviyede daha fazla ifade edilmiştir ($P<0.001$). Ayrıca çalışılan bireylerin ortalama canlı vücut ağırlıkları da bu sonuçları doğrulamaktadır. Bu durum, her iki ırkın farklı büyüme ve gelişme profillerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Tek değişkenli varyans analizi sonuçları *MSTN* gen ifadesinin ırk, yaş ve ırk*yaş interaksiyonundan önemli düzeyde etkilendiğini göstermiştir ($P<0.001$). Bu sonuçlar Gerze ve hibrit tavuk ırkındaki gen ifadesi farkının sebebini açıklamaktadır.

Ancak bunun aksine, Kong vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada etlik tavuk ırkının yavaş büyüyen tavuk ırkına kıyasla daha fazla *MSTN* gen ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, *MSTN* geninin etkisini inhibe etme özelliğine sahip başka genlerin artan gen ifadesi seviyelerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Diğer yandan, farklı ırklarda tespit edilen farklı SNP'lerin *MSTN* amino asit dizisine ve dolayısıyla protein aktivitesine etki ettiği bildirilmiştir (Bhattacharya vd., 2015). Dolayısıyla Gerze tavuk ırkının et verimi ve kalitesinin geliştirilmesi için *MSTN* geninin ifade seviyesinin ya da protein aktivitesinin azaltılması üzerinde çalışmalar yürütülmesi oldukça önemlidir.

Yapılan tez çalışmasında, hibrit tavuk ırkının büyüme boyunca sergilediği *MSTN* gen ifadesi artışı (kat değişimi: 2.55), Gerze tavuk ırkından daha fazladır (kat değişimi: 1.44). Bu durum, hibrit tavuk ırkının kısa zamanda hızlı ve fazla büyüme sergilemesi nedeniyle büyümenin güçlü bir şekilde durdurulma eğilimi göstermesinden de kaynaklanabilmektedir. Dolayısıyla tek değişkenli varyans analizinden de elde edildiği gibi *MSTN* geni ırk, yaş ve ırk*yaş interaksiyonu faktörlerinden de etkilenmektedir.

MSTN gen ifadesi farklılıklarına neden olabilecek faktörlerden biri de *MSTN* genini hedefleyen ve gen ifadesini susturan miRNA'lardır (Zhang vd., 2021). Bu nedenle Gerze tavuk ırkında *MSTN* genini hedefleyen miRNA'ların (miR-27b-3p gibi) gen ifadelerinin incelenmesi ve varsa başka miRNA'ların da keşfedilmesi oldukça önemlidir.

Çünkü diğer yerli tavuk ırklarında olduğu gibi Gerze tavuk ırkının verim özellikleri de oldukça düşüktür. Bu nedenle karkas özelliklerinin iyileştirilmesi için, yerli tavuk ırkımızın iskelet kaslarındaki büyüme ve gelişme yollarının aydınlatılması oldukça kritiktir. Bu noktada Gerze tavuk ırkının moleküler ıslahı bakımından *MSTN* geninin her yönüyle (ifade seviyesi, polimorfizmleri, düzenleyicileri vs.) belirteç olma potansiyelinin araştırılması önerilmektedir. Özellikle Gerze tavuk ırkında farklı protein içerikleriyle yapılacak besleme uygulamalarının, *MSTN* geni aracılığıyla karkas özellikleri üzerine etkisinin ortaya çıkarılması, gelecekte bu ırk üzerinde yapılması hedeflenen çalışmalar arasında yer almalıdır.

FoxO sinyal yolağı, tavuklarda kas gelişimi için oldukça önemlidir ve FoxO bu süreçte görev alan beş farklı yolağın tam ortasında yer almaktadır. *FOXO3* geni ise, FoxO sinyal yolağının merkezinde yer alan ve iskelet kası atrofisini düzenleyen, büyüme ve gelişmede önemli bir rol oynayan gendir (Ouyang vd., 2015; Wu vd., 2018; Li vd., 2019c).

Tez çalışmasında her iki büyüme döneminde Gerze tavuk ırkının hibrit tavuk ırkından daha fazla *FOXO3* mRNA seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.001$) ve her iki ırkın ikinci örneklem döneminde *FOXO3* mRNA seviyesinde önemli bir azalma tespit edilmiştir. Gen ifadesinin büyüme dönemi boyunca Gerze tavuk ırkında 1.17 kat, hibrit tavuk ırkında ise 1.99 kat azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.3). Ayrıca tek değişkenli varyans analizi sonucunda *FOXO3* gen ifadesinin ırk ve yaş faktörlerinden önemli seviyede etkilendiği tespit edilmiştir ($P < 0.001$).

Zhou vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ticari hibrit tavuk ırkının yemden yaralanma oranıyla, *FOXO3* gen ifadesi arasında önemli negatif korelasyon tespit edilmiştir. Azalan *FOXO3* ifadesinin artan protein sentezinin göstergesi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *FOXO3* gen ifadesinin bazı transkripsiyon faktörleriyle baskılanmasının, protein sentezini artırırken kas kütlesinin de korunmasına yardımcı olabileceği bildirilmiştir. Gerze tavuk ırkının her iki örneklem döneminde daha fazla *FOXO3* gen ifadesine sahip olması, yemden yaralanma oranının daha az olması ihtimalini düşündürmektedir. Başka bir ihtimalle, hibrit tavuk ırkında *JUNB* transkripsiyon faktörü gibi bazı *FOXO3* gen ifadesi baskılayıcılarının daha aktif rol oynadığı sonucuna varılabilir. Ancak nihai olarak, her iki tavuk ırkında yaşla birlikte azalan gen ifadesi profili, beklendiği üzere büyüme sonunda azalan protein sentezine ve azalan yemden yaralanma oranına işaret etmektedir.

Diğer yandan, iki tavuk ırkının farklı büyüme mekanizmalarına (yavaş ve hızlı büyüme özellikleri) sahip olmasında *FOXO3* gen ifadesinin katkısı olabileceği de düşünülmektedir. Bu varsayımı tek değişkenli varyans analizinden elde edilen ırk ve yaş faktörlerinin *FOXO3* gen ifadesi üzerinde etkili olduğu sonucu desteklemektedir. Benzer bulgular Chen vd. (2015) tarafından yapılan çalışmadan da elde edilmiştir. Yavaş büyüyen yerli tavuk ırkının göğüs ve bacak kaslarında ticari tavuk ırkına kıyasla daha fazla *FOXO3* gen ifadesi tespit edilmiştir. Bu nedenle *FOXO3* geninin yerli tavuk ırkının iskelet kaslarında yavaş büyüme performansına katkı sağladığı ileri sürülmüştür. Bu bağlamda, *FOXO3* gen ifadesinin azalmasıyla, kas hücrelerinin çoğalmasına ve farklılaşmasına etki eden genlerin de ifadelerinin azalmasının, iskelet kası büyümesini yavaşlatmada etkili olabileceği bildirilmiştir. Bu bağlamda, Gerze tavuk ırkının iskelet kası dokularında *FOXO3* gen ifadesinin azaltılmasıyla büyüme ve gelişmenin

desteklenmesi oldukça önemlidir. Düşük verim özellikleriyle yetiştiriciler tarafından tercih edilmeyen Gerze tavuk ırkının ticari üretime katkısının desteklenmesi için büyüme ve gelişme ile ilgili özelliklerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Yapılan bir çalışmada yavaş ve hızlı büyüyen tavuk ırklarının iskelet kası gelişimini düzenleyen miRNA'lar araştırılmıştır (Liv d., 2018). *FOXO3*'ün, hibrit tavuk ırkının iskelet kaslarında miR-142-5p tarafından hedeflendiği ve ifadesinin baskılandığı bildirilmiştir. Böyle bir baskılanmayla hibrit ırklarda kas atrofisinin önlenebileceğini ve kas kütlesinde önemli bir kazanım elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu durumda Gerze tavuk ırkının iskelet kaslarında *FOXO3* genini hedefleyen miRNA'ların araştırılıp ifade seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Elde edilecek böyle bir bilgi, *FOXO3* gen ifadesinin yönlendirilmesi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Diğer yandan, Gerze ve hibrit tavuk ırkları arasındaki *FOXO3* gen ifadesi farklılığının, bu gende meydana gelen polimorfizmlerden kaynaklanması ihtimali de araştırılmalıdır. Çünkü, yapılan çalışmalarda *FOXO3* genindeki bazı SNP'lerin (rs317670452, rs15379317 ve C66716002T, C66716195T, A66716179G gibi) tavukların farklı yaşlardaki vücut ağırlığı ve göğüs kası ağırlığı gibi birçok büyüme ve karkas özelliğiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2019b). İleride *FOXO3* geninde yapılacak polimorfizm çalışmaları, Gerze tavuk ırkının karkas özelliklerinin geliştirilmesi bakımından bu genin belirteç olarak kullanılabilme potansiyelini de ortaya çıkaracaktır.

Tez çalışması kapsamında et kalitesi özellikleri bakımında incelenen bir başka gen *CAPN3*'tür. Çalışma sonucunda Gerze tavuk ırkının her iki örneklem dönemi için de hibrit ırktan önemli seviyede daha fazla *CAPN3* gen ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Ayrıca Gerze tavuk ırkında yaşla birlikte *CAPN3* gen ifadesi önemli düzeyde artarken (kat değişimi: 0.57, $P<0.05$), hibrit tavuk ırkında mRNA seviyesinin azaldığı (kat değişimi: -0.11) tespit edilmiştir. Ayrıca *CAPN3* gen ifadesinin ırk ($P<0.001$), yaş ($P<0.05$) ve ırk*yaş interaksyonu ($P<0.05$) faktörlerinden etkilendiği tespit edilmiştir.

CAPN3 geni iskelet kasına özgü bir proteazdır ve iskelet kası oluşumunun düzenlenmesinde görev almaktadır (Zhang vd., 2011; Kong vd., 2017; Pampueli vd., 2018). Kas gelişim sürecinde görev almasının yanı sıra et gevrekliği ile de yakından ilişkilendirilen *CAPN3* geninin, düşük kesme kuvvetine sahip (yüksek et yumuşaklığı/gevrekliği) etlik piliçlerin göğüs kasında yüksek seviyede ifade edildiği tespit edilmiştir (Pampueli vd., 2018). Diğer yandan, *CAPN3* genindeki mutasyonların, tavuklarda kas lifi kompozisyonu dahil olmak üzere bazı et kalitesi özellikleriyle de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gandolfi vd., 2011; Felício vd., 2013). Et gevrekliğinin en önemli göstergelerinden biri de kas lifi çapıdır ve et gevrekliği ile negatif korelasyon özelliğine sahiptir.

Gerze tavuk ırkında tespit edilen yüksek *CAPN3* gen ifadesi seviyesi, yerli tavuk ırkımızın et gevrekliği bakımından önemli bir potansiyeli olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar aynı zamanda Gerze tavuk ırkının kas lifi özellikleri bakımından da farklılıklara sahip olabileceğine işaret etmektedir. Dolayısıyla, bir bütün olarak bakıldığında Gerze tavuk ırkının et kalitesi bakımından fiziksel özelliklerinin araştırılması ve elde edilen bulguların gen ifadesi seviyeleriyle ve gen dizi bilgisiyle

ilişkilendirilmesi *CAPN3* geninin Gerze tavuk ırkı için belirteç olabilmesi potansiyeli hakkında da bilgi sunabilecektir.

Son olarak, literatürde bildirildiği üzere (Xue vd., 2022), *CAPN3* gen ifadesi farklı besin takviyelerinden etkilenmektedir ve kas lifi çapına ve et gevrekliğine etki etmektedir. Dolayısıyla, ileride farklı besin takviyeleri kullanılarak (organik selenyum gibi) Gerze tavuk ırkının iskelet kası yapısındaki değişimi ile *CAPN3* gen ifadesi seviyesinin ilişkilendirilmesi, yerli tavuk ırkımızın ıslahında kullanılabilecek moleküler düzeyde önemli bilgiler sağlayacaktır.

4.4.3. Tavuklarda et lezzeti üzerine etkili olan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ATIC*, *ENTPD8*)

Son yıllarda tüketicilerin lezzetli tavuk eti arayışına girmeleri, araştırmacıları ve yetiştiricileri tavuklarda hızlı büyümenin yanı sıra et kalitesi özelliklerinin de geliştirilmesine yönlendirmiştir. Tavuk etindeki lezzeti ortaya çıkaran önemli aktif bileşenlerden biri de inosin monofosfat (IMP)'tır ve tüketiciler arasında en çok tercih edilen ve umami tadın öncüsü olarak nitelendirilen bir nükleottittir (Fujimura vd., 1995; Fujimura vd., 1996; Yan vd., 2018; Huang vd., 2022a). IMP'nin, en yaygın aroma artırıcı olarak bilinen monosodyum glutamattan 50 kat daha güçlü bir lezzet artırıcı olduğu ve besi hayvanlarının ve kümes hayvanlarının et lezzetini iyileştirebildiği bildirilmiştir (Narukawa vd., 2008; Masic ve Yeomans, 2014). Ayrıca, et lezzetini ölçmek için kullanılan uluslararası düzeyde önemli bir indeks olarak bilinmektedir (Lee vd., 2011). IMP'nin de novo sentezi 10 adımda gerçekleşmektedir ve *ADSL*, *AMPD1* ve *ATIC* genleri bu sentezin 2 adımını katalize ederek pürin biyosentezine katılan temel enzimlerdir (Aimi vd., 1990). Tavukların göğüs ve bacak kaslarındaki *ADSL* mRNA seviyesinin artışıyla, kas dokusundaki IMP miktarının doğrudan ilişkilendirildiği bazı çalışmalar da mevcuttur (Ma vd., 2015; Zhang vd., 2018a).

Gerze tavuk ırkının iki örneklem dönemi için de *ADSL* mRNA seviyesinin hibrit ırktan önemli ölçüde fazla olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$). Diğer yandan Gerze tavuk ırkında yaşla birlikte *ADSL* mRNA seviyesinde önemli bir artış gözlemlenirken (kat değişimi: 0.33) ($P<0.05$), hibrit ırkı için önemli bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (kat değişimi: 0.18). Gerze tavuk ırkında yaşla birlikte artan *ADSL* gen ifadesi profili, Kmoch vd. (2000) tarafından yapılan çalışma ile tutarlıdır. Diğer yandan, tek değişkenli varyans analizi sonuçlarına göre *ADSL* gen ifadesinin ırk ($P<0.001$) ve yaş ($P<0.05$) faktörlerinden etkilendiği tespit edilmiştir.

Literatürde iskelet kası dokularındaki *ADSL* gen ifadesiyle IMP içeriği arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Ma vd., 2015; Zhang vd., 2018a). Gerze tavuk ırkının hibrit ırka kıyasla daha fazla *ADSL* gen ifadesine sahip olması, göğüs kası dokusunda daha fazla IMP içermesinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Elde edilen bu sonuçlar Gerze tavuk ırkının kendine has et lezzeti ile ilgili önemli ve umut verici bir potansiyeli işaret etmektedir.

Diğer yandan, *ADSL* geninin 2. ekzonunda tespit edilen SNP'lerin (3848 ve 3797 pozisyonlarındaki nükleotid değişimleri) kas dokusundaki IMP içeriğine etki ettiğini bildiren çalışmalar yapılmıştır (Shu vd., 2007; Shu vd., 2009; Ye vd., 2010). Dolayısıyla, Gerze tavuk ırkının sahip olduğu et lezzeti özelliğinin, *ADSL* genindeki SNP'lerden

kaynaklanmış olma ihtimali de mevcuttur. Özellikle SNP'lerin gen ifadesi ve gen fonksiyonu üzerine etkileri göz önüne alındığında, Gerze tavuk ırkının daha fazla *ADSL* gen ifadesi sergilemesinde önemli katkıları olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Ma vd. (2015) tarafından Çin'in yerli bir tavuk ırkı (Rugao) üzerinde yapılan bir çalışmada içerisinde *ADSL*, *AMPD1*, *ATIC*, *ENTPD8* genlerinin de bulunduğu 19 genin doğrudan IMP sentezi, ayrışması ve kullanımı süreçlerine dahil olduğu bildirilmiştir. Gerze tavuk ırkında bu genlerin ifade seviyelerinin hibrit ırktan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla Gerze tavuk ırkının incelenen kas dokusu bakımından daha fazla IMP'ye sahip olma potansiyeli yüksektir.

Son yıllarda değişen tüketici profili sayesinde kendine has lezzet özelliklerine sahip yerli tavuk ırkı eti ürünlerine olan talep artmaktadır. Tüketiciler tarafından yerli tavuk ırklarının lezzetinin, ticari hibritlerin aksine doğal yaşam alanlarında ya da serbest yetiştiricilik sistemlerinde yetiştirilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Zhang vd. (2018a) Lueyang black-bone tavuk ırkında yaptıkları bir çalışma ile bu düşüncüyü destekleyecek önemli bulgular elde etmişlerdir. Serbest yetiştiricilik ve kafes sisteminin IMP biyosentezi ile ilişkili genlerin ifade profilleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Özellikle market yaşı olarak belirtilen 120 günlük yaşta serbest yetiştiricilik sistemindeki tavukların hem bacak hem de göğüs kaslarında daha fazla IMP tespit edilirken, bacak kaslarındaki *ADSL* gen ifadesinin serbest yetiştiricilik sisteminde yetiştirilen tavuklarda önemli düzeyde daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında her iki tavuk ırkı da aynı şartlar altında yetiştirilmiştir. Ancak genel olarak ticari tavuk ırkları kafes sistemlerinde yetiştirilirken, Gerze tavuk ırkı uzun yıllardır serbest dolaşma imkanlarının olduğu kümeslerde yetiştirilmektedir. Dolayısıyla Gerze tavuk ırkı uygulanan serbest yetiştiricilik sistemi sayesinde et lezzeti/kalitesi özelliklerinin geliştirilmesi avantajına sahiptir. Ayrıca bu özelliklerinin organik ya da ekolojik tarım sistemlerinde de ön plana çıkarılması ve geliştirilmesi Gerze tavuk ırkının hem korunmasına hem de yetiştiriciliğinin ticari olarak yapılmasına katkı sağlayabilecektir.

IMP biyosentezinde görev alan ve bu çalışmada incelenen genlerden biri de *AMPD1* genidir. Gerze tavuk ırkında *AMPD1* geni her iki örneklem dönemi için hibrit ırktan önemli düzeyde fazla ifade edilmiştir (sırasıyla $P<0.001$, $P<0.05$). Ancak hibrit tavuk ırkında *AMPD1* gen ifadesinin yaşla birlikte önemli düzeyde arttığı (kat değişimi: 1.30, $P<0.05$), Gerze tavuk ırkında önemli bir artış olmadığı tespit edilmiştir (kat değişimi: 0.12). Ayrıca, tek değişkenli varyans analizi sonucunda *AMPD1* gen ifadesine ırk ($P<0.001$) ve yaş ($P<0.05$) faktörlerinin etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Zhang vd. (2018a) ve Gai vd. (2023) tarafından yapılan çalışma bulgularının aksine Gerze tavuk ırkında *AMPD1* gen ifadesinde yaşla birlikte bir artış tespit edilememiştir. Ancak AMPD enziminin IMP sentezlenmesinden sorumlu olduğu bilgisine dayanarak (Hu vd., 2015), Gerze tavuk ırkının daha fazla *AMPD1* gen ifadesine sahip olmasının yerli ırkımızın iyi bir et lezzetine sahip olmasında önemli bir katkısı olduğu düşünülmektedir.

Diğer yandan, iki ırk arasındaki gen ifadesi farkının temelinin daha güvenilir bir şekilde açıklanabilmesi ve IMP miktarı ile ilişkilendirilebilmesi için Huang vd. (2022b)

tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi *AMPD1* gen ifadesi ile *AMPD1* protein seviyesinin IMP üzerindeki etkisinin birlikte araştırılıp değerlendirilmesi gerekmektedir. Çünkü Huang vd. (2022b) tarafından yapılan çalışmada Jingyuan tavuk ırkının göğüs kası dokusundaki yüksek *AMPD1* gen ifadesi ve protein ifadesi, yüksek incelenen dokudaki IMP içeriğiyle ilişkilendirilmiştir. Bu durumda, Gerze tavuk ırkının hibrit ırka kıyasla daha fazla *AMPD1* gen ifadesine sahip olması, kas dokularında da daha fazla IMP içerdiği çıkarımı yapılabilir. Bu varsayım Gerze tavuk ırkının et lezzeti potansiyeli açısından çok umut vericidir.

Literatürde *AMPD1* gen polimorfizmlerinin, dokulardaki IMP içeriğiyle doğrudan ilişkilendirildiği çalışmalar da mevcuttur (Hu vd., 2015; Yu vd., 2021). Özellikle 8. ekzonda tespit edilen SNP'nin (g.6805G/A) iki farklı tavuk ırkında farklı IMP miktarlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hu vd., 2015). Bu sonuçlar, Gerze tavuk ırkının et lezzetinde, muhtemel SNP'lerin etkisiyle de *AMPD1* gen ifadesinin etki etmiş olma ihtimalini düşündürmektedir. Dolayısıyla, Gerze ve hibrit tavuk ırklarının *AMPD1* gen dizisi bakımından da karşılaştırılarak hem gen ifadesi hem de IMP miktarıyla ilişkilendirilmesi gerekmektedir. Böylece *AMPD1* geninin Gerze tavuk ırkı için bir belirteç olma potansiyeli de araştırılmış olacaktır.

AK1 enzimi, fonksiyonel olarak ADP birikimine ve metabolizmasına katılarak pürin metabolizması yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak IMP birikimini düzenlemektedir (Huang vd., 2022b). Diğer yandan iskelet kası gibi rejeneratif dokularda yüksek seviyede ifade edildiği bildirilmiştir. Gerze tavuk ırkının, her iki örneklem döneminde de hibrit ırktan daha fazla *AK1* mRNA seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$).

Huang vd. (2022b) tarafından yapılan bir çalışmada 180 gün yaştaki Jingyuan tavuk ırkının *Pectoralis major* kas dokusunda tespit ettikleri yüksek *AK1* mRNA seviyesinin ve protein miktarının, yüksek IMP miktarıyla tutarlı olduğu bildirilmiştir. Zhang vd. (2020) tarafından 180 günlük Jingyuan ırkı tavuklarının göğüs ve bacak kası dokularındaki IMP miktarı ile *AK1* geni arasındaki korelasyon araştırılmıştır. Özellikle tavuk göğüs ve bacak kaslarındaki *AK1* ifade seviyesinin, IMP içeriği ile önemli ölçüde pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu bulguların Jingyuan tavuğunun et lezzetini arttırmak için oldukça önemli olduğu ve yerli genetik kaynakların geliştirilmesi ve kullanımını teşvik edeceği vurgulanmıştır (Zhang vd., 2020). Bu sonuçlar, Gerze tavuk ırkının *Pectoralis major* kas dokusunda yüksek miktarda IMP içerdiğine işaret etmektedir. Ancak IMP biyosentezinin karmaşık süreçlerinin ve potansiyel belirteç adaylarının Gerze tavuk ırkı için aydınlatılması gerekmektedir. Diğer yandan hem Gerze hem de hibrit ırkın ikinci örneklem döneminde *AK1* mRNA seviyesi önemli ölçüde azalmıştır (sırasıyla; kat değişimi: -1.64, $P<0.001$ ve kat değişimi: -1.29, $P<0.05$). Bu nedenle bu ifade seviyelerinin farklı yaş dönemlerinde ve farklı dokulardaki IMP içerikleriyle ilişkilendirilmesi önemli katkılar sağlayacaktır.

Diğer yandan, tek değişkenli varyans analizi sonucunda *AK1* geninin ifade seviyesine ırk ($P<0.001$), yaş ($P<0.001$) ve ırk*yaş ($P<0.05$) interaksiyonunun etki ettiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, Gerze ve hibrit tavuk ırklarının sahip olduğu farklı *AK1* gen ifadesi seviyelerinin sebebini açıklamaya katkı sağlamaktadır.

IMP sentez yollarından biri olan kurtarma yolağı (salvage pathway), enerji ve nükleotid tasarrufu sağlarken diğer yandan pürin nükleotidazın, de novo IMP sentezi yeteneğinden yoksun olduğu dokularda senteze devam ederek önemli bir alternatif yol sunmaktadır (Huang vd., 2022a). *ENTPD8* enzimi, 5' trifosfat inosin'in (ITP), 5'-difosfat inosin'e (IDP) ve nihai olarak IMP'ye dönüşümünü katalize ederek IMP sentezinde görev almaktadır. Ayrıca, *ENTPD8* geninin IMP metabolizmasında yer alan birçok geni geniş ölçüde düzenlediği bildirilmiştir (Corf vd., 2010; Zhang vd., 2018a).

Zhang vd. (2018a) tarafından serbest yetiştiricilik ve kafes sistemlerinde yetiştirilen tavukların 60 gün ve 120 gün yaşlarındaki göğüs kası dokularında IMP depolanması ile ilişkili genlerin ifade seviyeleri incelenmiştir. *ENTPD8* geni 60 günlük yaşta kafes sisteminde yetiştirilen ırka kıyasla serbest yetiştiricilikte yetiştirilen tavuklarda daha fazla ifade edilmiştir. Ancak 120 günlük yaşta önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda serbest yetiştiricilik sisteminin tavukların iskelet kası dokularında *ENTPD8* mRNA seviyesi ve dolayısıyla IMP içeriğini artırabileceği bildirilmiştir.

Gerze tavuk ırkından elde edilen sonuçlar Zhang vd. (2018a) sonuçlarıyla tutarlıdır. Gerze tavuk ırkı her iki örneklem döneminde de hibrit ırka kıyasla önemli düzeyde ($P<0.05$) daha fazla *ENTPD8* mRNA etmesine rağmen, hibrit tavukların aksine (kat değişimi: 0.59, $P<0.05$) ikinci örneklem döneminde ifade seviyesi önemsiz bir düzeyde azalmıştır (kat değişimi: -0.28). Buna rağmen Gerze tavuk ırkının ikinci örneklem dönemindeki mRNA seviyesi hibrit ırktan önemli düzeyde fazladır ($P<0.05$). Ancak bu farkın temelini ırkların kendine has hareket kabiliyetlerinden mi yoksa başka genlerin etkilerinden mi kaynaklandığı araştırılmalıdır. Aslında tek değişkenli varyans analizi *ENTPD8* geninin yalnızca ırk faktöründen önemli düzeyde etkilendiğini göstermiştir ($P<0.001$). Ancak, bu çalışmada her iki ırk da aynı koşullarda yetiştirilmiştir. Bu nedenle hareket kabiliyetlerinin *ENTPD8* gen ifadesi üzerine etkisi ile ilgili bir veri elde edilmemiştir. Ancak hibrit tavuk ırkının aksine, Gerze tavuk ırkı uzun yıllardır serbest yetiştiricilik sistemi koşullarında yetiştirilmektedir. Dolayısıyla ileride farklı yetiştirme sistemlerinin Gerze tavuk ırkının iskelet kası dokularında IMP birikimine ve *ENTPD8* gen ifadesine etkisi incelenmelidir. Böylece Gerze tavuk ırkının farklı yetiştiricilik sistemlerinde et lezzetinin geliştirilmesi imkanı da araştırılmış olacaktır.

Diğer yandan, *ENTPD8* geninin IMP biyosentezindeki birçok geni düzenlediği bildirilmiştir (Corfu vd., 1990; Zhang vd., 2018a; Huang vd; 2022a). Ma vd. (2015) tarafından Rugao tavuk ırkında yapılan bir çalışmada *ENTPD8* geninin 151 adet genle pozitif ilişkili olduğu ve bu genlerin içerisinde transkripsiyon faktörlerinin de yer aldığı bildirilmiştir. Dolayısıyla *ENPTD8* geni hem birçok gen tarafından düzenlenmekte hem de birçok genin ifadesini düzenlemektedir. Gerze tavuk ırkının her iki örneklem döneminde hibrit ırka kıyasla daha fazla *ENTPD8* gen ifadesi profili sergilemesi, IMP biyosentezi ve depolanması hakkında daha aktif bir mekanizmaya sahip olabileceğinin sinyallerini vermektedir. Ancak, bu karmaşık IMP biyosentezinin aydınlatılması ve *ENTPD8* geninin fonksiyonunun Gerze tavuk ırkında aydınlatılması için farklı dokularda ve farklı yaşlarda *ENPTD8* gen ifadesinin ve IMP miktarının araştırılması gerekmektedir.

IMP biyosentezine anahtar bir enzim olarak dahil olan ve pürin biyosentezi içerisinde iki katalitik fonksiyona birden sahip olan tek enzim *ATIC* geni tarafından kodlanan enzimdir (Ma vd., 2015). Gerze tavuk ırkında *ATIC* mRNA seviyesinin her iki

örneklem döneminde de hibrit ırktan önemli seviyede fazla olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla $P<0.05$ ve $P<0.001$). Diğer yandan, hibrit ırkın aksine (kat değişimi: 1.57, $P<0.001$) Gerze tavuk ırkının yaşla birlikte *ATIC* gen ifadesindeki artışın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (kat değişimi: 0.36). Gerze tavuk ırkından alınan sonuçlar Zhang vd. (2018a) tarafından yapılan çalışmanın bulgularıyla tutarlılık göstermektedir.

Shu vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada beş farklı tavuk ırkındaki *ATIC* gen polimorfizmlerinin (özellikle 16. ekzondaki T17446C polimorfizmi) bacak kas dokusundaki IMP içeriğiyle önemli düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shu vd., 2008). Yapılan doktora tez çalışmasında tek değişkenli varyans analizi sonucunda *ATIC* geninin ırk ($P<0.001$) ve yaş ($P<0.001$) faktörlerinden önemli düzeyde etkilendiği tespit edilmiştir. Ancak, bu farkın temelinde SNP polimorfizmlerinin olup olmadığı araştırılması gereken bir konudur. Yine de Gerze tavuk ırkının sahip olduğu *ATIC* gen ifadesi profili, muhtemel SNP'lerle birlikte yerli ırkımızın mevcut et lezzetine etki etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Huang vd. (2022a) tarafından yapılan çalışmada 180 günlük yaştaki Jingyuan ırkı tavukların bacak kası dokusunda *ATIC* proteinin yüksek seviyede (2.56 kat) ifade edildiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). *ATIC* proteinin doğrudan ya da dolaylı olarak IMP sentezi ve katalizinde görev aldığı ve bu nedenle çalışılan tavuk ırkının bacak kası dokusunda IMP depolanmasını düzenleyen anahtar bir protein olabileceği sonucuna varılmıştır. Literatür bilgileri ve çalışmadan elde edilen bulgular birlikte ele alındığında, Gerze tavuk ırkının sahip olduğu et kalitesi ve lezzeti özelliğinin iskelet kası dokularında depolanan IMP miktarından kaynaklanmış olabileceğine işaret etmektedir.

5. SONUÇLAR

Son yıllarda gelişen teknoloji ve hızlı büyüyen kanatlı sektörü, yetiştiricilerin entansif üretim için oldukça uygun olan yüksek verimli ticari hibritlere yönelmesine sebep olmuştur. Bu durum, dünya genelinde yerel ırkların sayısının azalmasına ve hatta yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmalarına yol açmıştır. Ancak yıllar içerisinde tüketicilerin daha lezzetli tavuk eti arayışına girmeleri ve bu tavukların doğal yaşam alanlarında yetiştirilmiş olmalarını önemsemeleri, yetiştiricilerin düşük verime sahip olmalarına rağmen yerli ırklara olan ilgisini arttırmıştır. Bu gelişmeler, pek çok ülkeyi yerli tavuk ırklarının korunması, ticari olarak yetiştirilmesi ve bu ırkların tarım turizmine dahil edilmesi gibi alanlarda strateji geliştirmeye yöneltmiştir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda, yerli tavuk ırklarının sahip olduğu kendine has et özelliklerinin ıslah çalışmalarıyla geliştirilmesi ve ön plana çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, yeni ve gelişmiş teknolojiler kullanılarak (RNA-dizileme, GWAS, DNA Mikroçip gibi) farklı tavuk ırklarının büyüme ve gelişmeleri ile ilişki yollarının ve bu yollarda görev alan majör etkili genlerin araştırılması, yerli ırkların et lezzeti özelliklerini belirleyen moleküler mekanizmaların araştırılması, ilgili genlerin ortaya çıkarılarak farklı rasyon içerikleriyle ifadelerinin yönlendirilmesi gibi pek çok çalışma yürütülmüştür.

Gerze tavuk ırkımızın yetiştirici elinde koruma altına alınması ve sürdürülebilir bir şekilde yetiştirilmesi için temel olarak uygulanması gereken birçok strateji mevcuttur. Bunlardan en önemlisi yerli tavuk ırkımızın verim özelliklerinin geliştirilmesi yönünde ıslah çalışmalarının uygulanmasıdır. Bu nedenle Gerze tavuk ırkının et lezzeti/kalitesi özelliklerinin ön plana çıkarılacağı çalışmalar yapılması, bu özelliklerinin moleküler düzeyde araştırılması, mevcut verim özelliklerinin iyileştirilmesi ve ırkımıza ticari ve kültürel bir katma değer kazandırılması ülkemiz adına büyük önem arz etmektedir.

Bu yolda atılacak bir adıma katkı sağlaması umuduyla yapılan tez çalışmasında Gerze tavuk ırkının iki farklı büyüme döneminde (10 ve 20 hatalık yaşlarda) kas gelişimi (*MSTN*, *FOXO3*, *CAPN3*), lipid metabolizması (*LPL*, *SCD*, *PPAR γ*) ve purin biyosentezi (*ADSL*, *AMPD1*, *ATIC*, *AK1*, *ENTPD8*) yollarında görev alan genlerin ifade seviyeleri RT-qPCR analizi kullanılarak araştırılmıştır.

Çalışma sonunda beklendiği gibi, hibrit ırka kıyasla yavaş büyüme özelliğine sahip yerli tavuk ırkımızın sahip olduğu düşük karkas özellikleri, büyüme ve gelişme ile ilgili incelenen genlerin (*MSTN* ve *FOXO3*) ifade profili ile örtüşmektedir. Ancak bu genlerin bazı besin takviyeleri ile ifadelerinin yönlendirilebildiğine dair sunulan raporlar, Gerze tavuk ırkının karkas özelliklerinin geliştirilmesi bakımından umut vericidir. Diğer yandan, et gevrekliği ve tazeliği ile yakından ilişkilendirilen *CAPN3* geninin hibrit ırka kıyasla Gerze tavuk ırkımızda daha fazla ifade edilmesi, yerli tavuk ırkımızın kendine has et karakterinin ortaya çıkmasında etkili rol oynadığını düşündürmektedir.

Lipid metabolizması bakımından incelenen genlerin (*PPAR γ* , *SCD* ve *LPL*) ifade seviyelerinin hibrit ırka kıyasla Gerze tavuk ırkında daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *PPAR γ* gen ifadesinin artışıyla dokulardaki kas içi yağ ve karkas miktarının artışı arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Gerze tavuk ırkının hibrit ırka kıyasla daha düşük canlı ağırlığa sahip olması, bu gende tespit edilen ifade seviyesiyle tutarlı değildir. Ancak *PPAR γ* gen ifadesinin adipoz doku

miktarıyla negatif korelasyon gösterdiğine dair yapılan çalışmalar, Gerze tavuk ırkındaki düşük karkas ağırlığının açıklanmasına katkı sağlayabilir.

Ancak başka bir açıdan bakıldığında, *PPAR γ* geni steroid biyosenteziyle ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla, dokularda depolanan yağ asidi miktarlarının ve bileşenlerinin et lezzetine etki ettiği rapor edilmiştir. Bu durum, Gerze tavuk ırkının sahip olduğu karakteristik et lezzeti özelliğinde yüksek düzeyde tespit edilen *PPAR γ* gen ifadesinin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Benzer sonuçlar *LPL* ve *SCD* genlerinin ifadesi için de geçerlidir. Her iki genin de Gerze tavuk ırkında daha fazla ifade edilmesi, yine et lezzeti ile ilgili önemli bir işaret olarak da değerlendirilebilir.

Pürin biosentezinde ve özellikle IMP biyosentezinde görev alan genlerin ifade seviyelerine bakıldığında Gerze tavuk ırkının hibrit ırka kıyasla daha fazla gen ifadesine sahip olduğu tespit edilmiştir. İncelenen beş genin de (*ADSL*, *AMPD1*, *AK1*, *ENTPD8*, *ATIC*) hem birbirleriyle etkileşimde oldukları hem de IMP birikimiyle ilişkilendirildikleri çalışmalar mevcuttur. Bu beş gen için Gerze tavuk ırkının sergilediği gen ifadesi profilleri, et lezzetinin en önemli indeksi olan umami tadın belirleyicisi olarak kabul edilen IMP içeriği hakkında önemli ipuçları sağlamaktadır. Elbette karmaşık moleküler mekanizmaların birkaç genle açıklanabilmesi en büyük zorluklardan biridir. Ancak bazı büyük etkili genlerin fenotip ile ilişkilendirilebilmesi de belirteç aday genlerin keşfine önemli katkılar sağlamaktadır. Bu bağlamda, tez çalışmasında IMP metabolizmasına önemli katkıları olan hatta majör etkili aday genler olarak bilindirilen genler üzerinde çalışılmıştır.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışması ile nesli gün geçtikçe yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalan Gerze tavuk ırkının et kalitesi/verimi ve lezzeti üzerine etkili olan genlerin ifade seviyelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular, yerli tavuk ırkımızın sahip olduğu kendine has et lezzeti özelliğinin, incelenen genlerin ifade seviyeleri ile desteklendiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, eski kaynaklarda dahi et lezzetinden bahsedilen Gerze tavuk ırkımızın et verimi, kalitesi ve et lezzeti özelliklerinin geliştirilip ön plana çıkarılması bakımından önemli ipuçları sağlamaktadır. Gerze tavuk ırkının et kalitesi özelliklerinin gen ifadesi düzeyinde ilk defa incelendiği bu çalışmadan elde edilen sonuçların, Gerze tavuk ırkımızın et lezzeti ile ilgili ileride yapılacak moleküler çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adams, G. 2020. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3): 48-53.
- Aimi, J., Qiu, H., Williams, J., Zalkin, H., & Dixon, J. E. 1990. De novo purine nucleotide biosynthesis: cloning of human and avian cDNAs encoding the trifunctional glycylamide ribonucleotide synthetase-aminoimidazole ribonucleotide synthetase-glycylamide ribonucleotide transformylase by functional complementation in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6665-6672.
- Ahmed F.E, Gouda M.M, Hussein L.A., Ahmed N.C., Vos P.W., Mohammad M.A. 2017. Role of melt curve analysis in interpretation of nutrigenomics' microRNA expression data. *GPB*. 14(6): 469-481.
- Alan, A., Onuk, B., Alan, E., and Kabak, M. 2020. Light and electron microscopic studies on the pecten oculi showing blood–retina barrier properties in Turkey's native Gerze chicken. *Anat. Histol. Embryol.*, 49(4): 478-485.
- Al-Nasser, A., Al-Khalaifah, H., Al-Mansour, H., Ahmad, A., and Ragheb, G. 2020. Evaluating farm size and technology use in poultry production in Kuwait. *Worlds Poult. Sci. J.*, 76(2): 365-380.
- Allen, C.D., Fletcher, D.L., Northcutt, J.K., and Russell, S.M. 1998. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. *Poult. Sci.*, 77(2): 361-366.
- Anonymous 1. The Livestock Conservancy, <https://livestockconservancy.org/heritage-breeds/heritage-breeds-list/la-fleche-chicken/> [Son Erişim Tarihi: 23.02.2022].
- Anonymous 2. Conservatoire des Races Animales en Pays de la Loire-CRAPAL https://www.crapal.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=17&Itemid=143 [Son Erişim Tarihi: 23.02.2022].
- Bendixen, E. 2015. The use of proteomics in meat science. *Meat Sci.* 71: 138–149.
- Bhattacharya, T.K., Chatterjee, R.N., Dushyanth, K., and Shukla, R. 2015. Cloning, characterization and expression of myostatin (growth differentiating factor-8) gene in broiler and layer chicken (*Gallus gallus*). *Mol. Biol. Rep.*, 42(2): 319-327.
- Bhattacharya, T.K., Shukla, R., Chatterjee, R.N., and Dushyanth, K. 2017. Knock down of the myostatin gene by RNA interference increased body weight in chicken. *Journal of biotechnology*, 241: 61-68.
- Bhattacharya, T. K., Shukla, R., Chatterjee, R. N., and Bhanja, S. K. 2019. Comparative analysis of silencing expression of myostatin (MSTN) and its two receptors (ACVR2A and ACVR2B) genes affecting growth traits in knock down chicken. *Sci. Rep.*, 9(1): 7789.
- Blonde, G. D., and Spector, A.C. 2017. An examination of the role of l-glutamate and inosine 5'-monophosphate in hedonic taste-guided behavior by mice lacking the T1R1+ T1R3 receptor. *Chemical senses*, 42(5): 393-404.
- Bolormaa, S., Pryce, J.E., Kemper, K., Savin, K., Hayes, B.J., Barendse, W., Zhang, Y., Reich, C.M., Mason, B.A., Bunch, R.J. 2013. Accuracy of Prediction of Genomic Breeding Values for Residual Feed Intake and Carcass and Meat Quality Traits in

- Bos Taurus, Bos Indicus, and Composite Beef Cattle. *J. Anim. Sci.*, 91: 3088–3104.
- Bonnieu, A., Carnac, G., and Vernus, B. 2007. Myostatin in the pathophysiology of skeletal muscle. *Current genomics*, 8(7): 415-422.
- Burns M.J., Valdivia H. 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur. Food Res. Technol.*, 226: 1513-1524.
- Bourneuf, E., Chicault, C., Herault, F., Carré, W., Assaf, S., Monnier, A., ... and Diot, C. 2005. Differential gene expression in the liver of lean and fat chickens. In 4th European Poultry Genetics Symposium.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Q uantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, 2009; 55: 611-622
- Cao, D.J., Jiang, N., Blagg, A., Johnstone, J.L., Gondalia, R., Oh, M., et al. 2013. Mechanical unloading activates FoxO3 to trigger Bnip3-dependent cardiomyocyte atrophy. *J. Am. Heart Assoc.*, e000016.
- Cao, C., Xiao, Z., Ge, C., and Wu, Y. 2022. Application and research progress of proteomics in chicken meat quality and identification: a review. *Food Rev. Int.*, 38(3): 313-334.
- Chen, B., Xu, J., He, X., Xu, H., Li, G., Du, H., ... and Zhang, X. 2015. A genome-wide mRNA screen and functional analysis reveal FOXO3 as a candidate gene for chicken growth. *PloS one*, 10(9): e0137087.
- Chen, X., Niu, J., and Geng, Z. 2017. Gene expression and plasma lipid content in relation to intramuscular fat in Chinese indigenous Wuhua chicken. *J. Appl. Poult. Res.*, 26(3): 391-400.
- Chen, F., Wu, P., Shen, M., He, M., Chen, L., Qiu, C., ... and Zhang, G. 2019a. Transcriptome analysis of differentially expressed genes related to the growth and development of the Jinghai yellow chicken. *Genes*, 10(7): 539.
- Chen, B., Guo, L., Chen, X., El-Senousey, H.K., Ma, M., Jebessa, E., and Nie, Q. 2019b. Cellular function of chicken FOXO3 and its associations with chicken growth. *Poult. Sci.*, 98(10): 5109-5117.
- Cheong A., Fountain S.J., Beech D.J. 2008. Quantitative rt-PCR methods for investigation of low copy potassium channel gene expression in native murine arteries. *Methods Mol. Biol.*, 491: 19-33.
- Choo, H. J., Kim, B.W., Kwon, O.B., Lee, C.S., Choi, J.S., and Ko, Y.G. 2008. Secretion of adenylate kinase 1 is required for extracellular ATP synthesis in C2C12 myotubes. *Exp. Mol. Med.*, 40(2): 220-228.
- Corf, N.A., Tribolet, R., Sigel, H. 2010. Comparison of the self-association properties of the 5'-triphosphates of inosine (ITP), guanosine (GTP), and adenosine (ATP): Further evidence for ionic interactions in the highly stable dimeric [H₂ (ATP)] 4–2 stack. *Eur. J. Biochem.*, 191(3): 721-735.
- Corfu, N.A., Tribolet, R., and Sigel, H. 1990. Comparison of the self-association properties of the 5'-triphosphates of inosine (ITP), guanosine (GTP), and

- adenosine (ATP) Further evidence for ionic interactions in the highly stable dimeric [H₂ (ATP)]₄₋₂ stack. *Eur. J. Biochem.*, 191(3): 721-735.
- Cross, H.R., Durland, P.R., and Seideman, S.C. 1986. Sensory qualities of meat. *Muscle as food*, 279-320.
- Cui, H.X., Liu, R.R., Zhao, G.P., Zheng, M.Q., Chen, J.L., and Wen, J. 2012. Identification of differentially expressed genes and pathways for intramuscular fat deposition in pectoralis major tissues of fast-and slow-growing chickens. *BMC Genom.*, 13: 1-12.
- D'Andre, C.H., Paul, W., Shen, X., Jia, X., Zhang, R., Sun, L., & Zhang, X. 2013. Identification and characterization of genes that control fat deposition in chickens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 4(1): 1-16.
- DAD-IS, 2023. Risk Status of Animal Genetic Resources. <https://www.fao.org/dad-is/risk-status-of-animal-genetic-resources/en/> [Son erişim tarihi: 09.09.2023]
- Desai, M.A., Jackson, V., Zhai, W., Suman, S.P., Nair, M.N., Beach, C.M., Schilling, M.W. 2016. Proteome Basis of Pale, Soft, and Exudative-Like (Pse-Like) Broiler Breast (Pectoralis Major) Meat. *Poult. Sci.*, 95: 2696–2706.
- Désert, C., Duclos, M. J., Blavy, P., Lecerf, F., Moreews, F., Klopp, C., ... and Lagarrigue, S. 2008. Transcriptome profiling of the feeding-to-fasting transition in chicken liver. *BMC Genom.*, 9(1): 1-19.
- Devatkal, S. K., Naveena, B. M., and Kotaiah, T. 2019. Quality, composition, and consumer evaluation of meat from slow-growing broilers relative to commercial broilers. *Poult. Sci.*, 98(11): 6177-6186.
- Ding, N., Gao, Y., Wang, N., and Li, H. 2011. Functional analysis of the chicken PPAR γ gene 5'-flanking region and C/EBP α -mediated gene regulation. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 158(4): 297-303.
- Dridi, S., Taouis, M., Gertler, A., Decuypere, E., and Buyse, J. 2007. The regulation of stearoyl-CoA desaturase gene expression is tissue specific in chickens. *J. Endocrinol.*, 192(1): 229-236.
- Duan, K., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, T., Zhang, W., Zhang, J., ... and Wang, N. 2015. Identification and characterization of transcript variants of chicken peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Poult. Sci.*, 94(10): 2516-2527.
- Dushyanth, K., Bhattacharya, T.K., Shukla, R., Chatterjee, R.N., Sitaramamma, T., Paswan, C., and Guru Vishnu, P. 2016. Gene expression and polymorphism of Myostatin gene and its association with growth traits in chicken. *Anim. Biotechnol.*, 27(4): 269-277.
- Dushyanth, K., Shukla, R., Chatterjee, R. N., and Bhattacharya, T. K. 2022. Expression and polymorphism of Follistatin (FST) gene and its association with growth traits in native and exotic chicken. *Anim. Biotechnol.*, 33(5): 824-834.
- Ekinci, D., ve Mercan, L. 2020. Gerze Tavuğu ve Bazı Saf Hat Genotiplerinde Majör Doku Uyumluluğu Gen Kompleksi Polimorfizmi. *KSÜ Tar. Doga. Derg.*, 23(3): 781-787.

- Escobedo del Bosque, C.I., Busch, G., Spiller, A., and Risius, A. 2020. My meat does not have feathers: Consumers' associations with pictures of different chicken breeds. *J. Agric. Environ. Ethics*, 33(3): 505-529.
- Fadhıl, M. 2014. Gerze tavuk ırkında Mx geni polimorfizminin PCR-RFLP yöntemi ile moleküler karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 59 s.
- Fanatico, A. 2006. Alternative Poultry Production Systems and Outdoor Access. <https://attra.ncat.org/publication/alternative-poultry-production-systems-and-outdoor-access/> [Son erişim tarihi: 15.03.2023].
- Felicia, W.X.L., Rovina, K., 'Aqilah, N.M.N., Vonnice, J.M., Yin, K.W., and Huda, N. 2023. Assessing Meat Freshness via Nanotechnology Biosensors: Is the World Prepared for Lightning-Fast Pace Methods?. *Biosensors*, 13(2): 217.
- Felício, A.M., Boschiero, C., Balieiro, J.C.D.C., Ledur, M.C., Ferraz, J.B.S., Michelin Filho, T., ... and Coutinho, L.L. 2013. Identification and association of polymorphisms in CAPN1 and CAPN3 candidate genes related to performance and meat quality traits in chickens. *Genetics and molecular research*, 472-482.
- Franzoni, A., Gariglio, M., Castillo, A., Soglia, D., Sartore, S., Buccioni, A., ... & Schiavone, A. 2021. Overview of native chicken breeds in Italy: small scale production and marketing. *Animals*, 11(3): 629.
- Fridolfsson, A. K., and Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J. Avian Biol.*, 116-121.
- Fu, R. Q., Liu, R. R., Zhao, G. P., Zheng, M. Q., Chen, J. L., and Wen, J. 2014. Expression profiles of key transcription factors involved in lipid metabolism in Beijing-You chickens. *Gene*, 537(1): 120-125.
- Fujimura, S., Kawano, S., Koga, H., Takeda, H., Kadowaki, M., and Ishibashi, T. 1995. Identification of taste-active components in the chicken meat extract by omission test-involvement of glutamic acid, IMP and potassium ion. *J. Anim. Sci. Technol.*, 66(1): 43-51.
- Fujimura, S., Koga, H., Takeda, H., Tone, N., Kadowaki, M., & Ishibashi, T. 1996. Role of taste-active components, glutamic acid, 5'-inosinic acid and potassium ion in taste of chicken meat extract. *J. Anim. Sci. Technol.*, 67(5), 423-429.
- Furqon, A., Gunawan, A., Ulupi, N., Suryati, T., and Sumantri, C. 2017. Expression and association of SCD gene polymorphisms and fatty acid compositions in chicken cross. *Media Peternakan*, 40(3): 151-157.
- Gabriel, A.S., Ninomiya, K., and Uneyama, H. 2018. The role of the Japanese traditional diet in healthy and sustainable dietary patterns around the world. *Nutrients*, 10(2): 173.
- Gai, K., Ge, Y., Liu, D., Zhang, H., Cong, B., Guo, S., ... and Sheng, X. (2023). Identification of Key Genes Affecting Flavor Formation in Beijing-You Chicken Meat by Transcriptome and Metabolome Analyses. *Foods*, 12(5): 1025.
- Gandolfi, G., Pomponio, L., Ertbjerg, P., Karlsson, A. H., Costa, L. N., Lametsch, R., ... and Davoli, R. 2011. Investigation on CAST, CAPN1 and CAPN3 porcine gene

- polymorphisms and expression in relation to post-mortem calpain activity in muscle and meat quality. *Meat Sci.*, 88(4), 694-700.
- Gao, G. L., Wang, C., Zhao, X. Z., Wang, H. W., Li, Q., Li, J., ... and Wang, Q. G. 2017. Effects of feeding conditions on gene expression in chicken breast muscle. *Genetics & Molecular Research Gmr*, 16(1).
- Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6: 995–1001.
- Gillespie, J.; Flanders, F. 2009. Modern Livestock & Poultry Production; Cengage Learning: Boston, MA, USA, pp. 929.
- González Ariza, A., Arando Arbulu, A., Navas González, F.J., Ruíz Morales, F.D.A., León Jurado, J.M., Barba Capote, C.J., and Camacho Vallejo, M.E. 2019. Sensory preference and professional profile affinity definition of endangered native breed eggs compared to commercial laying lineages' eggs. *Animals*, 9(11): 920.
- González Ariza, A., Arando Arbulu, A., Navas González, F.J., Nogales Baena, S., Delgado Bermejo, J.V., and Camacho Vallejo, M.E. 2021. The Study of Growth and Performance in Local Chicken Breeds and Varieties: A Review of Methods and Scientific Transference. *Animals*, 11(9): 2492.
- Goto, T., Ishikawa, A., Nishibori, M., and Tsudzuki, M. 2019. A longitudinal quantitative trait locus mapping of chicken growth traits. *Mol. Genet. Genom.*, 294(1): 243-252.
- Govindaiah, P. M., Maheswarappa, N. B., Banerjee, R., Mishra, B. P., Manohar, B. B., & Dasoju, S. 2023. Traditional halal meat production without stunning versus commercial slaughter with electrical stunning of slow-growing broiler chicken: Impact on meat quality and proteome changes. *Poult. Sci.*, 103033.
- Grashorn, M.A. and Clostermann, G. 2002. Mast- und Schlachtleistung von Broilerherkünften für die Extensivmast. *Arch.Geflügelk.* 66: 173-181.
- Grashorn, M. A., and Serini, C. 2006. Quality of chicken meat from conventional and organic production. In Proceedings of the XII. European Poultry Conference (pp. 10-14).
- Gunawan, A., Nurajizah, E.S., Listyarini, K., Furqon, A., Bilyaro, W., Sumantri, C., ... and Uddin, M.J. 2018. Association study and expression analysis of stearyl Co-A desaturase as a candidate gene for fatty acid composition in Indonesian crossbred chickens. *Int. J. Poult. Sci.*, 17(7): 348-355.
- Gunawan, A., Listyarini, K., Furqon, A., Sumantri, C., Akter, S.H., and Uddin, M.J. 2019. RNA deep sequencing reveals novel transcripts and pathways involved in the unsaturated fatty acid metabolism in chicken. *Gene Reports*, 15: 100370.
- He, M., Wu, P., Chen, F., Zhang, B., Chen, L., Zhang, T., ... and Zhang, G. 2020. Transcriptome analysis of leg muscles in fast and slow growth Bian chickens. *Animal Biotechnology*, 31(4): 295-305.
- Hodson, L., Skeaff, C.M., and Fielding, B.A. 2008. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid Res.*, 47(5): 348-380.

- Hu, P., Geles, K. G., Paik, J. H., DePinho, R. A., and Tjian, R. 2008. Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Dev. Cell*, 15(4): 534-546.
- Hu, J., Yu, P., Ding, X., Xu, M., Guo, B., and Xu, Y. 2015. Genetic polymorphisms of the AMPD1 gene and their correlations with IMP contents in Fast Partridge and Lingshan chickens. *Gene*, 574(2): 204-209.
- Huang, Y., and Wang, K.K. 2001. The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.*, 7(8): 355-362.
- Huang, H. Y., Liu, R. R., Zhao, G. P., Li, Q. H., Zheng, M. Q., Zhang, J. J., ... and Wen, J. 2015. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in abdominal adipose tissues in chickens. *Sci. Rep.*, 5(1): 16132.
- Huang, Y. N., Wang, J., Chen, B.J., Jiang, Q.Y., Guo, Y.F., Lan, G.Q., and Jiang, H.S. 2016. Gene expression and enzyme activity of lipoprotein lipase correlate with intramuscular fat content in Guangxi san-huang and Arbor Acres chickens. *Genet. Mol. Res.*, 2: 1-13.
- Huang, Z., Zhang, J., Gu, Y., Cai, Z., Feng, X., Yang, C., and Xin, G. 2022a. Research progress on inosine monophosphate deposition mechanism in chicken muscle. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 62(4): 1062-1078.
- Huang, Z., Zhang, J., Gu, Y., Cai, Z., Wei, D., Feng, X., & Yang, C. 2022b. Analysis of the molecular mechanism of inosine monophosphate deposition in Jingyuan chicken muscles using a proteomic approach. *Poult. Sci.*, 101(4): 101741.
- Hudson, J. 2023. La Fleche Chicken: Eggs, Temperament, Size and Raising Tips. <https://cs-tf.com/lafleche-chickens/#:~:text=Like%20many%20of%20the%20other,reached%20the%20brink%20of%20extinction.> [Son erişim tarihi: 24.09.2023].
- İlhan, D.D. 2019. Denizli ve Gerze tavuk ırkları TVB lokusundaki yeni polimorfizmlerin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 67 s.
- İnce, N.G., Onuk, B., Alan, E., Sizer, S.S., Aydın, Alan, A., Kabak, M. 2018. Gerze Horoz ve Tavuklarının (Gallus domesticus) Tunica Fibrosa Bulbi'si Üzerinde Anatomik, Histolojik ve Elektron Mikroskopik İncelemeler. *Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 7(1): 40-44.
- Jebessa, E., Ouyang, H., Abdalla, B. A., Li, Z., Abdullahi, A. Y., Liu, Q., ... and Zhang, X. 2018. Characterization of miRNA and their target gene during chicken embryo skeletal muscle development. *Oncotarget*, 9(25): 17309.
- Jin, S., Lee, S. H., Lee, D. H., Manjula, P., Lee, S. H., and Lee, J. H. 2020. Genetic association of DEGS1, ELOVL6, FABP3, FABP4, FASN and SCD genes with fatty acid composition in breast and thigh muscles of Korean native chicken. *Anim. Genet.*, 51(2): 344-345.
- Jolanta, C. 2014. Capon Production-Breeding Stock, Rooster Castration and Rearing Methods, and Meat Quality. A Review. *Ann. Anim. Sci.*, 14: 769-777.

- Kaya, M. 2008. Denizli ve Gerze tavuk populasyonlarındaki genetik çeşitliliğin bazı mikrosatelit markörler kullanılarak belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 152 s.
- Kaya, M., ve YILDIZ, M. A. 2014. Tavuğun Evcilleştirilmesi ve Türkiye Yerli Tavuk Irkları. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 11(2): 21-28.
- Kim, G.D., Lee, J.H., Song, S., Kim, S.W., Han, J.S., Shin, S.P., ... and Park, T.S. 2020. Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase. *The FASEB Journal*, 34(4): 5688-5696.
- Kim, T. K. 2015. T test as a parametric statistic. *Korean J. Anesthesiol.*, 68(6): 540-546.
- Kmoch, S., Hartmannová, H., Stibůrková, B., Krijt, J., Zikánová, M., and Šebesta, I. 2000. Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients. *Hum. Mol. Genet.*, 9(10): 1501-1513.
- Kong, B.W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., ... and Bottje, W. 2017. RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line. *BMC Genom.*, 18(1): 1-19.
- Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., ... and Burgering, B.M. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419(6904), 316-321.
- Krause, T., Jolkver, E., Bruchhaus, S., Kramer, M., and Hemmje, M. 2021. An RT-qPCR data analysis platform. *Proceedings* <http://ceur-ws.org> ISSN, 1613, 0073.
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., Granata, C., Bishop, D.J. 2018. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*. 13(5): 10.
- Kubota, S., Vandee, A., Keawnakient, P., Molee, W., Yongsawatdikul, J., and Molee, A. 2019. Effects of the MC4R, CAPN1, and ADSL genes on body weight and purine content in slow-growing chickens. *Poult. Sci.*, 98(10): 4327-4337.
- Kumaravel, V., Mohan, B., Natarajan, A., Murali, N., Selvaraj, P., & Vasanthakumar, P. 2023. Effect on growth performance, carcass traits, and myostatin gene expression in Aseel chicken fed varied levels of dietary protein in isocaloric energy diets. *Trop. Anim. Health Prod.*, 55(2), 82.
- Lee, H.Y., Kim, J.M., Byun, M.J., Kang, K.S., Kim, T.H., Hong, K.C., and Lee, K.T. 2011. Structure and polymorphisms of the 5' regulatory region of porcine adenylate kinase 3-like 1 gene and effect on trait of meat quality. *Genes Genom.*, 33, 147-153.
- Lee, D. K., In, J., and Lee, S. 2015. Standard deviation and standard error of the mean. *Korean J. Anesthesiol.*, 68(3): 220-223.
- Lee, J., Kim, D.H., and Lee, K. 2020. Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(4): 1504.
- Leenstra, F., Maurer, V., Bestman, M., Van Sambeek, F., Zeltner, E., Reuvekamp, B., Galea, F., Van Niekerk, T. 2012. Performance of commercial laying hen

- genotypes on free range and organic farms in Switzerland, France and The Netherlands. *Br. Poult. Sci.*, 53: 282–290.
- Lenger, Ö.F. 2011. Türkiye’deki Yerli Tavuk Irkları ve Ticari Tavuk Tipleri Arasındaki, Mhc Gen Bölgesindeki, Genetik Farklılıkların Belirlenmesi. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 92 s.
- Li, P., Ogino, K., Hoshikawa, Y., Morisaki, H., Cheng, J., Toyama, K., ... and Hisatome, I. 2007. Remote reperfusion lung injury is associated with AMP deaminase 3 activation and attenuated by inosine monophosphate. *Circ. J.*, 71(4): 591-596.
- Li, Z., Abdalla, B. A., Zheng, M., He, X., Cai, B., Han, P., ... and Zhang, X. (2018). Systematic transcriptome-wide analysis of mRNA–miRNA interactions reveals the involvement of miR-142-5p and its target (FOXO3) in skeletal muscle growth in chickens. *Mol. Genet. Genom.*, 293: 69-80.
- Li, G., Zhao, Y., Li, Y., Chen, Y., Jin, W., Sun, G. et al. 2019a. Weighted gene coexpression network analysis identifies specific transcriptional modules and hub genes related to intramuscular fat traits in chicken breast muscle. *J. Cell. Biochem.* 120(8): 13625–39.
- Li, G., Zhang, T., Zhang, G., Chen, L., Han, W., Dai, G., ... and Wang, J. 2019b. Analysis of gene co-expression networks and function modules at different developmental stages of chicken breast muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 508(1): 177-183.
- Li, Y., Chen, Y., Jin, W., Fu, S., Li, D., Zhang, Y., ... and Li, G. 2019c. Analyses of MicroRNA and mRNA expression profiles reveal the crucial interaction networks and pathways for regulation of chicken breast muscle development. *Front. Genet.*, 10: 197.
- Li, D., Pan, Z., Zhang, K., Yu, M., Yu, D., Lu, Y., ... and Du, W. 2020. Identification of the differentially expressed genes of muscle growth and intramuscular fat metabolism in the development stage of yellow broilers. *Genes*, 11(3): 244.
- Li, Y., Mei, H., Liu, Y., Li, Z., Qamar, H., Yu, M., and Ma, X. 2023. Dietary Supplementation with Rutin Alters Meat Quality, Fatty Acid Profile, Antioxidant Capacity, and Expression Levels of Genes Associated with Lipid Metabolism in Breast Muscle of Qingyuan Partridge Chickens. *Foods*, 12(12): 2302.
- Liu, S., Wang, Y., Wang, L., Wang, N., Li, Y., and Li, H. 2010. Transdifferentiation of fibroblasts into adipocyte-like cells by chicken adipogenic transcription factors. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 156(4): 502-508.
- Liu, J., Fu, R., Liu, R., Zhao, G., Zheng, M., Cui, H., ... and Wen, J. 2016. Protein profiles for muscle development and intramuscular fat accumulation at different post-hatching ages in chickens. *PLoS One*, 11(8): e0159722.
- Liu, R., Wang, H., Liu, J., Wang, J., Zheng, M., Tan, X., ... and Wen, J. 2017. Uncovering the embryonic development-related proteome and metabolome signatures in breast muscle and intramuscular fat of fast-and slow-growing chickens. *BMC Genom.*, 18(1): 1-15.

- Liu, L., Liu, X., Cui, H., Liu, R., Zhao, G., and Wen, J. 2019. Transcriptional insights into key genes and pathways controlling muscle lipid metabolism in broiler chickens. *BMC Genom.*, 20(1): 1-10.
- Liu, Y., Zhang, M., Shan, Y., Ji, G., Ju, X., Tu, Y., ... and Shu, J. 2020. miRNA-mRNA network regulation in the skeletal muscle fiber phenotype of chickens revealed by integrated analysis of miRNAome and transcriptome. *Sci. Rep.*, 10(1): 1-9.
- Liu, Y., Sun, D., Li, X., Ge, M., and Hou, Z. 2023. Research Note: Identification of core promoter region of the polyunsaturated fatty acid synthesis-related gene family in chicken. *Poult. Sci.*, 102857.
- Lundy, C.T., Jungbluth, H., Pohl, K.R., Siddiqui, A., Marinaki, A.M., Mundy, H., and Champion, M.P. 2010. Adenylosuccinate lyase deficiency in the United Kingdom pediatric population: first three cases. *Pediatr. Neurol.*, 43(5): 351-354.
- Ma, T., Xu, L., Wang, H., Chen, J., Liu, L., Chang, G., and Chen, G. 2015. Mining the key regulatory genes of chicken inosine 5'-monophosphate metabolism based on time series microarray data. *J. Anim. Sci.*, 6(1): 1-11.
- Maharani, D., Seo, D. W., Choi, N. R., Jin, S., Cahyadi, M., Jo, C., & Lee, J. H. 2013. Association of FASN and SCD genes with fatty acid composition in broilers. *CNU J. Agr. Sci.*, 40(3): 215-220.
- Mancini, R.A., Hunt, M.C. 2005. Current Research in Meat Color. *Meat Sci.*, 71: 100-121.
- Masic, U. and Yeomans, M.R. 2014. Umami flavor enhances appetite but also increases satiety. *Am. J. Clin. Nutr.*, 100(2): 532-538.
- Maqsood, R., and Ayyub, R. M. 2021. Systematic Literature Review of Halal Ethnic Foods Consumption; Health-Related Scientific; and Marketing Perspective. In: V. Ramadani, B.A. Alserhan, L.P. Dana, J. Zeqiri, H. Terzi, M. Bayirli (Eds.), Global Islamic Marketing Conference. Cham: Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 203-226.
- Mazzoni, M., Petracci, M., Meluzzi, A., Cavani, C., Clavenzani, P., & Sirri, F. 2015. Relationship between pectoralis major muscle histology and quality traits of chicken meat. *Poult. Sci.*, 94(1), 123-130.
- McKnight, P. E., and Najab, J. 2010. Mann-Whitney U Test. *The Corsini encyclopedia of psychology*, 1-1.
- Mercan, L. 2010. Yerli tavuk genotiplerinin ticari genotipler ile olan genetik farklılığının SSR (Simple Sequence repeats-Basit dizi tekrarları) yöntemi ile analizi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 159 s.
- Mercan, L., Bilgi, F., ve Budak, M. 2019. Saf Gerze tavuğu ve Sinop ili köy tavuğu popülasyonlarının sekiz polimorfik mikrosatellit lokusu bakımından karşılaştırılması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 34(2): 164-171.
- Mercan, L., BÜLBÜL, C. E., Bilgi, F., and Marakli, S. 2022. Determination of plant-specific retrotransposons in chicken. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, 46(1): 67-73.

- Mir, N. A., Rafiq, A., Kumar, F., Singh, V., and Shukla, V. 2017. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review *J. Food Sci. Technol.*, 54: 2997-3009.
- Mu, F., Jing, Y., Ning, B., Huang, J., Cui, T., Guo, Y., ... and Wang, N. 2020. Peroxisome proliferator-activated receptor γ isoforms differentially regulate preadipocyte proliferation, apoptosis, and differentiation in chickens. *Poult. Sci.*, 99(12): 6410-6421.
- Mueller, S., Kreuzer, M., Siegrist, M., Mannale, K., Messikommer, R.E., and Gangnat, I.D. 2018. Carcass and meat quality of dual-purpose chickens (Lohmann Dual, Belgian Malines, Schweizerhuhn) in comparison to broiler and layer chicken types. *Poult. Sci.*, 97(9): 3325-3336.
- Narukawa, M., Morita, K., and Hayashi, Y. 2008. L-Theanine elicits an umami taste with inosine 5'-monophosphate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(11): 3015-3017.
- Nematbakhsh, S., Pei Pei, C., Selamat, J., Nordin, N., Idris, L.H., and Abdull Razis, A.F. 2021. Molecular regulation of lipogenesis, adipogenesis and fat deposition in chicken. *Genes*, 12(3): 414.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 1(3): 1559-82.
- Nolan, T., and Bustin, S. A. (Eds.). (2013). PCR technology: current innovations. CRC press, Boca Raton, FL,.
- Northcutt, J.K. 2009. Factors affecting poultry meat quality. *Bulletin*, 1157.
- Orrù, G., Marini, M.F., Ciusa, M.L. et al. 2006. Usefulness of real time PCR for the differentiation and quantification of 652 and JP2 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in dental plaque and saliva. *BMC Infect. Dis.*, 6: 98
- Ouyang, H., He, X., Li, G., Xu, H., Jia, X., Nie, Q., and Zhang, X. 2015. Deep sequencing analysis of miRNA expression in breast muscle of fast-growing and slow-growing broilers. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(7): 16242-16262.
- Özdemir, D., Maretto, F., Casandro, M. 2016. Comparison of genetic diversity of Turkish and Italian local chicken breeds for further conservation strategies. *Eur. Poult. Sci.*, 80.
- Özdemir, D. 2019. Poultry Biodiversity And Unregistered Native Chicken Breeds Of Turkey. "Agriculture, Forestry And Aquaculture Sciences Research Papers", Gece Academy, New York, USA.
- Özdoğan, N., and Gürcan, İ.S. 2006. Denizli ve Gerze tavuk Irklarında Yumurta Verimine Ait Bazı Özellikler. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 46(2): 13-21.
- Pampouille, E., Berri, C., Boitard, S., Hennequet-Antier, C., Beauclercq, S.A., Godet, E., ... and Bihan-Duval, L. 2018. Mapping QTL for white striping in relation to breast muscle yield and meat quality traits in broiler chickens. *BMC Genom.*, 19(1): 1-14.

- Pellattiero, E., Tasoniero, G., Cullere, M., Gleeson, E., Baldan, G., Contiero, B., and Dalle Zotte, A. 2020. Are meat quality traits and sensory attributes in favor of slow-growing chickens?. *Animals*, 10(6): 960.
- Piórkowska, K., Nowak, J., Poltowicz, K., and Ropka-Molik, K. 2014. New polymorphisms in regulatory region of CAPN3 gene with no effect on gene expression in breast muscle of broiler chickens. *Ann. Anim. Sci.*, 14(3): 511.
- Piórkowska, K., Nowak, J., and Poltowicz, K. 2015. The normalisation of CAPN gene expression in M. pectoralis superficialis in broiler lines differing in growth rate and their relationship to breast muscle tenderness. *Br. Poult. Sci.*, 56(4): 452-458.
- Rengaraj, D., Lee, B.R., Jang, H.J., Kim, Y.M., and Han, J.Y. 2013. Comparative metabolic pathway analysis with special reference to nucleotide metabolism-related genes in chicken primordial germ cells. *Theriogenology*, 79(1): 28-39.
- Riggs, M.R., Hauck, R., Baker-Cook, B.I., Osborne, R.C., Pal, A., Terra, M.T.B., ... and Bourassa, D.V. 2023. Meat quality of broiler chickens processed using electrical and controlled atmosphere stunning systems. *Poult. Sci.*, 102(3): 102422.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 245(2): 154-60.
- Roelfsema, F., Yang, R.J., Takahashi, P.Y., Erickson, D., Bowers, C.Y., and Veldhuis, J.D. 2018. Effects of toremifene, a selective estrogen receptor modulator, on spontaneous and stimulated GH secretion, IGF-I, and IGF-binding proteins in healthy elderly subjects. *J. Endocr. Soc.*, 2(2): 154-165.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. 1999. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell*, 4: 611-7.
- Ross, A. and Willson, V.L. 2017. Independent samples T-test. In: Basic and advanced statistical tests, SensePublishers, Rotterdam, pp. 13-16
- San, J., Du, Y., Wu, G., Xu, R., Yang, J., and Hu, J. 2021. Transcriptome analysis identifies signaling pathways related to meat quality in broiler chickens—the extracellular matrix (ECM) receptor interaction signaling pathway. *Poult. Sci.*, 100(6): 101135.
- Sanchez, A. M., Candau, R. B., and Bernardi, H. 2014. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 1657-1671.
- Sanchez, I., Remm, M., Frاسquilho, S., Betsou, F., and Mathieson, W. 2015. How severely is DNA quantification hampered by RNA co-extraction?. *Biopreserv. Biobank.*, 13(5): 320-324.
- Sanz, M., Lopez-Bote, C.J., Menoyo, D., and Bautista, J.M. 2000. Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and β -oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *J. Nutr.*, 130(12): 3034-3037.

- Sato, K., Fukao, K., Seki, Y., and Akiba, Y. 2004. Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration. *Poult. Sci.*, 83(8): 1342-1347.
- Sato, K., Abe, H., Kono, T., Yamazaki, M., Nakashima, K., Kamada, T., and Akiba, Y. 2009. Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression of chicken abdominal adipose tissue with different age, sex and genotype. *Anim. Sci. J.*, 80(3): 322-327.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, 3(6): 1101-1108.
- Shao, M., Shi, K., Zhao, Q., Duan, Y., Shen, Y., Tian, J., ... and Feng, C. 2022. Transcriptome analysis reveals the differentially expressed genes associated with growth in Guangxi Partridge chickens. *Genes*, 13(5): 798.
- Shu, J.T., Bao, W.B., Zhang, H.X., Zhang, X.Y., Ji, C.L., and Chen, G.H. 2007. Correlation between adenylosuccinate lyase (ADSL) gene polymorphism and inosine monophosphate acid (IMP) content in domestic fowl and genetic relationship between red jungle fowl and domestic fowl. *Hereditas*, 29(3): 343-348.
- Shu, J.T., Bao, W.B., Zhang, X.Y., Zhang, H.X., and Chen, G. H. 2008. Association and haplotype analysis of purH gene with inosine monophosphate content in chickens. *Anim. Biotechnol.*, 19(4): 310-314.
- Shu, J.T., Bao, W.B., Zhang, X.Y., Ji, C.J., Han, W., and Chen, K.W. 2009. Combined effect of mutations in ADSL and GARS-AIRS-GART genes on IMP content in chickens. *Br. Poult. Sci.*, 50(6): 680-686.
- Shu, J.T., Chen, G.H., Han, W., and Zhang, X.Y. 2010. Analysis of the genetic effects of three single nucleotide polymorphisms on inosine monophosphate content in Chinese Baier chicken. *Avian Biol. Res.*, 3(2): 75-80.
- Sorensen, P. 2001. Breeding strategies in poultry for genetic adaptation to the organic environment. In Breeding and feeding for animal health and welfare in organic livestock systems, Proceedings of the Fourth NAHWOA Workshop, pp. 51-62.
- Sorimachi, H., and Suzuki, K. 2001. The structure of calpain. *J. Biochem.*, 129(5): 653-664.
- Sun, Y. N., Gao, Y., Qiao, S. P., Wang, S. Z., Duan, K., Wang, Y. X., ... and Wang, N. 2014. Epigenetic DNA methylation in the promoters of peroxisome proliferator-activated receptor γ in chicken lines divergently selected for fatness. *J. Anim. Sci.*, 92(1): 48-53.
- Sun, G., Li, F., Ma, X., Sun, J., Jiang, R., Tian, Y., ... and Li, W. 2019. gga-miRNA-18b-3p inhibits intramuscular adipocytes differentiation in chicken by targeting the ACOT13 gene. *Cells*, 8(6), 556.
- Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K., and Ishiura, S. 1995. Calpain: novel family members, activation, and physiological function. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 376: 523-523.
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H. 2004. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53(1): S12-S18.

- Şekeroğlu, A. 1993. Gerze (Hacıkadı) ve Denizli tavuk ırklarının yumurta verimi ve kalite özellikleri. Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 52 s.
- Şekeroğlu, A., ve Özen, N. 1997. Gerze (Hacıkadın) ve Denizli Tavuk Irklarının Bazı Verim Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması. *Akdeniz University Journal of the Faculty of Agriculture*, 10(1): 41-57.
- Talpur, M. Z., Wang, K., Ahmed, I., Li, Z., Liu, L., Li, Q., ... and Wang, S. 2018. Analysis of differentially expressed genes related to intramuscular fat and chemical composition in different breeds of chicken. *Pak. J. Agric. Sci.*, 55(3).
- Tanabe, T., Yamada, M., Noma, T., Kajii, T., and Nakazawa, A. 1993. Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J. Biochem.*, 113(2): 200-207.
- Tarai, S., Thyagarajan, D., and Srinivasan, G. 2017. Effect of aging on mitochondrial gene expression in chicken breast muscle. *J. World's Poult. Res.*, 7(3): 104-113.
- Tegetmeier, W.B. 1893. Poultry for the Table and Market. Cox, London, pp. 189.
- Tekeli, A., Özcan, A., ve Kutlu, H.R. 2016. Etlik Piliçlerde Odunsu Göğüs Eti ‘Wooden Breast’ Sorunu. *TURJAF*, 4(11): 962-967.
- Thiele, H.H. 2001. Breeding strategies to increase fitness in poultry. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108: 140-144.
- Tong, H.B., Wang, Q., Lu, J., Zou, J.M., Chang, L.L., and Fu, S.Y. 2014. Effect of free-range days on a local chicken breed: Growth performance, carcass yield, meat quality, and lymphoid organ index. *Poult. Sci.*, 93(8): 1883-1889.
- Toparlan, E., Mercan, L., ve Kuran, M. (2015). Kalıtımın epigenetik boyutunda DNA metilasyon desenleri. *Hayvansal Üretim Dergisi*, 56(2): 38-42.
- Toparlan, E. ve Özdemir, D. 2022. Molecular Factors Affecting Chicken Meat Quality and Flavor. IV. *Balkan Agricultural Congress*. 31 August-02 September 2022, Edirne, Turkey.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace Jr, A. J., DiStefano, P. S., ... and Greenberg, M. E. 2002. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*, 296(5567): 530-534.
- Tripathi, A.K., Aparnathi, M.K., Vyavahare, S.S., Ramani, U.V., Rank, D.N., ve Joshi, C.G. 2012. Myostatin gene silencing by RNA interference in chicken embryo fibroblast cells. *J. Biotechnol.*, 160(3-4): 140-145.
- Tripathi, A.K., Aparnathi, M.K., Patel, A.K., and Joshi, C.G. 2013. In vitro silencing of myostatin gene by shRNAs in chicken embryonic myoblast cells. *Biotechnology progress*, 29(2): 425-431.
- Tunim, S., Phasuk, Y., Aggrey, S. E., and Duangjinda, M. 2021. Increasing fat deposition via upregulates the transcription of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in native crossbred chickens. *Animals*, 11(1): 90.
- Van Der Vos, K.E., and Coffey, P.J. 2011. The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxidants & redox signaling*, 14(4): 579-592.

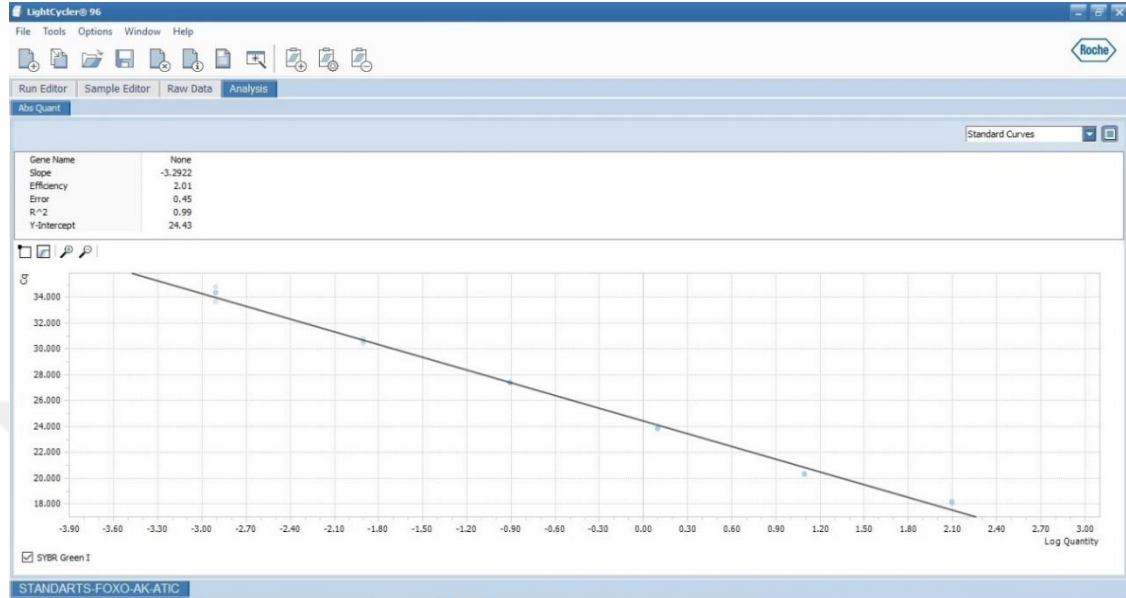
- Wang, Y., Y. Mu, H. Li, N. Ding, Q. Wang, S. Wang, and N. Wang. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene: a key regulator of adipocyte differentiation in chickens. *Poult. Sci.* 87 (2): 226-232.
- Wang, X.F., Liu, G.H., Cai, H.Y., Chang, W.H., Ma, J.S., Zheng, A.J., and Zhang, S. 2014. Attempts to increase inosinic acid in broiler meat by using feed additives. *Poult. Sci.*, 93(11): 2802-2808.
- Wang, Y., Liu, W., Hang, C., Du, Y., Chen, Y., Xing, J., ... and Qiu, D. 2019. Association of A-FABP gene polymorphism and mRNA expression with intramuscular fat content (IMF) in Baicheng-You chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 103(5): 1447-1452.
- Wang, Y., Chen, H., Hang, C., Chen, Y., Gao, J., and Qiu, D. 2023. Correlation of lipoprotein lipase gene polymorphism and mRNA expression with intramuscular fat content in Baicheng-Oil chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 107(1): 222-227.
- Wu, P., Dai, G., Chen, F., Chen, L., Zhang, T., Xie, K., ... and Zhang, G. 2018. Transcriptome profile analysis of leg muscle tissues between slow-and fast-growing chickens. *Plos one*, 13(11): e0206131.
- Wu, P., Zhang, X., Zhang, G., Chen, F., He, M., Zhang, T., ... and Dai, G. 2020. Transcriptome for the breast muscle of Jinghai yellow chicken at early growth stages. *PeerJ.*, 8: e8950.
- Xing, J., Kang, L., & Jiang, Y. 2011. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenesis gene expression and CpG methylation of lipoprotein lipase gene in broilers. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 1975-1981.
- Xu, S. J., Yu, D. B., and Du, W. X. 2011. Current research advances in IMP and related enzymes. *Biotechnol. Bull.*, 3: 44-53.
- Xue, Q., Zhang, G., Li, T., Ling, J., Zhang, X., and Wang, J. 2017. Transcriptomic profile of leg muscle during early growth in chicken. *PLoS One*, 12(3): e0173824.
- Xue, J., Fang, C., Mu, R., Zhuo, R., Xiao, Y., Qing, Y., ... and Fang, R. 2022. Potential mechanism and effects of different selenium sources and different effective microorganism supplementation levels on growth performance, meat quality, and muscle fiber characteristics of three-yellow chickens. *FRONT. NUTR.*, 9: 869540.
- Xueyu, Z., L. Guohui, H. Wei. 2010. Genetic effects of two genes of inosine synthase synthase on inosine content in thoracic muscle of Sushen black-bone chicken. *J. Agric. For. Environ.*, 39(5): 513-516.
- Yadav, S.P., Kannaki, T.R., Mahapatra, R.K., Paswan, C., Bhattacharya, T.K., Sarkar, S.K., and Chatterjee, R.N. 2018. In vivo cell-mediated immune, hemagglutination inhibition response, hematological and biochemical values in native vs. exotic chicken breeds. *Poult. Sci.*, 97(9): 3063-3071.
- Yan, J., Liu, P., Xu, L., Huan, H., Zhou, W., Xu, X., and Shi, Z. 2018. Effects of exogenous inosine monophosphate on growth performance, flavor compounds, enzyme activity, and gene expression of muscle tissues in chicken. *Poult. Sci.*, 97(4): 1229-1237.

- Ye, M. H., Chen, J. L., Zhao, G. P., Zheng, M. Q., and Wen, J. 2010. Correlation between polymorphisms in ADSL and GARS-AIRS-GART genes with inosine 5'-monophosphate (IMP) contents in Beijing-you chickens. *Br. Poult. Sci.*, 51(5): 609-613.
- Yu, S., Wang, G., Liao, J., and Chen, X. 2021. A functional mutation in the AMPD1 promoter region affects promoter activity and breast meat freshness in chicken. *Anim. Genet.*, 52(1): 121-125.
- Yuan, T., Gu, J.R., Gu, W.B., Wu, J., Ge, S.R., and Xu, H. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of adenylosuccinate lyase gene in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Mol. Biol. Rep.*, 38(3): 2059-2065.
- Zanetti, E., De Marchi, M., Dalvit, C., Molette, C., Rémignon, H., and Cassandro, M. 2010. Carcase characteristics and qualitative meat traits of three Italian local chicken breeds. *Br. Poult. Sci.*, 51(5), 629-634.
- Zeki, S., 1931. Asri tavukçuluk. Hüsniyat Matbaası, İstanbul, 316 s.
- Zhai, B., Li, H., Li, S., Gu, J., Zhang, H., Zhang, Y., ... and Wang, Y. 2023. Transcriptome analysis reveals FABP5 as a key player in the development of chicken abdominal fat, regulated by miR-122-5p targeting. *BMC Genom.*, 24(1), 1-13.
- Zhang, Z.R., Liu, Y P., Jiang, X., Du, H.R., and Zhu, Q. 2008. Study on association of single nucleotide polymorphism of CAPN1 gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken populations. *J. Anim. Breed.*, 125(4): 258-264.
- Zhang, Z.R., Liu, Y.P., Yao, Y.G., Jiang, X.S., Du, H.R., and Zhu, Q. 2009. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens. *BMC Genet.*, 10(1): 1-7.
- Zhang, G., Ding, F., Wang, J., Dai, G., Xie, K., Zhang, L., ... ve Zhou, S. 2011. Polymorphism in exons of the myostatin gene and its relationship with body weight traits in the Bian chicken. *Biochem. Genet.*, 49: 9-19.
- Zhang, Z.R., Zhu, Q., Yao, Y.G., Jiang, X.S., Du, H.R., and Liu, Y.P. 2012. Characterization of the expression profile of calpain-3 (CAPN3) gene in chicken. *Mol. Biol. Rep.*, 39(4): 3517-3521.
- Zhang, S., McMillan, R.P., Hulver, M.W., Siegel, P.B., Sumners, L.H., Zhang, W., ... and Gilbert, E.R. 2014. Chickens from lines selected for high and low body weight show differences in fatty acid oxidation efficiency and metabolic flexibility in skeletal muscle and white adipose tissue. *Int. J. Obes.*, 38(10): 1374-1382.
- Zhang, M., Yan, F.B., Li, F., Jiang, K.R., Li, D.H., Han, R.L., ... and Sun, G.R. 2017. Genome-wide DNA methylation profiles reveal novel candidate genes associated with meat quality at different age stages in hens. *Sci. Rep.*, 7(1): 1-15.
- Zhang, T., Lu, H., Wang, L., Yin, M., and Yang, L. 2018a. Specific expression pattern of IMP metabolism related-genes in chicken muscle between cage and free range conditions. *Plos one*, 13(8): e0201736.
- Zhang, M., Li, D. H., Li, F., Sun, J. W., Jiang, R. R., Li, Z. J., ... and Sun, G. R. 2018b. Integrated analysis of MiRNA and genes associated with meat quality reveals that Gga-MiR-140-5p affects intramuscular fat deposition in chickens. *Cell. Physiol. Biochem.*, 46(6), 2421-2433.

- Zhang, X. X., Ran, J. S., Lian, T., Li, Z. Q., Yang, C. W., Jiang, X. S., ... and Liu, Y. P. 2019. The single nucleotide polymorphisms of myostatin gene and their associations with growth and carcass traits in Daheng broiler. *Braz. J. Poult. Sci.*, 21.
- Zhang, J., Hu, H., Mu, T., Wang, W., Yu, B., Guo, J., ... and Xin, G. 2020. Correlation analysis between AK1 mRNA expression and inosine monophosphate deposition in Jingyuan chickens. *Animals*, 10(3), 439.
- Zhang, G., He, M., Wu, P., Zhang, X., Zhou, K., Li, T., ... and Wang, J. 2021. MicroRNA-27b-3p targets the myostatin gene to regulate myoblast proliferation and is involved in myoblast differentiation. *Cells*, 10(2): 423.
- Zhao, S., Ma, H., Huang, G., and Zou, S. 2010. Hepatic lipolysis in broiler chickens with different fat deposition during embryonic development. *Res. Vet. Sci.*, 88(2): 321-325.
- Zhou, N., Lee, W. R., and Abasht, B. 2015. Messenger RNA sequencing and pathway analysis provide novel insights into the biological basis of chickens' feed efficiency. *BMC Genom.*, 16(1): 1-20.
- Zhu, Z., Wu, D. J., and Xu, N. Y. 2007. SNPs of myostatin gene and its genetic effects on carcass traits in chicken. *Hereditas*, 29(5): 593-598.
- Zhu, X., Li, Y.L., Liu, L., Wang, J.H., Li, H.H., Wu, P., ... and Zhang, J.S. 2016. Molecular characterization of Myf5 and comparative expression patterns of myogenic regulatory factors in *Siniperca chuatsi*. *Gene Expression Patterns*, 20(1): 1-10.

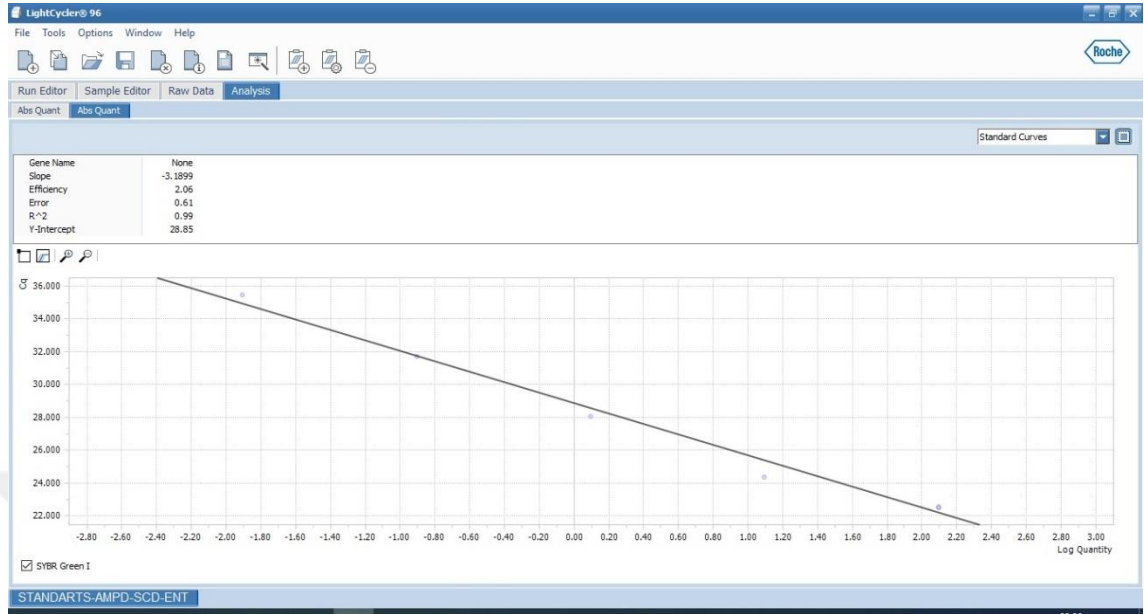
7. EKLER

EK-1. AK1 geni için tasarlanan primer çiftinin 6 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



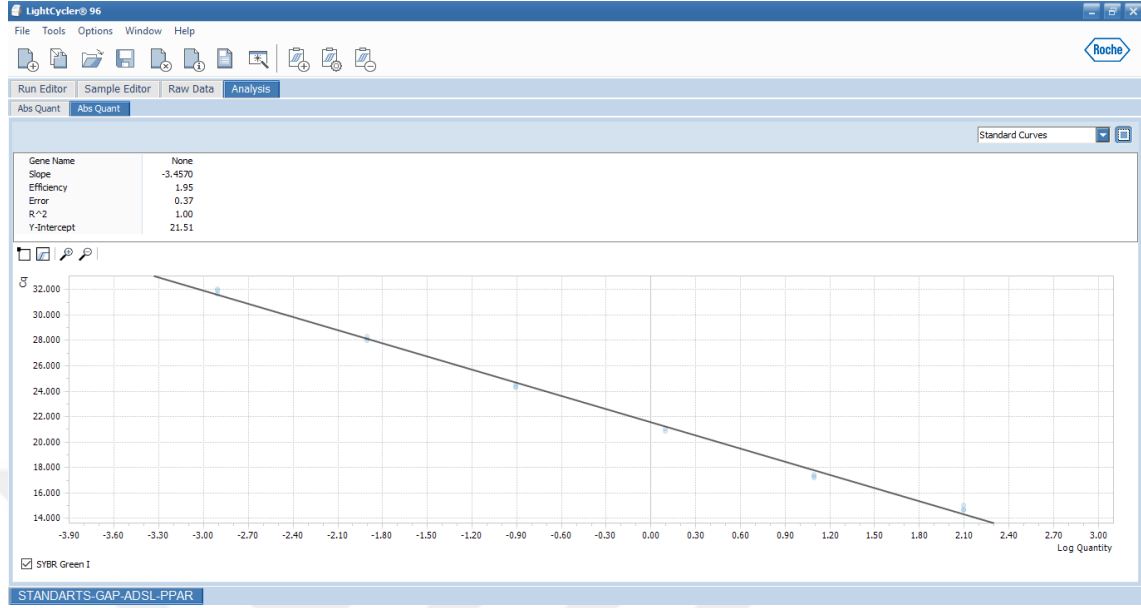
Eğim değeri -3.2922 ve R² değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %101,35 olarak hesaplanmıştır.

EK-2. *AMPD1* geni için tasarlanan primer çiftinin 5 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



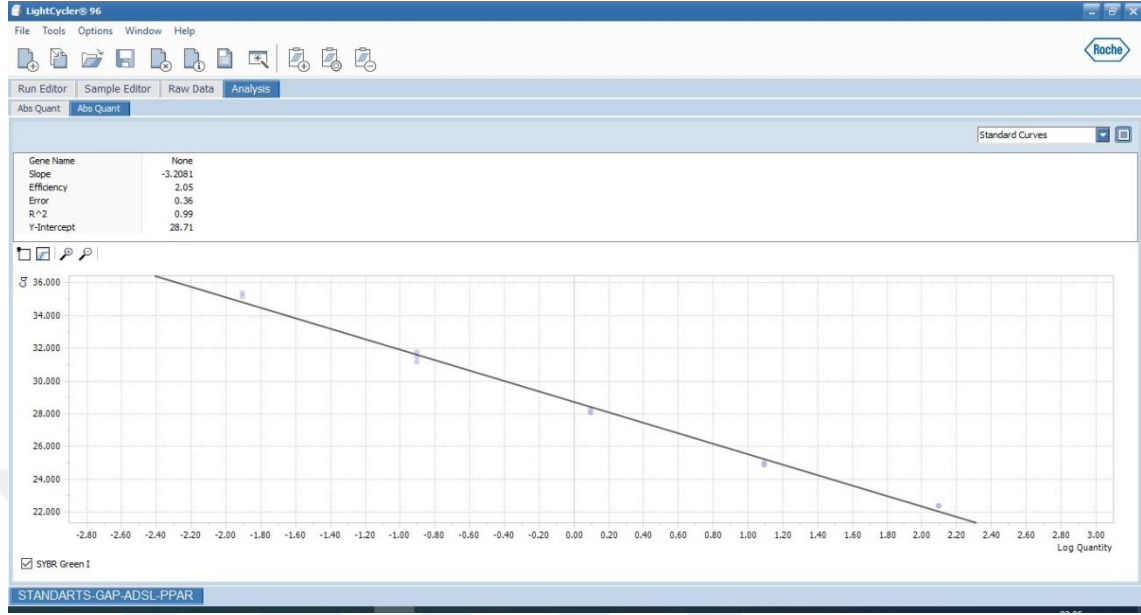
Eğim değeri -3.1899 ve R² değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %105,82 olarak hesaplanmıştır.

EK-3. *GAPDH* geni için tasarlanan primer çiftinin 6 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



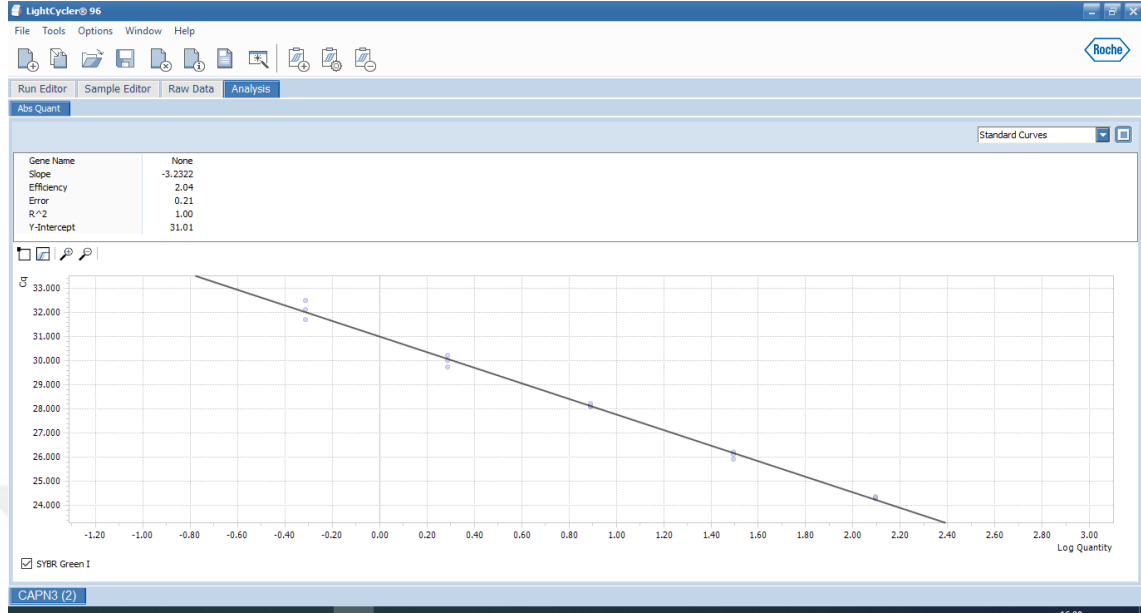
Eğim değeri -3.4570 ve R² değeri 1.00'dır. RT-qPCR verimliliği %94,97 olarak hesaplanmıştır.

EK-4. *ADSL* geni için tasarlanan primer çiftinin 5 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



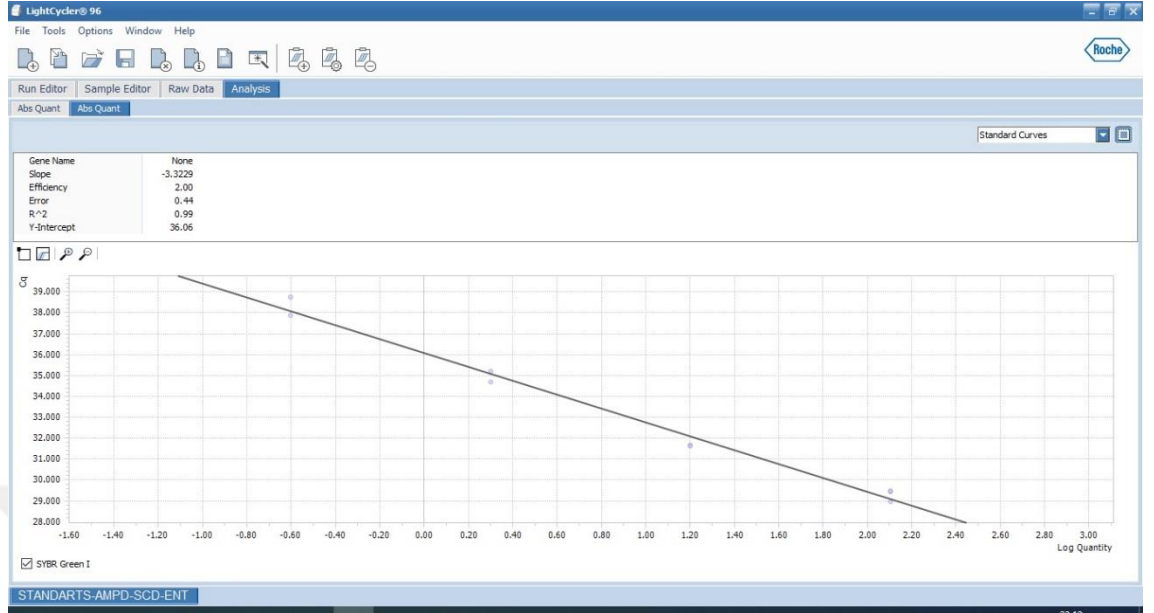
Eğim değeri -3.2081 ve R² değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %104,98 olarak hesaplanmıştır.

EK-5. *CAPN3* geni için tasarlanan primer çiftinin 5 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



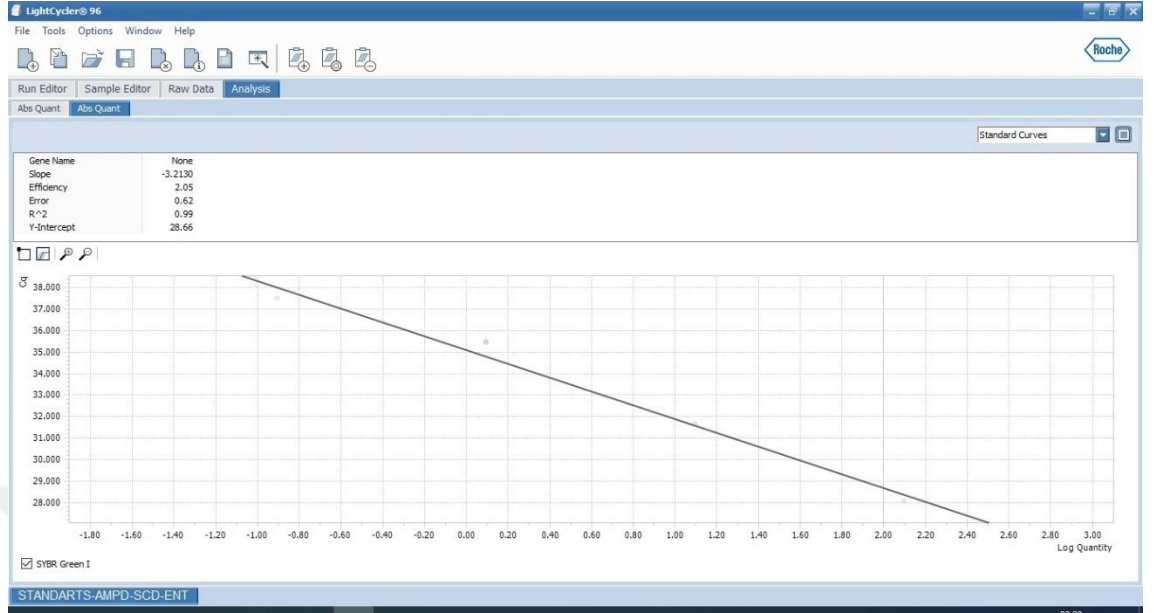
Eğim değeri -3.2322 ve R² değeri 1'dur. RT-qPCR verimliliği %100 olarak hesaplanmıştır.

EK-6. SCD geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



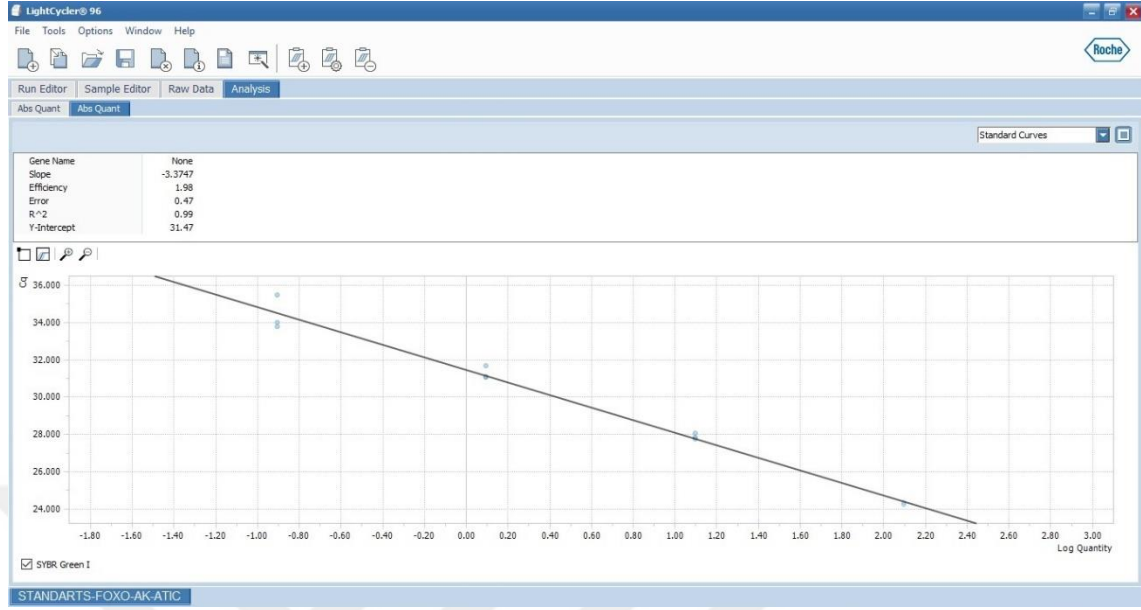
Eğim değeri -3.3229 ve R² değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %99,96 olarak hesaplanmıştır.

EK-7. *ENTPD8* geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği



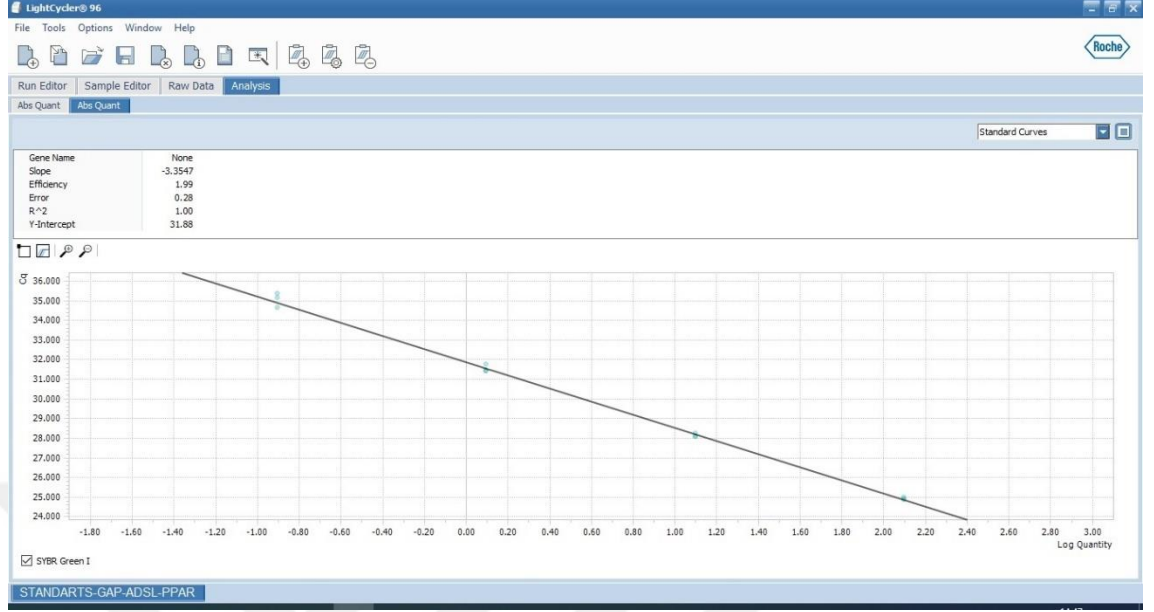
Eğim değeri -3.2130 ve R² değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %104,76 olarak hesaplanmıştır.

EK-8. *ATIC* geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



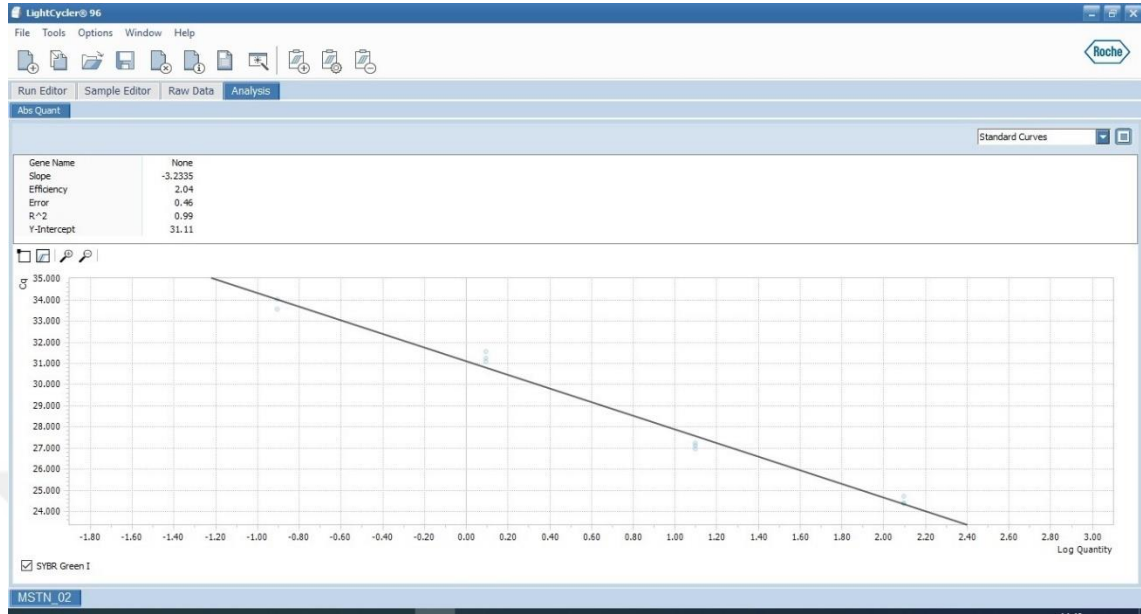
Eğim değeri -3.3747 ve R^2 değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %98,03 olarak hesaplanmıştır.

EK-9. *PPAR γ* geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



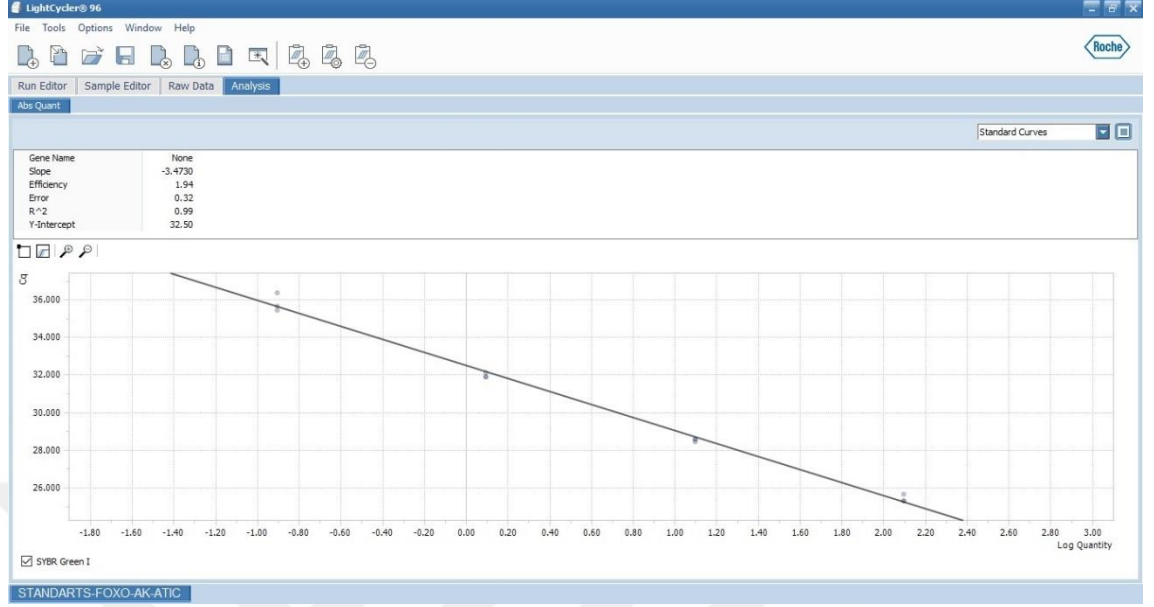
Eğim değeri -3.3547 ve R² değeri 1.00'dır. RT-qPCR verimliliği %98,84 olarak hesaplanmıştır.

EK-10. *MSTN* geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.



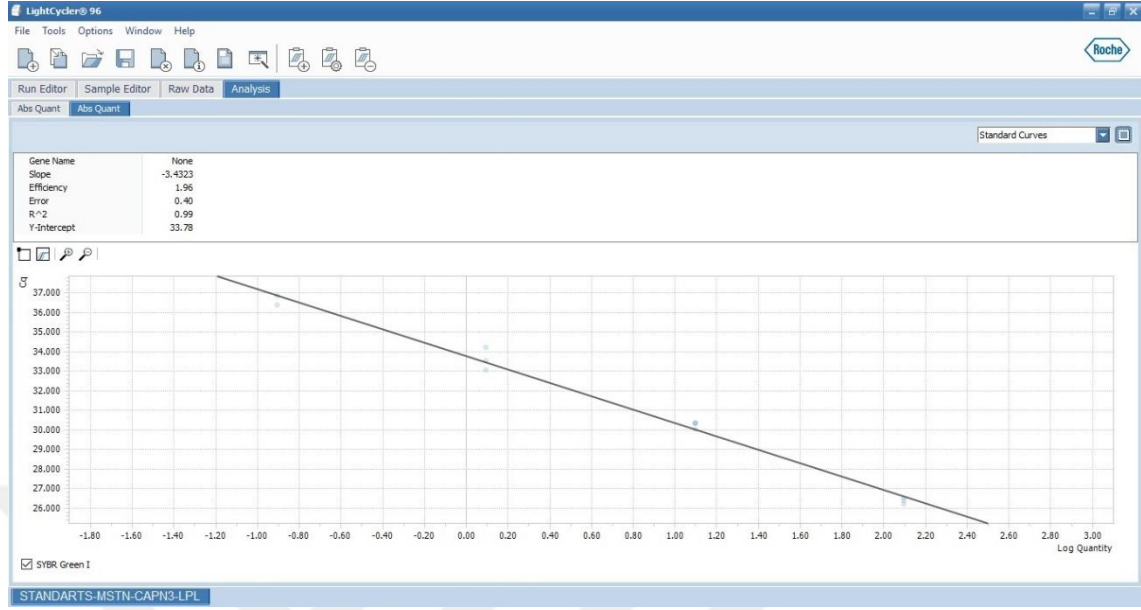
Eğim değeri -3.2335 ve R^2 değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %103,9 olarak hesaplanmıştır.

EK-11. *FOXO3* geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.

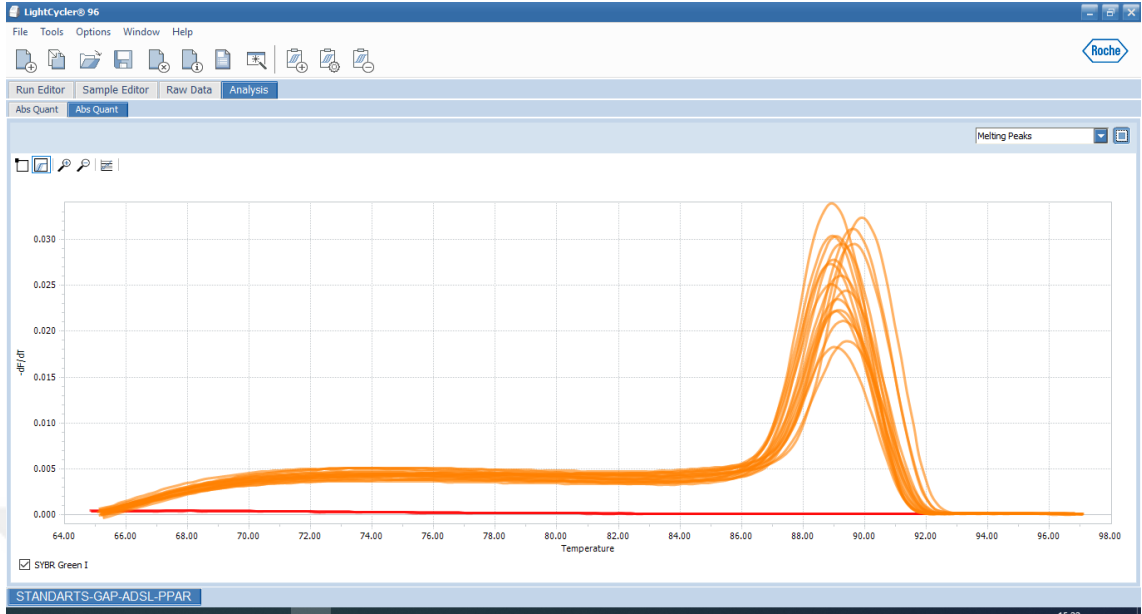


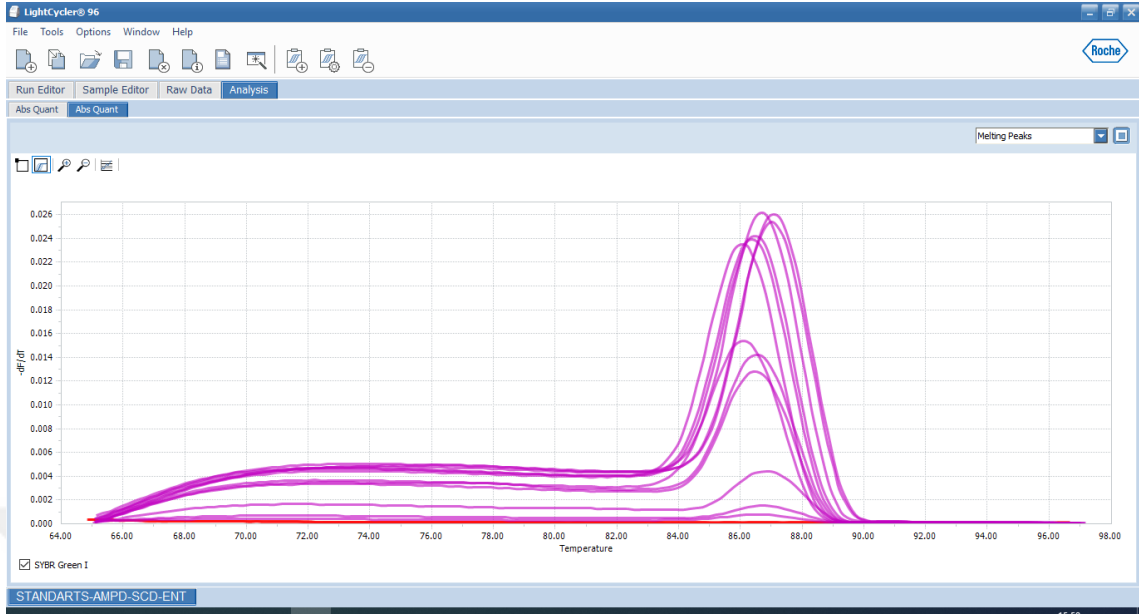
Eğim değeri -3.4730 ve R^2 değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %94,17 olarak hesaplanmıştır.

EK-12. *LPL* geni için tasarlanan primer çiftinin 4 farklı dilüsyon cDNA için oluşturduğu standart eğri grafiği.

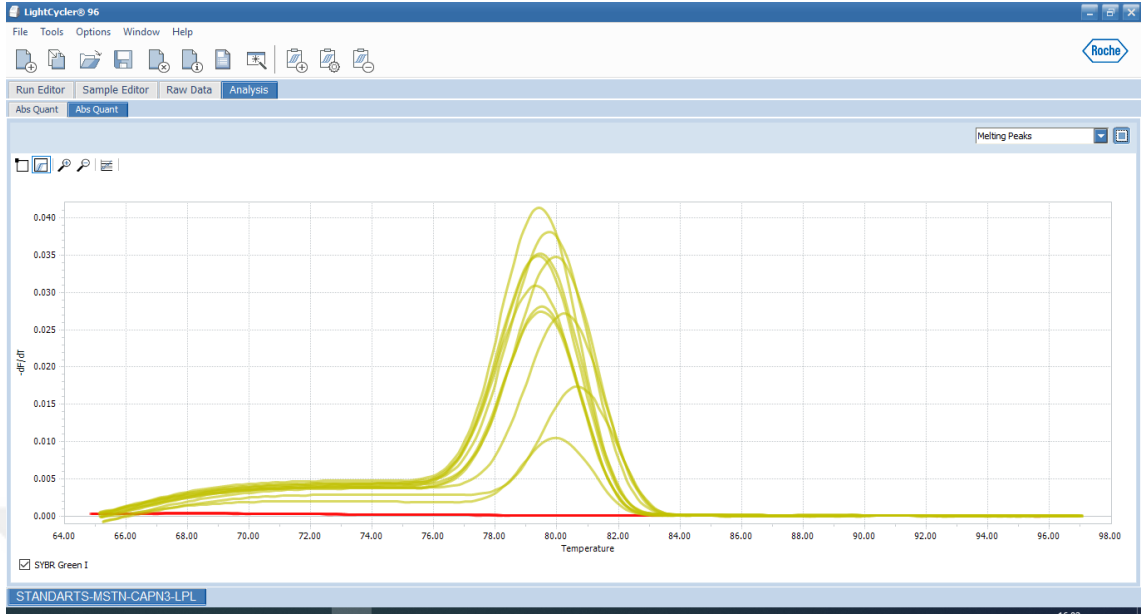


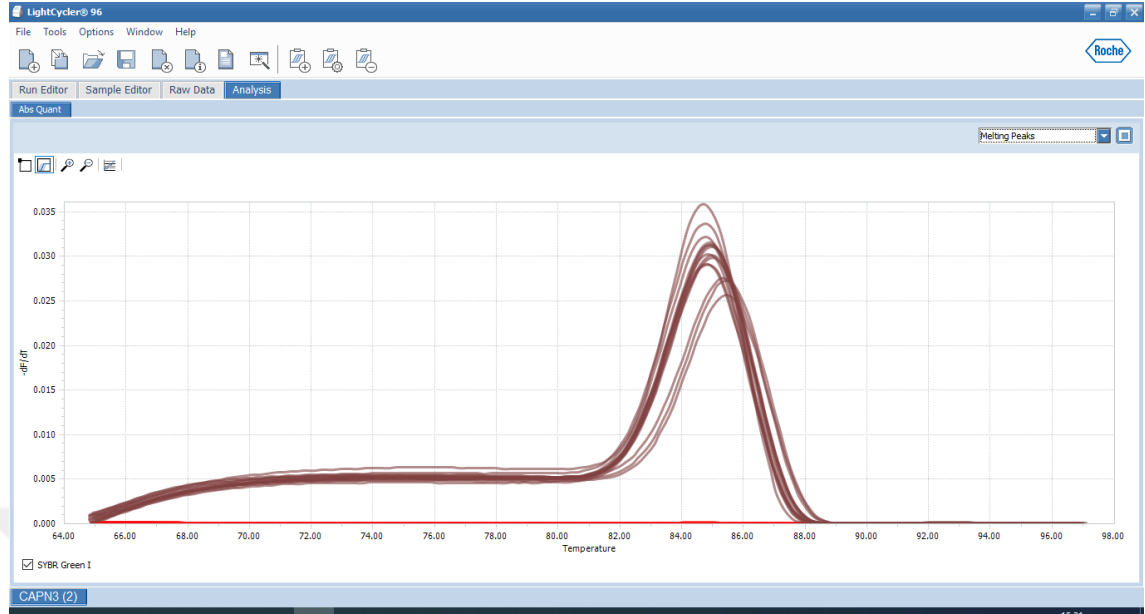
Eğim değeri -3.4323 ve R² değeri 0.99'dur. RT-qPCR verimliliği %95,68 olarak hesaplanmıştır.

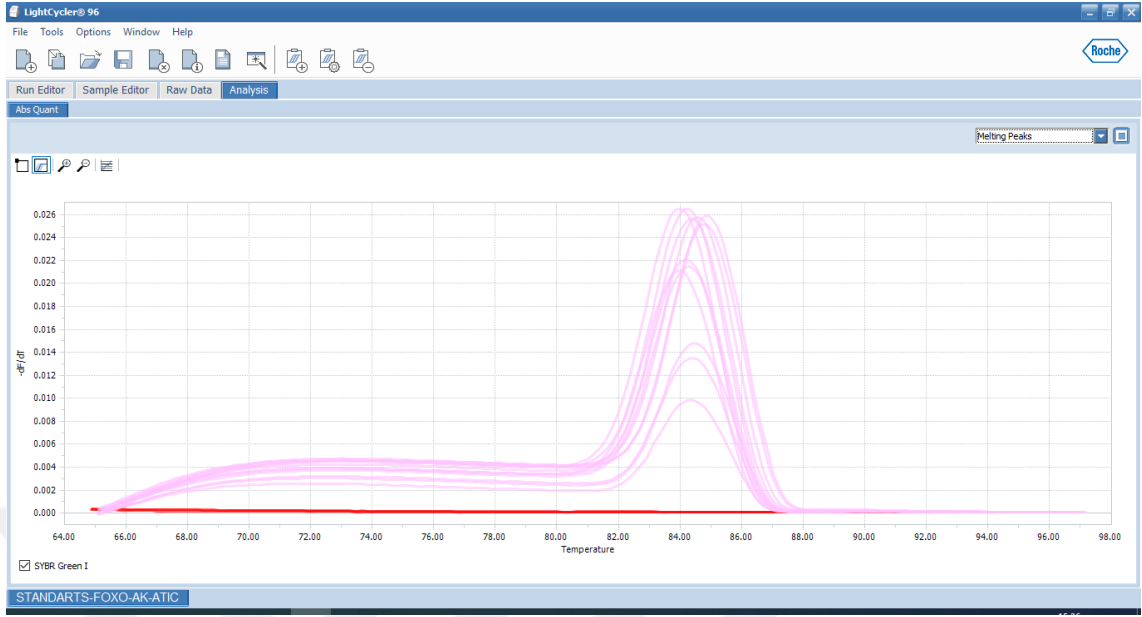
EK-13. *GAPDH* primerlerinin 6 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

EK-14. SCD primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

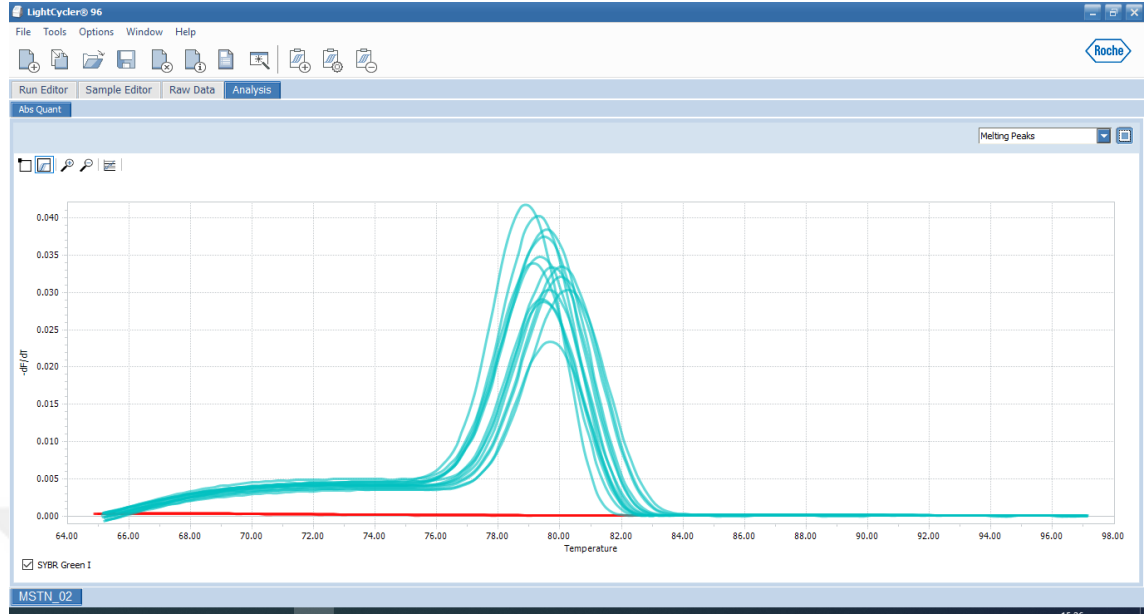
EK-15. *LPL* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.



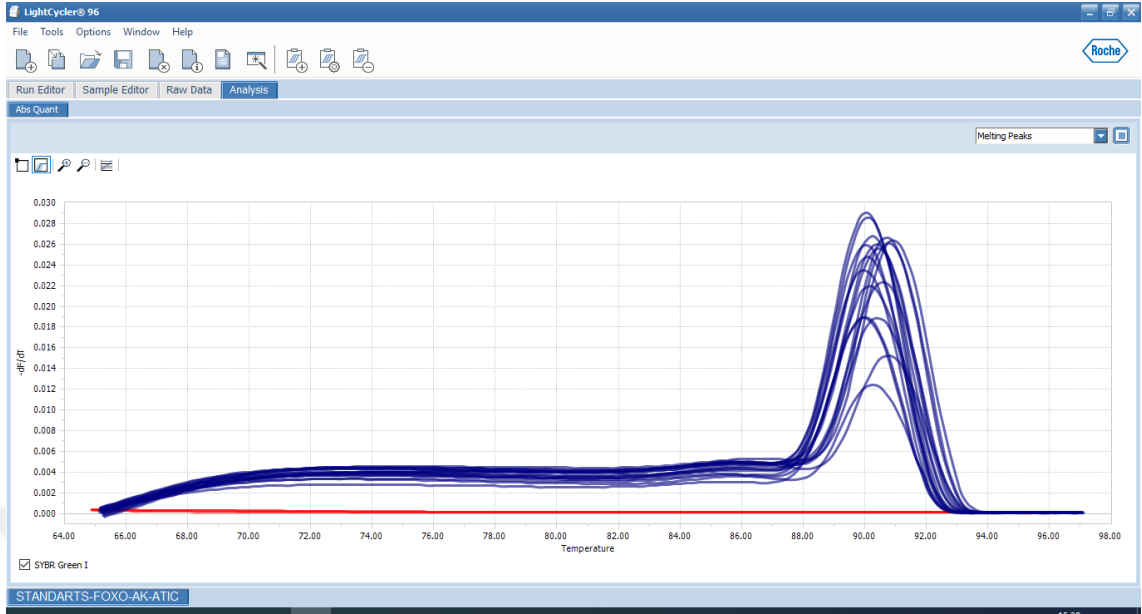
EK-16. *CAPN3* primerlerinin 5 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

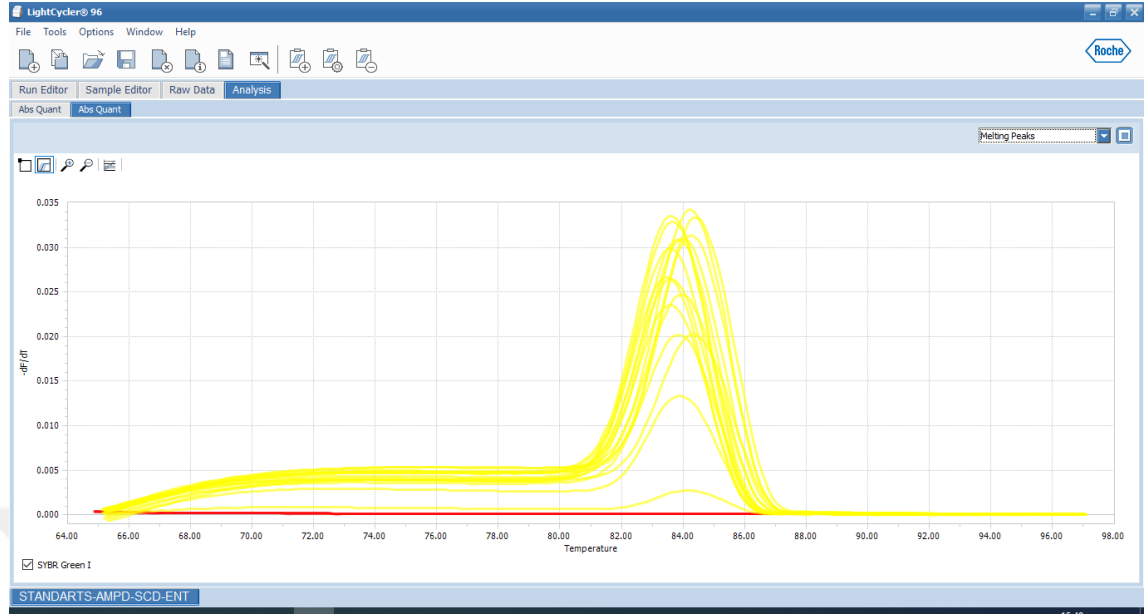
EK-17. *FOXO3* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

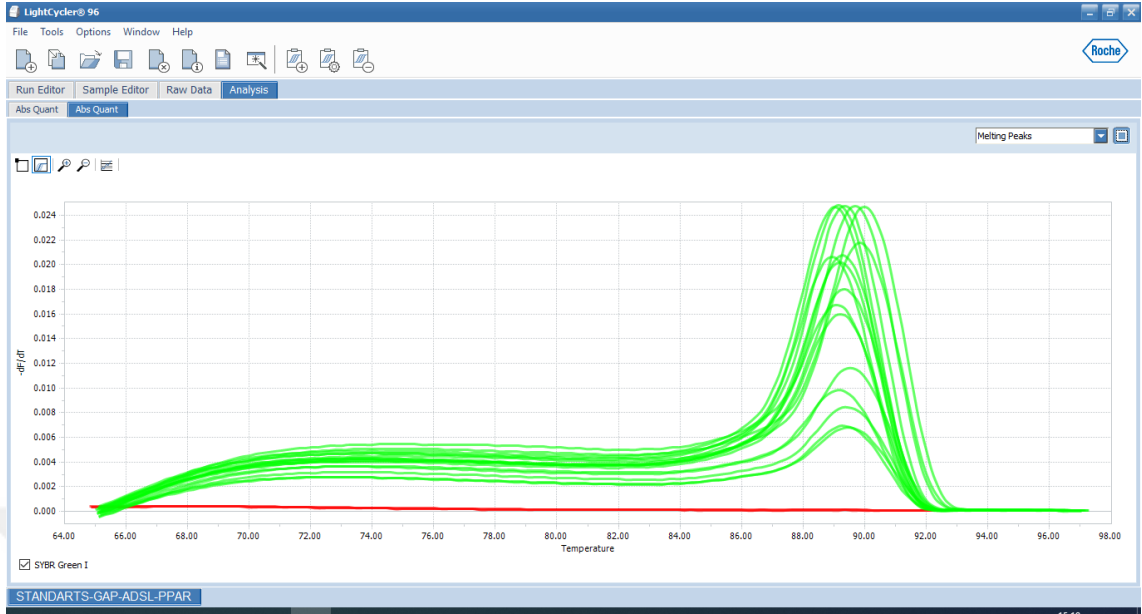
EK-18. *MSTN* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.



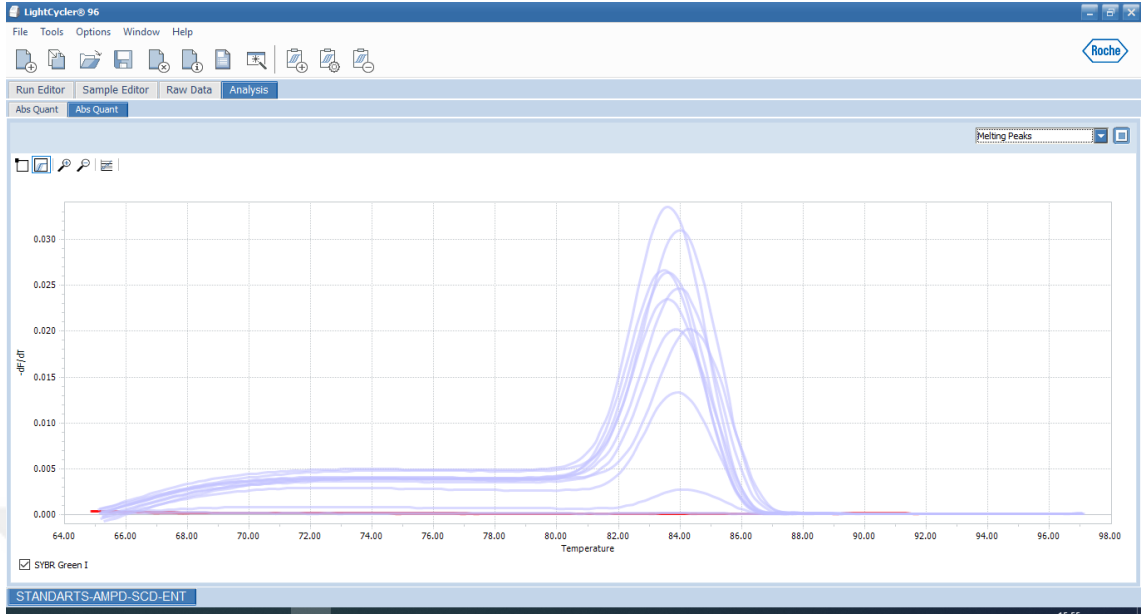
EK-19. AK1 primerlerinin 6 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

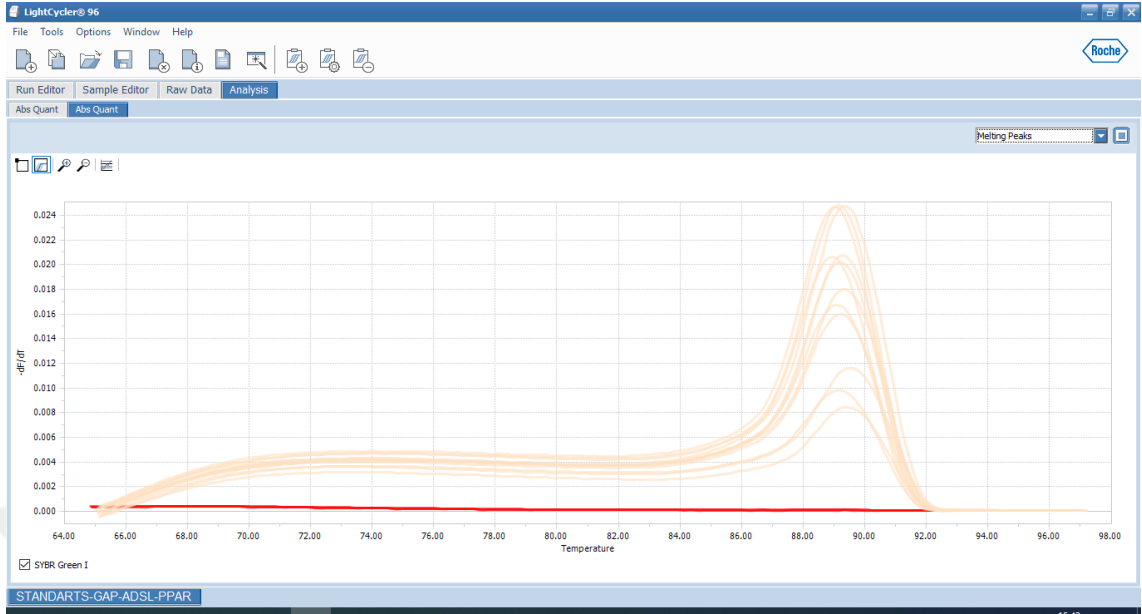


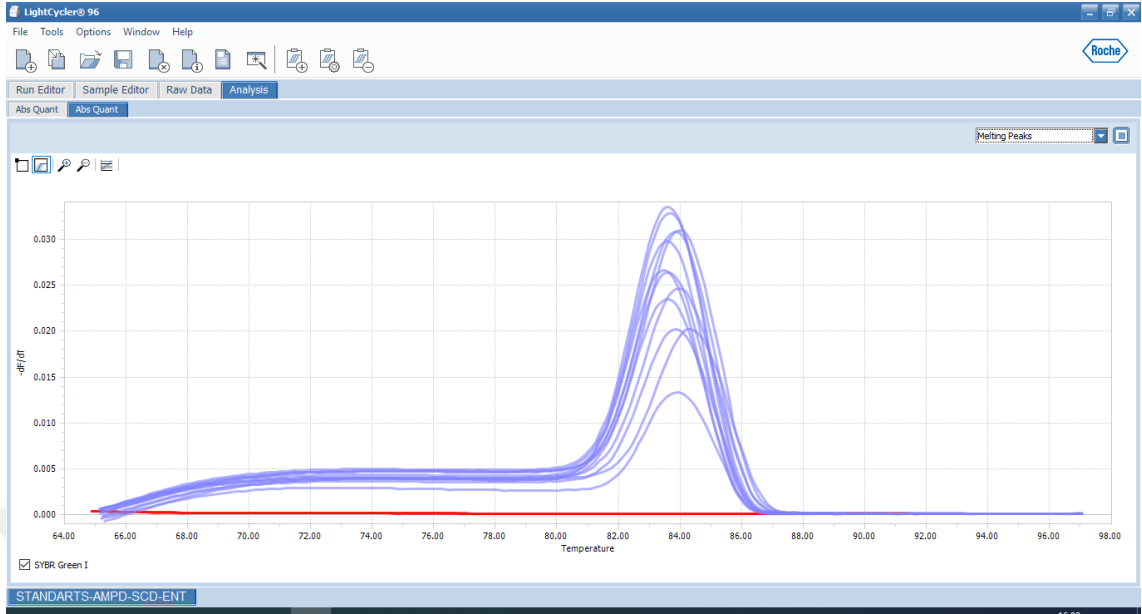
EK-20. *AMPD1* primerlerinin 5 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

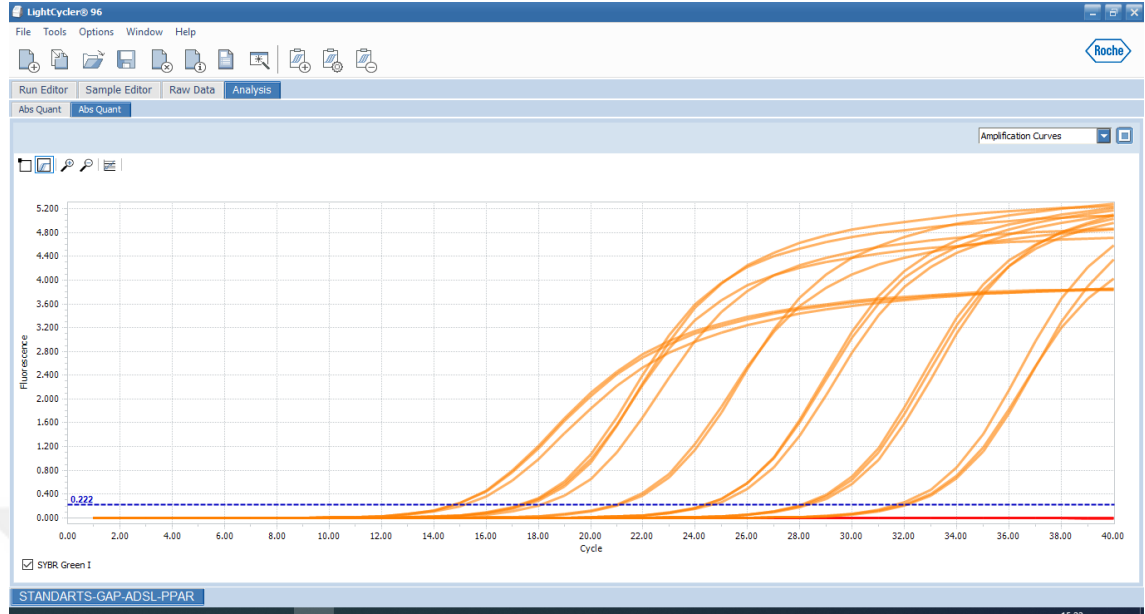
EK-21. ADSL primerlerinin 5 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

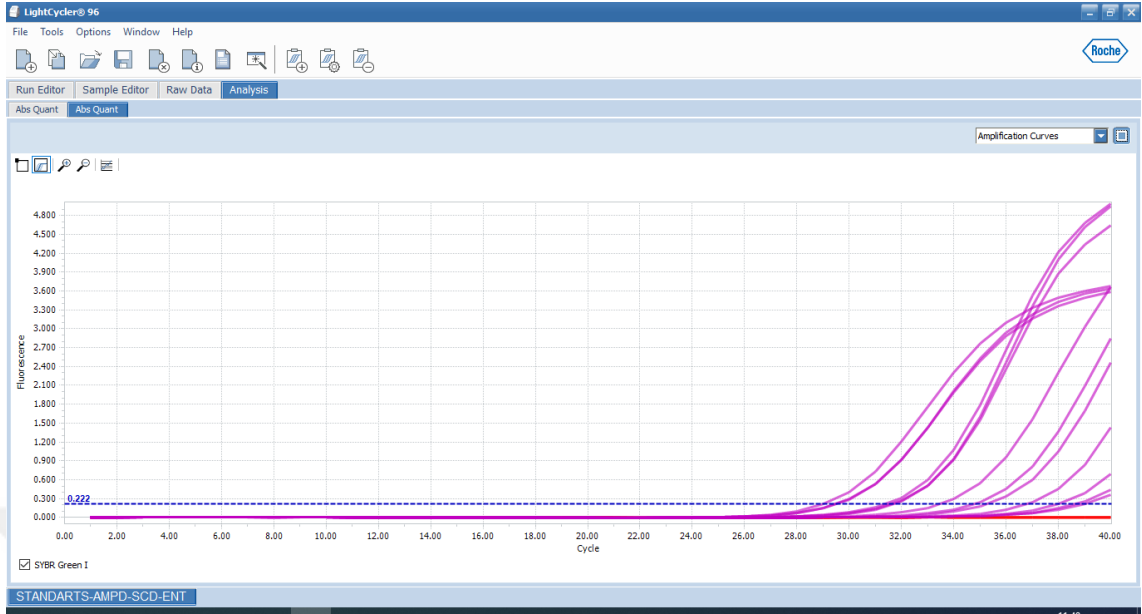
EK-22. *ENTPD8* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

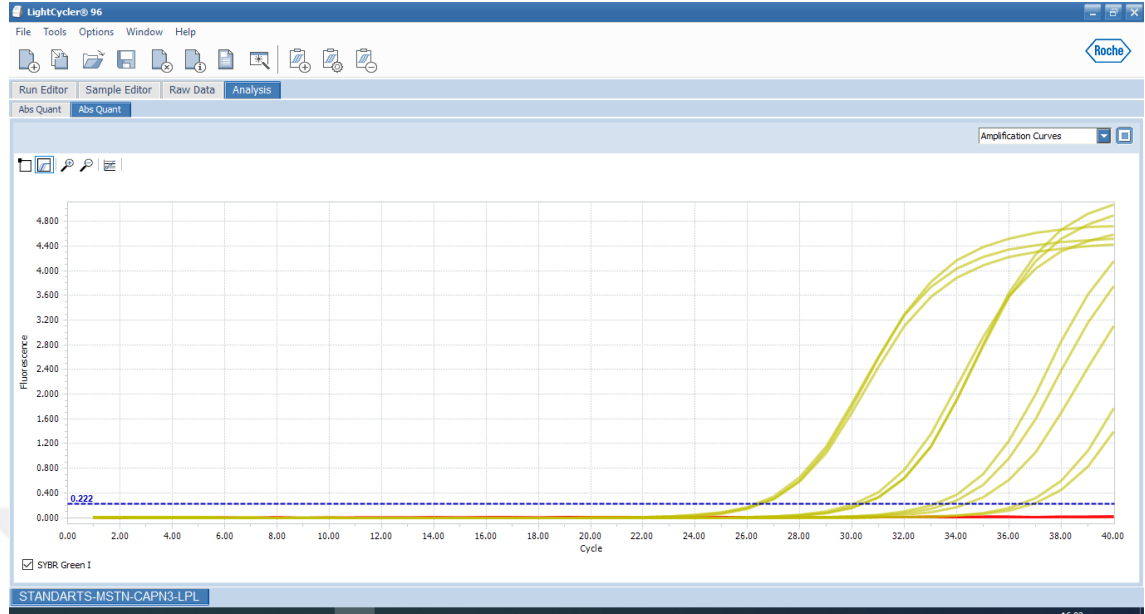


EK-23. *PPAR γ* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

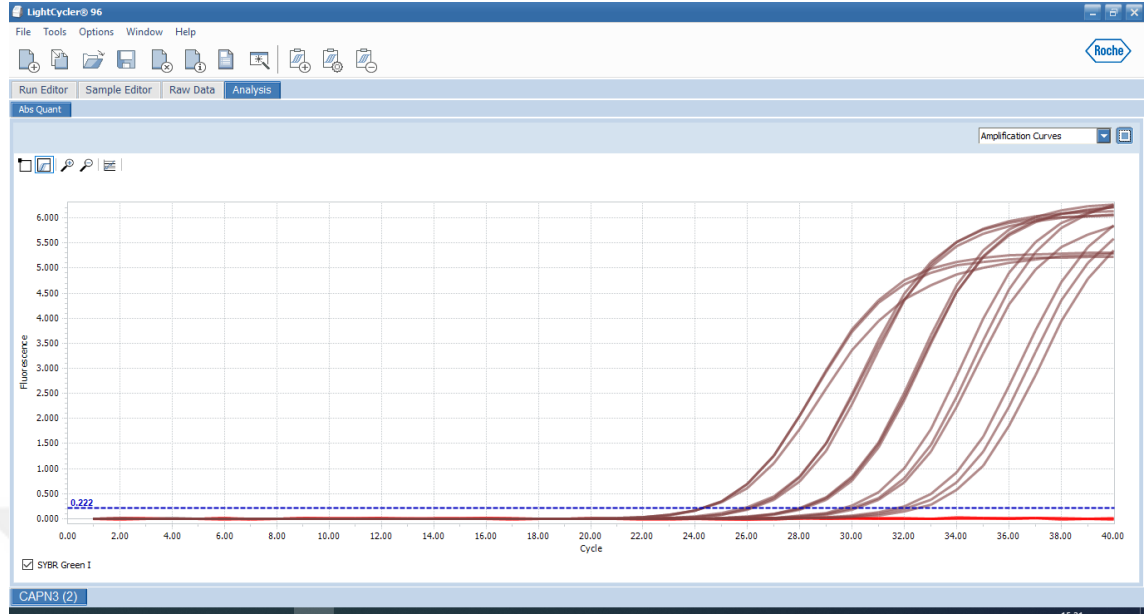
EK-24. *ATIC* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu erime eğrisi.

EK-25. *GAPDH* primerlerinin 6 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

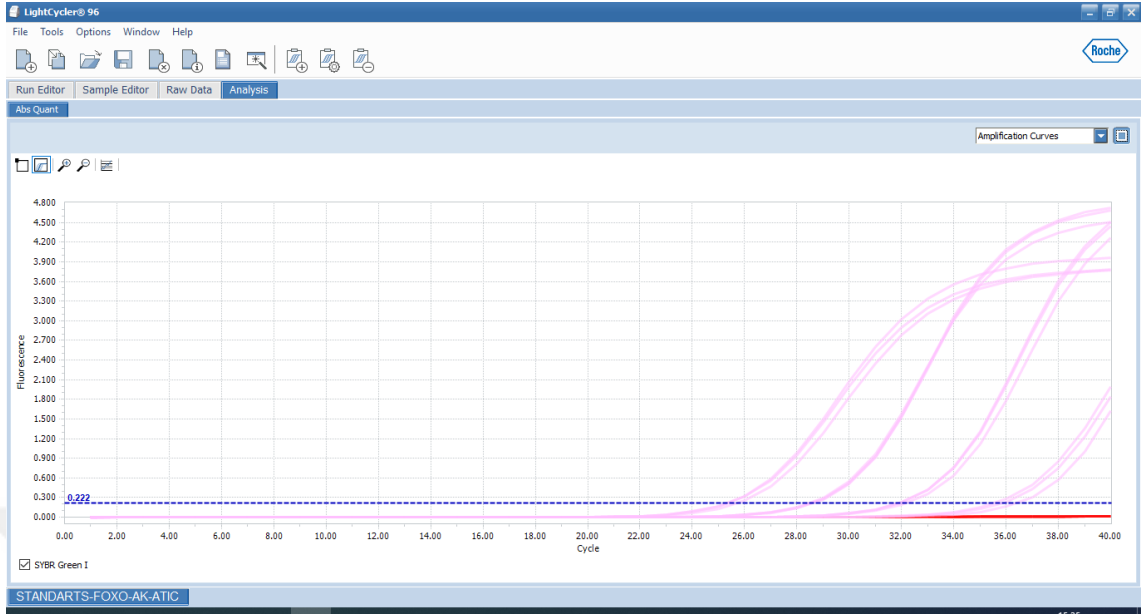
EK-26. SCD primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

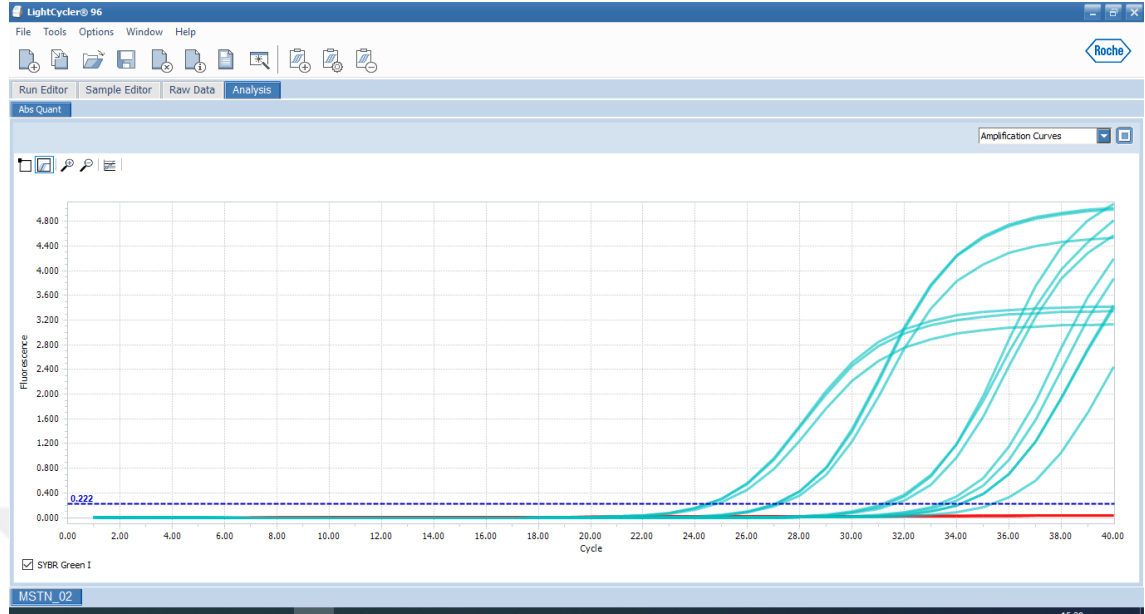
EK-27. LPL primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

EK-28. *CAPN3* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

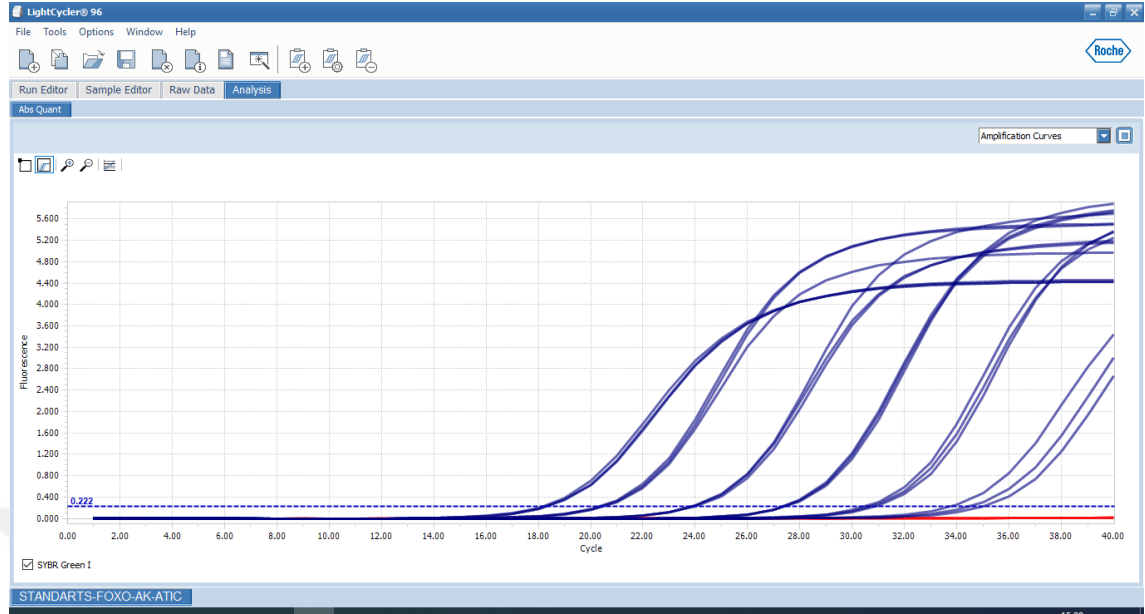


EK-29. *FOXO3* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

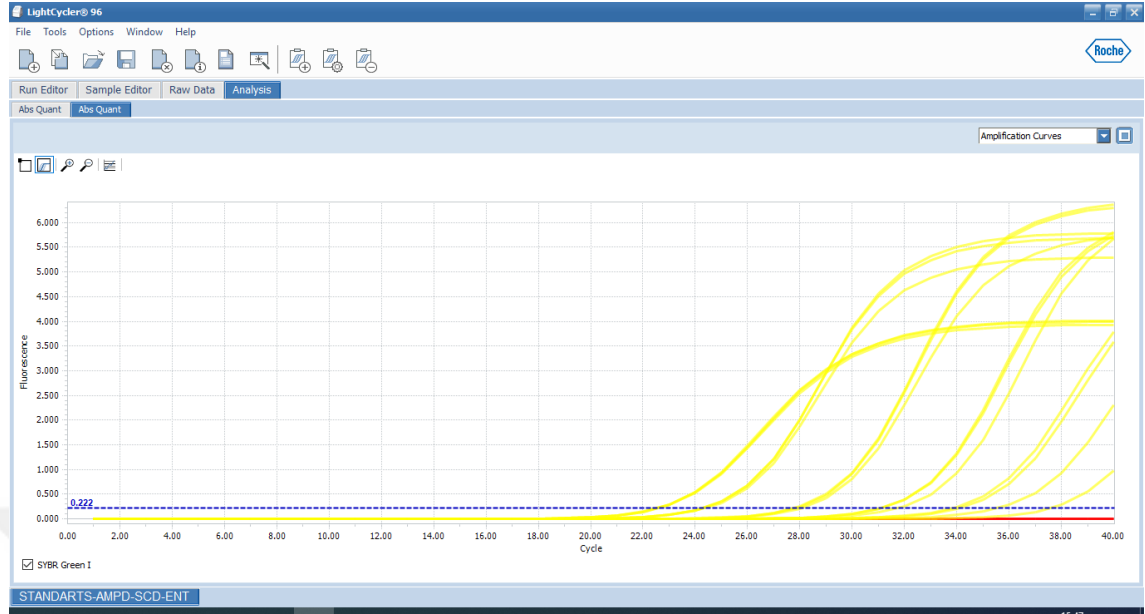


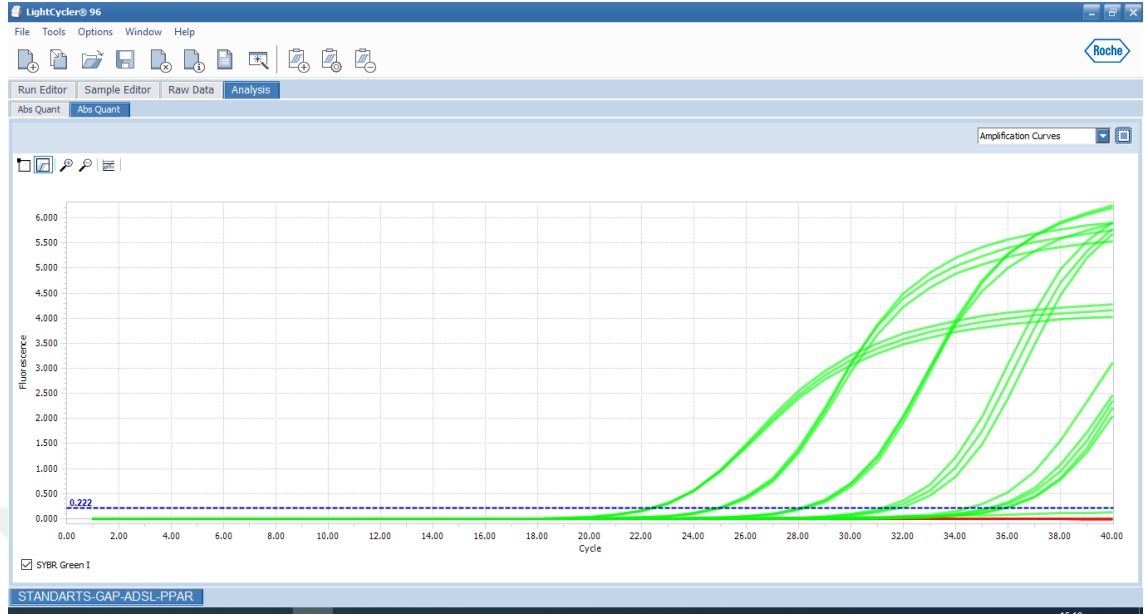
EK-30. *MSTN* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

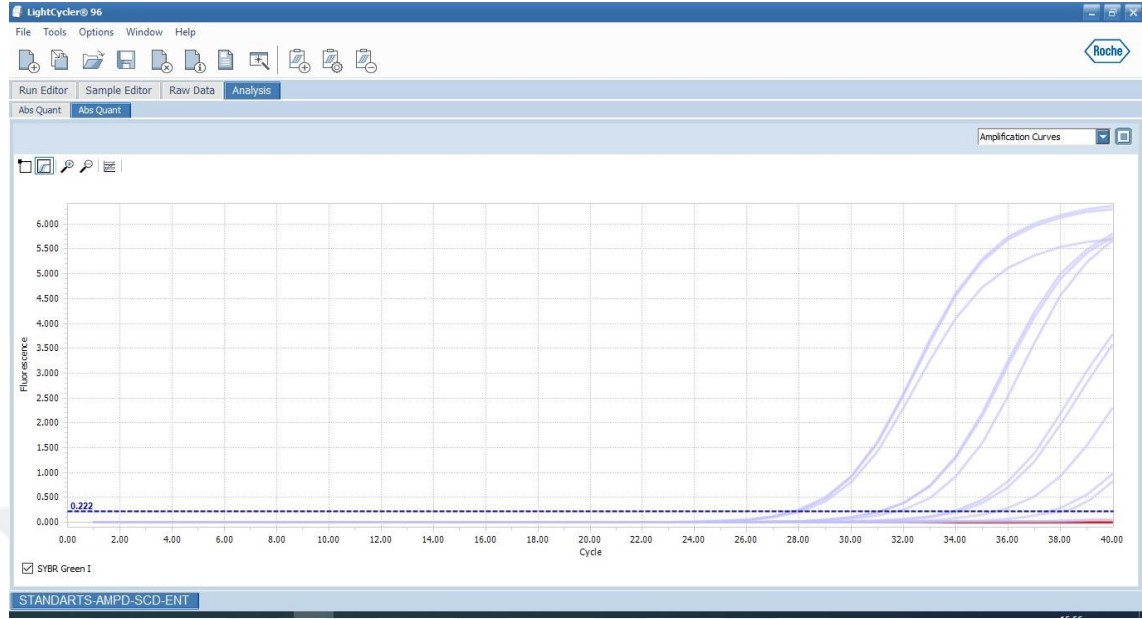
EK-31. AK1 primerlerinin 6 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

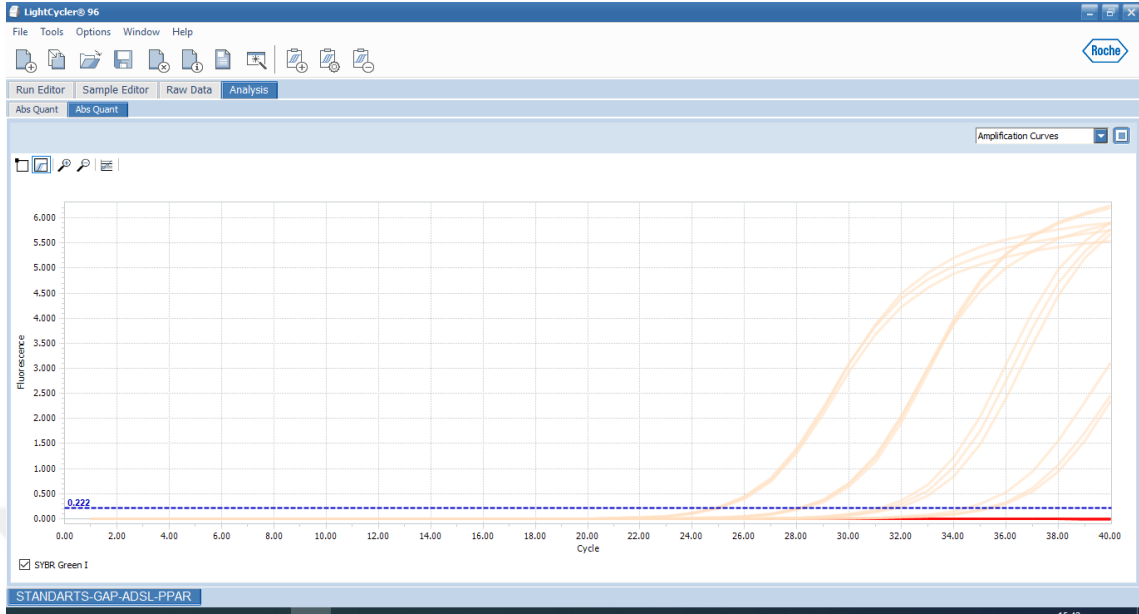


EK-32. *AMPD1* primerlerinin 5 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

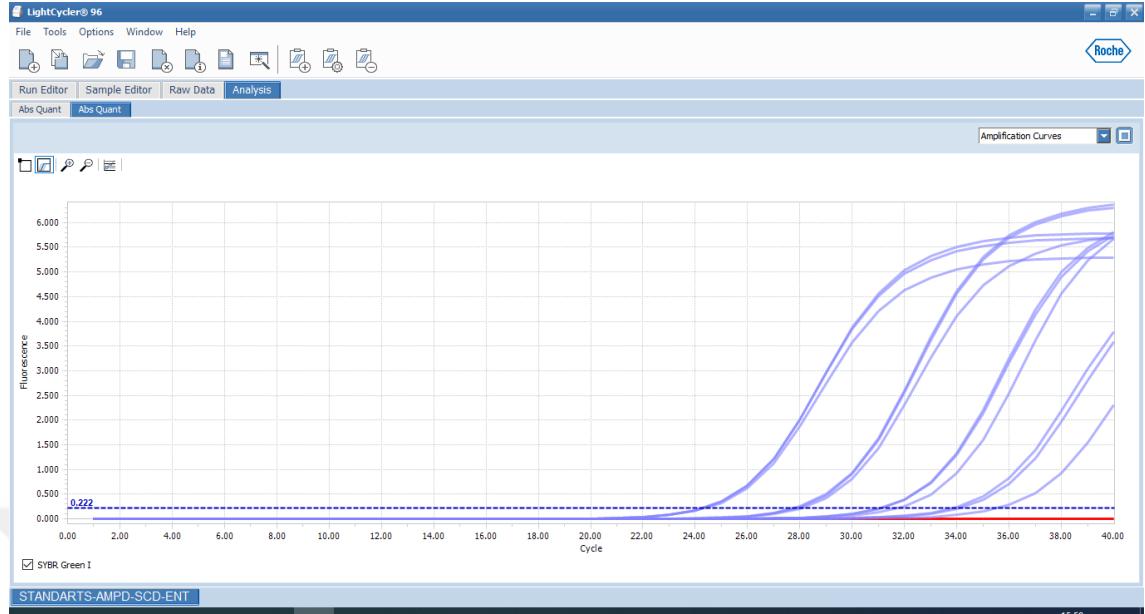


EK-33. ADSL primerlerinin 5 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

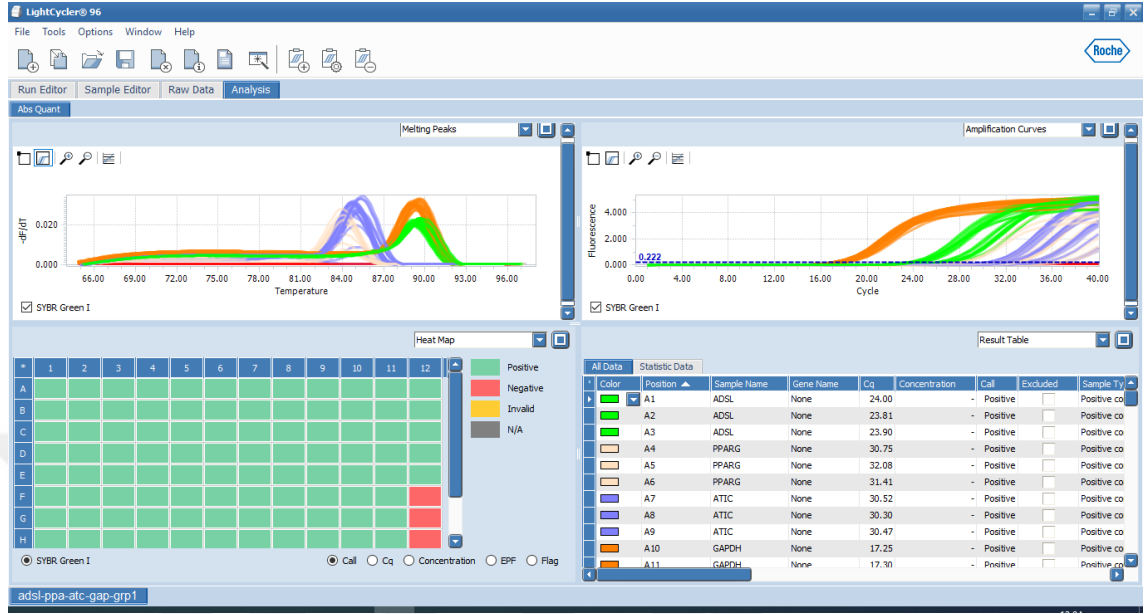
EK-34. *ENTPD8* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

EK-35. *PPAR γ* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.

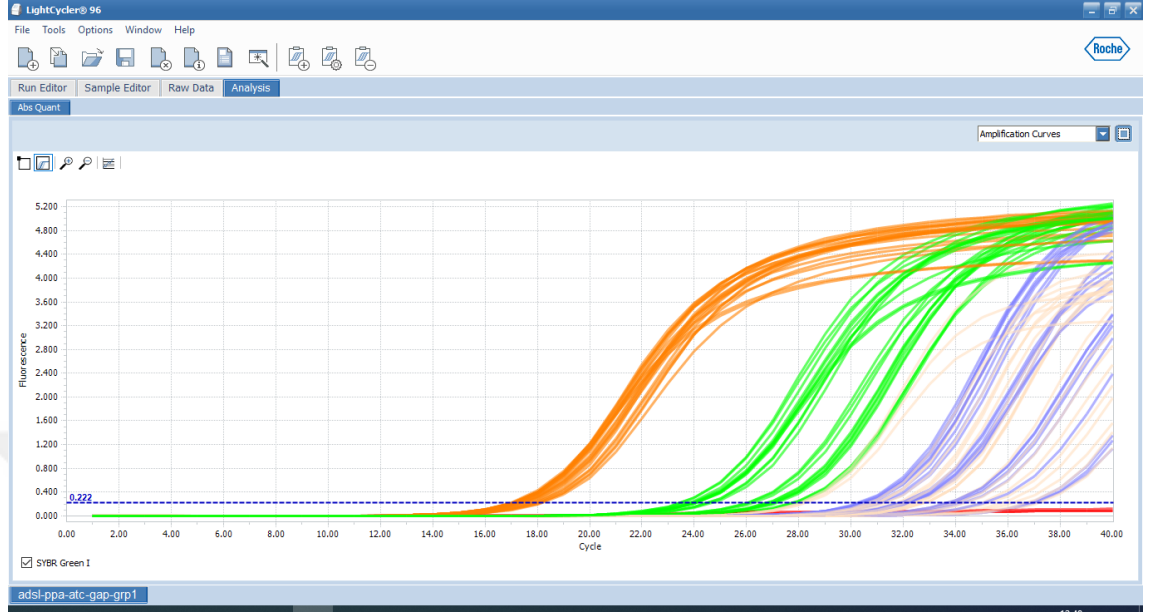
EK-36. *ATIC* primerlerinin 4 farklı dilüsyonda oluşturduğu amplifikasyon eğrisi.



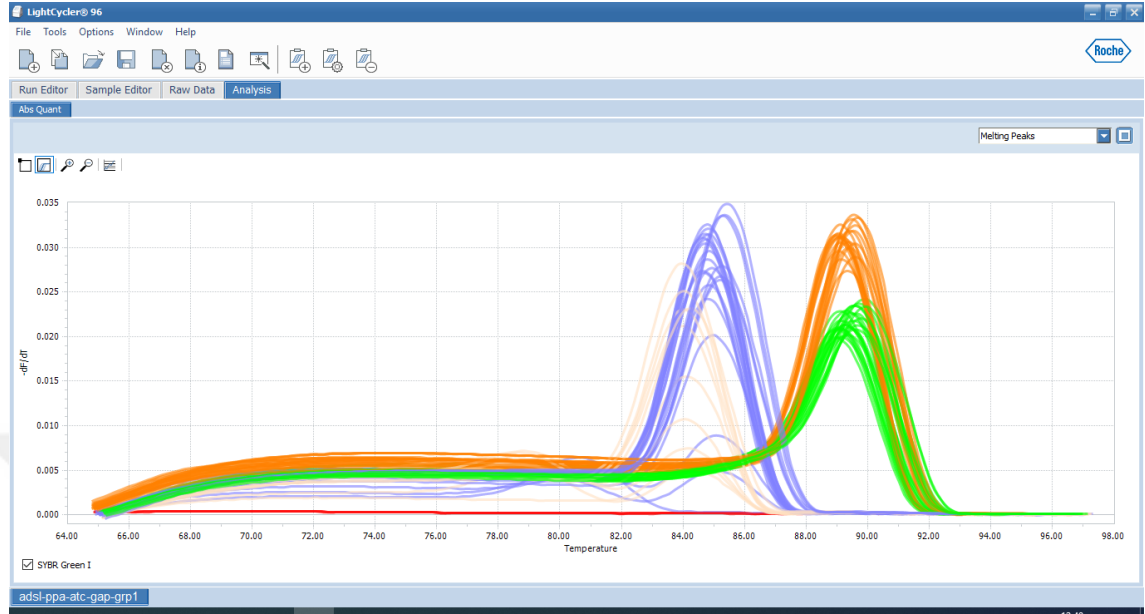
EK-37. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



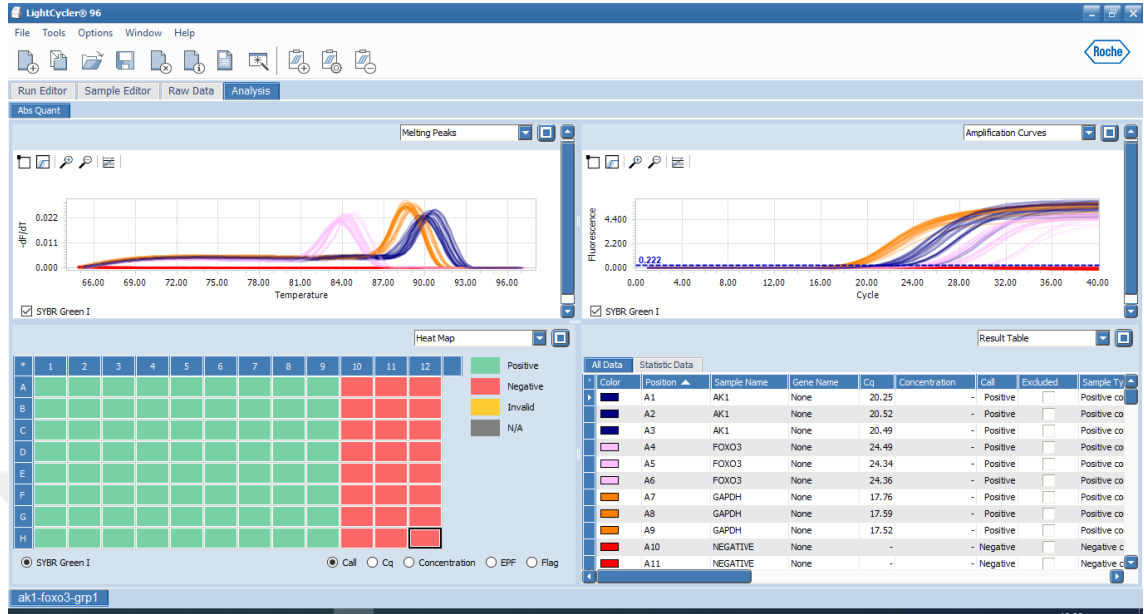
EK-38. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



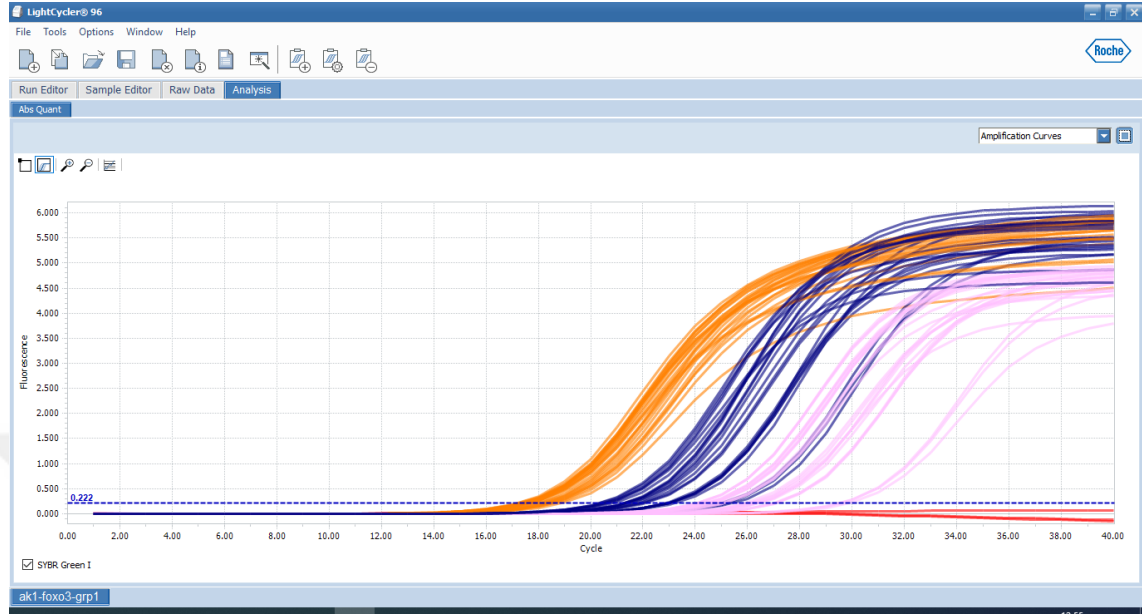
EK-39. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi.



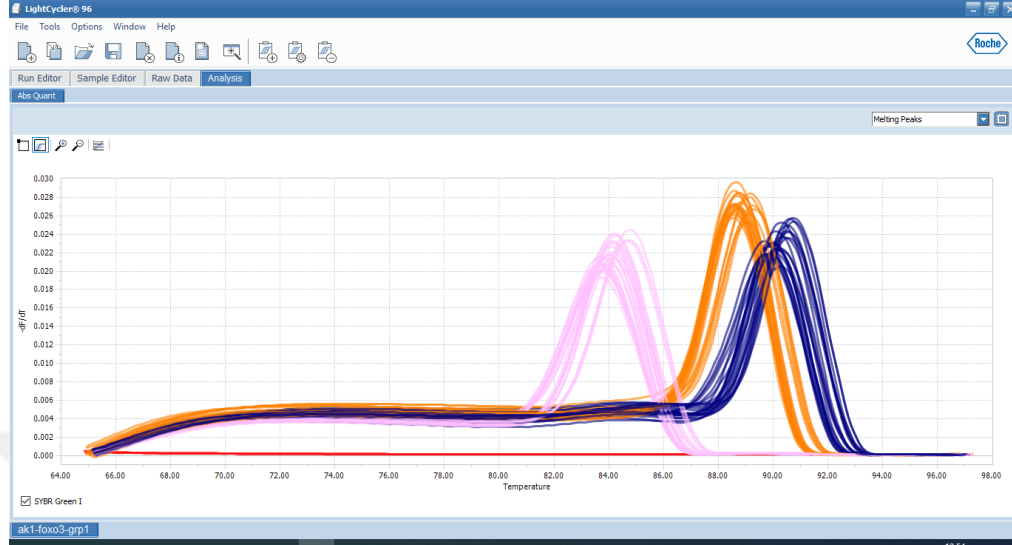
EK-40. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *AK1* ve *FOXO3* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



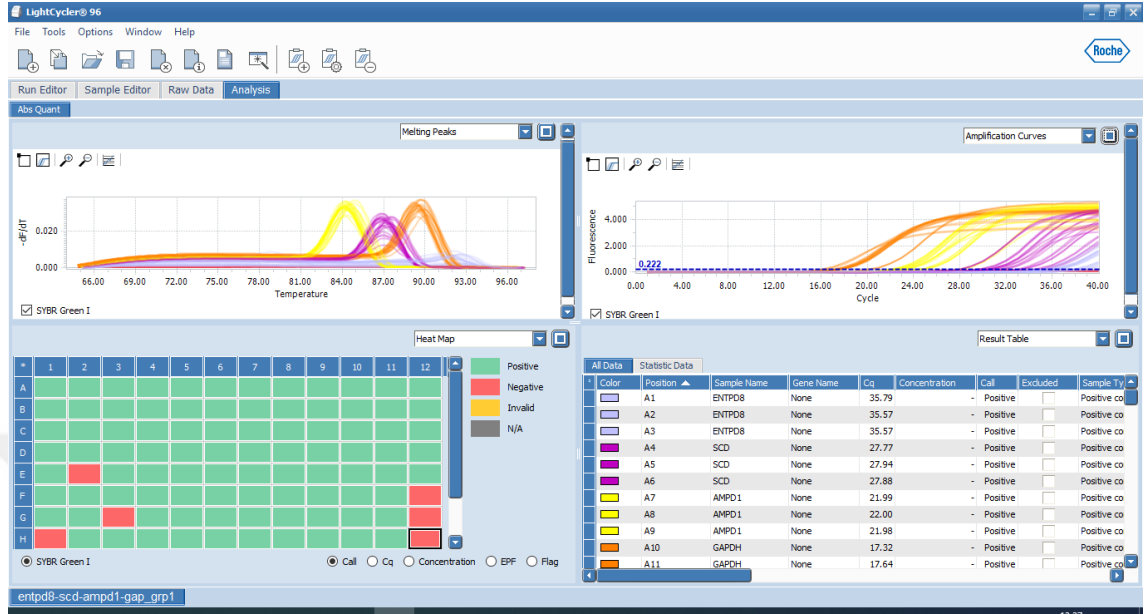
EK-41. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



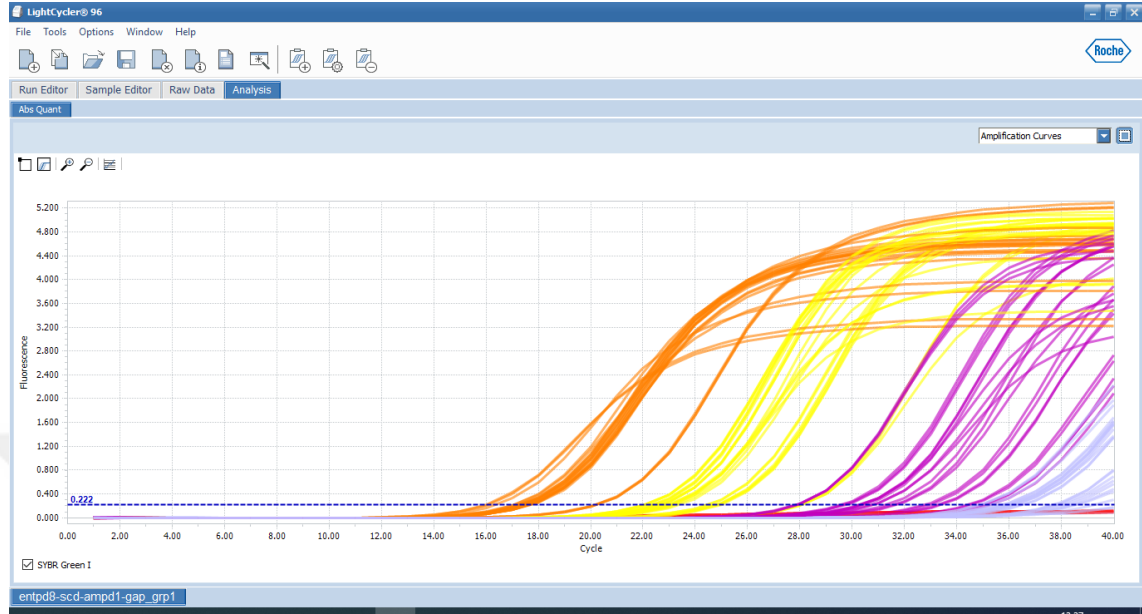
EK-42. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının ADSL, PPAR γ ve ATIC mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi.



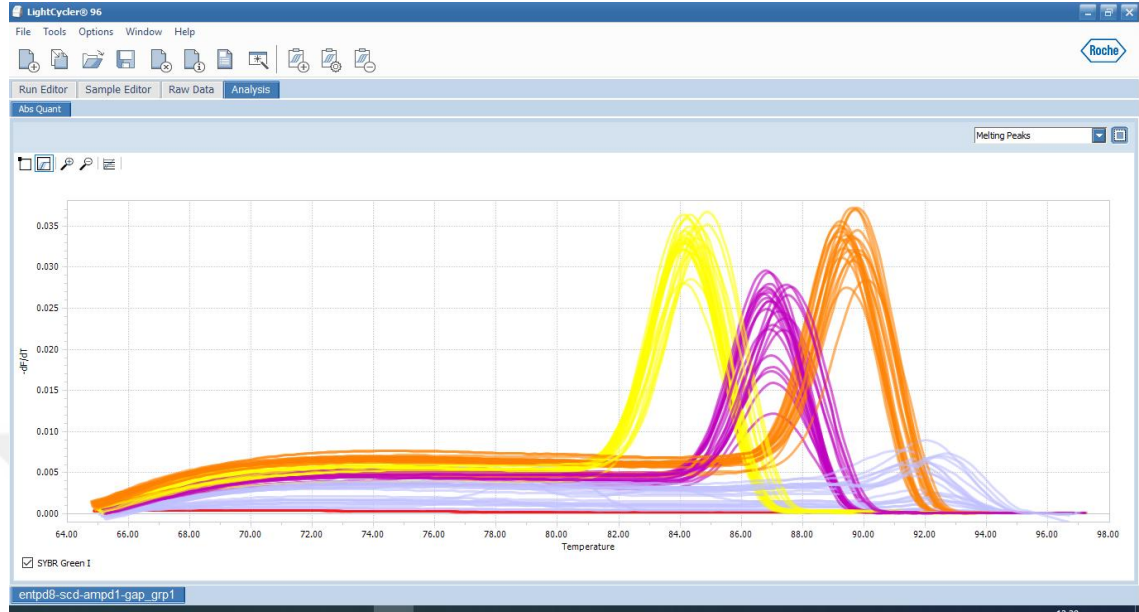
EK-43. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ENTPD8*, *SCD* ve *AMPD1* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



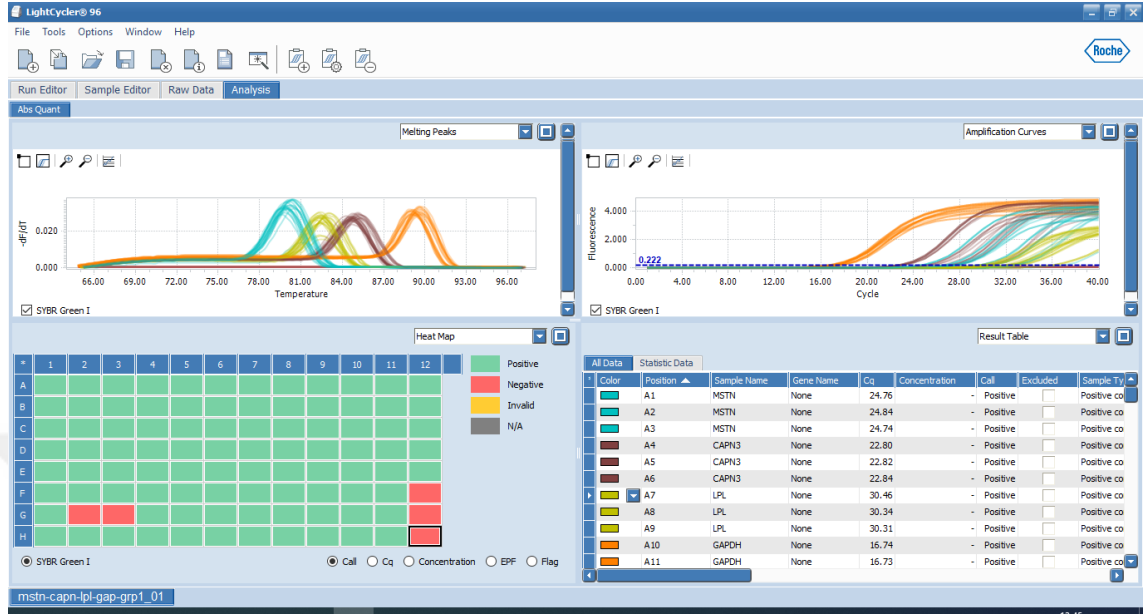
EK-44. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ENTPD8*, *SCD* ve *AMPD1* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



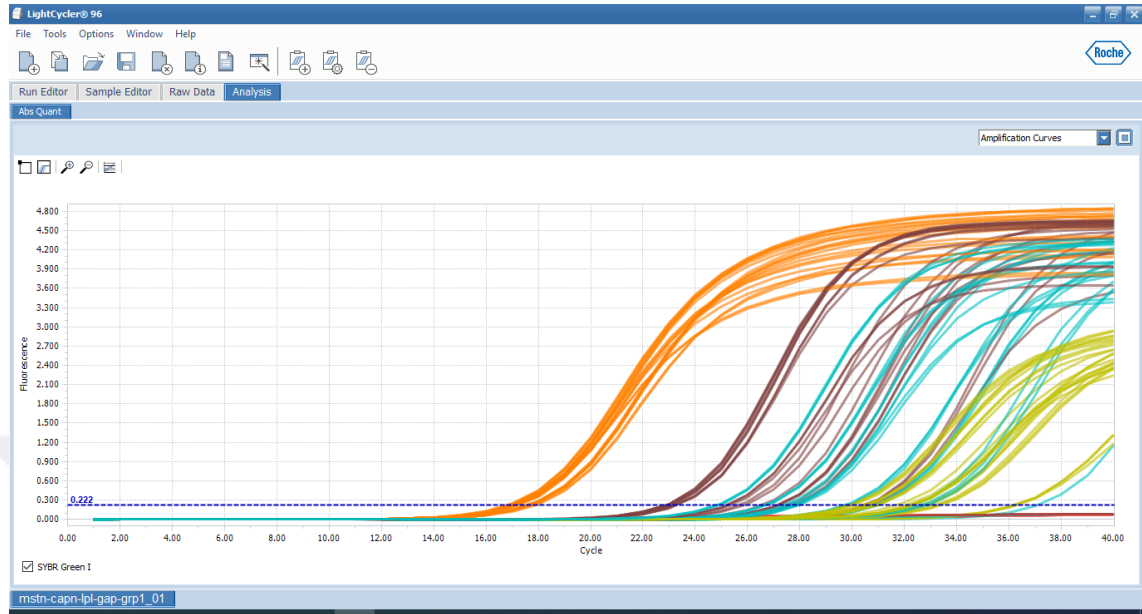
EK-45. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ENTPD8*, *SCD* ve *AMPD1* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi.



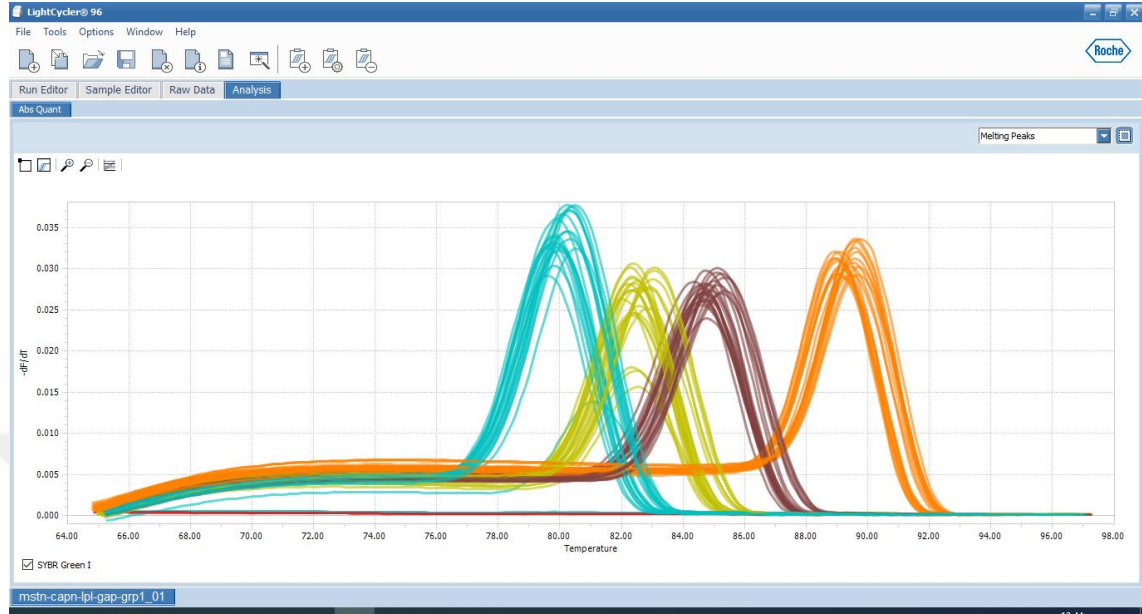
EK-46 İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *MSTN*, *CAPN3* ve *LPL* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



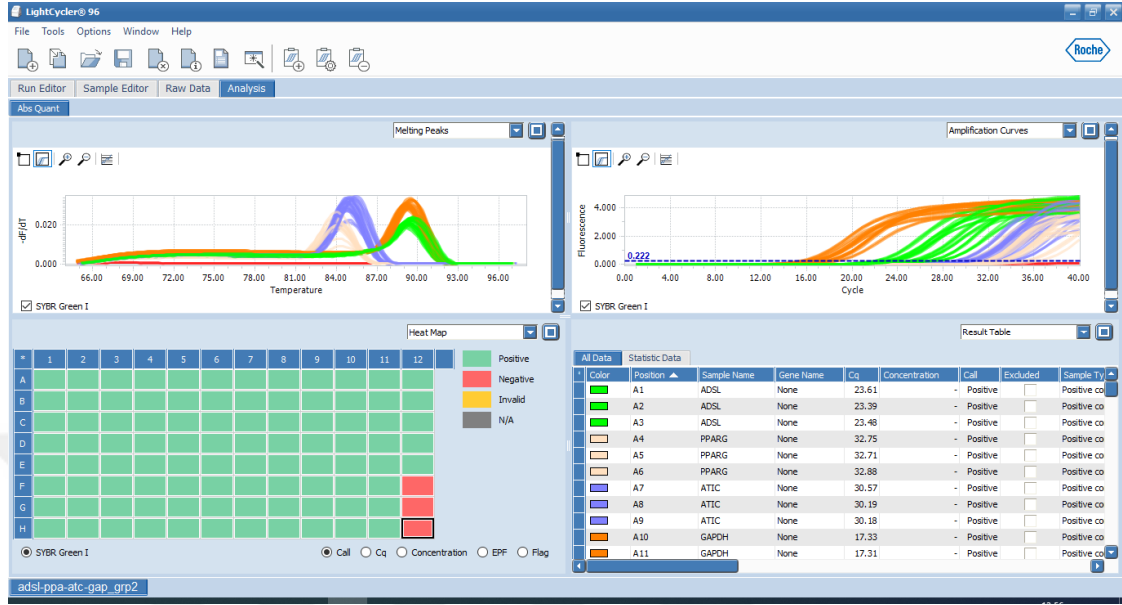
EK-47. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *MSTN*, *CAPN3* ve *LPL* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



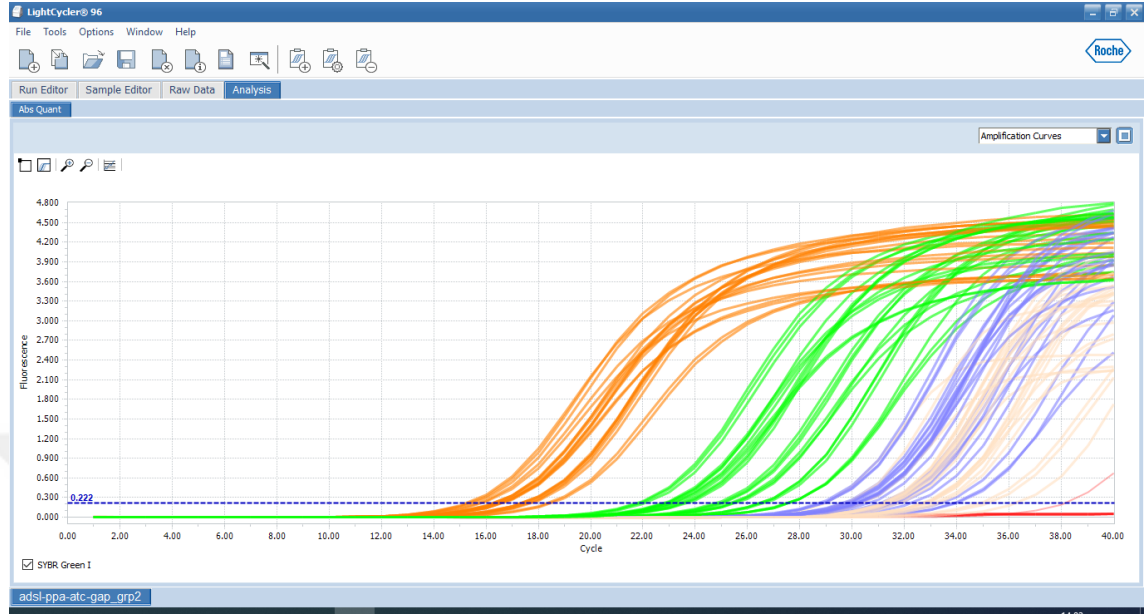
EK-48. İlk örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *MSTN*, *CAPN3* ve *LPL* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi.



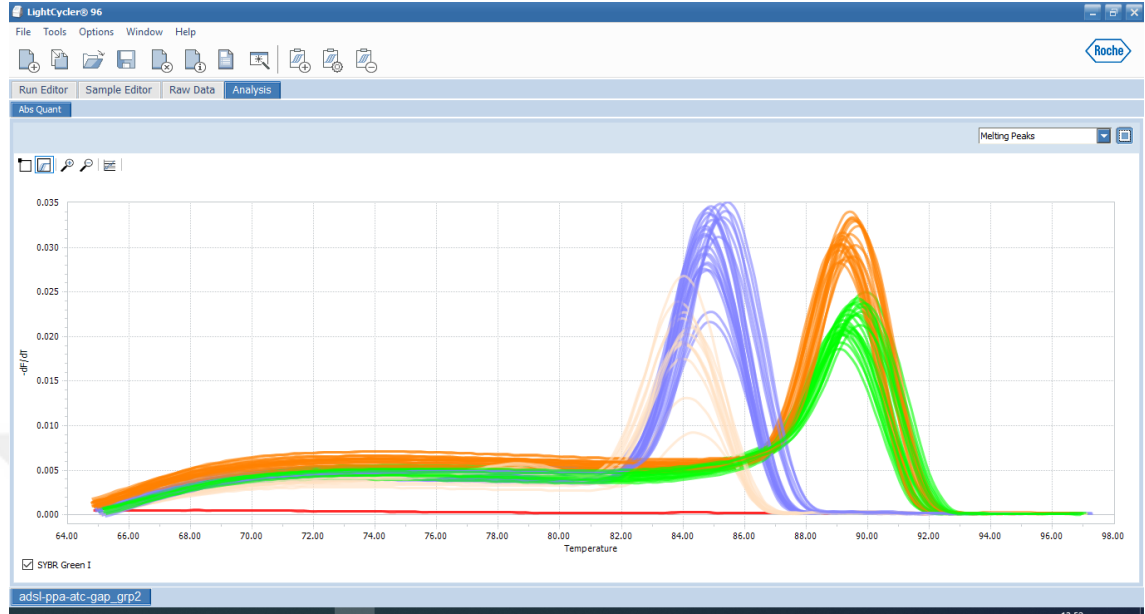
EK-49. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



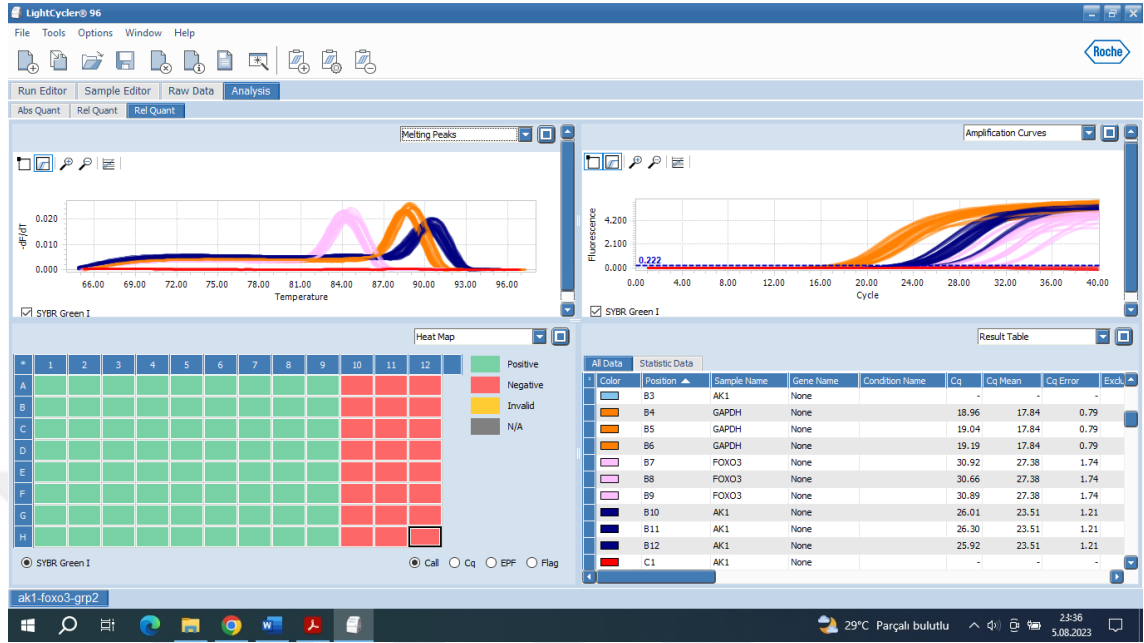
EK-50. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



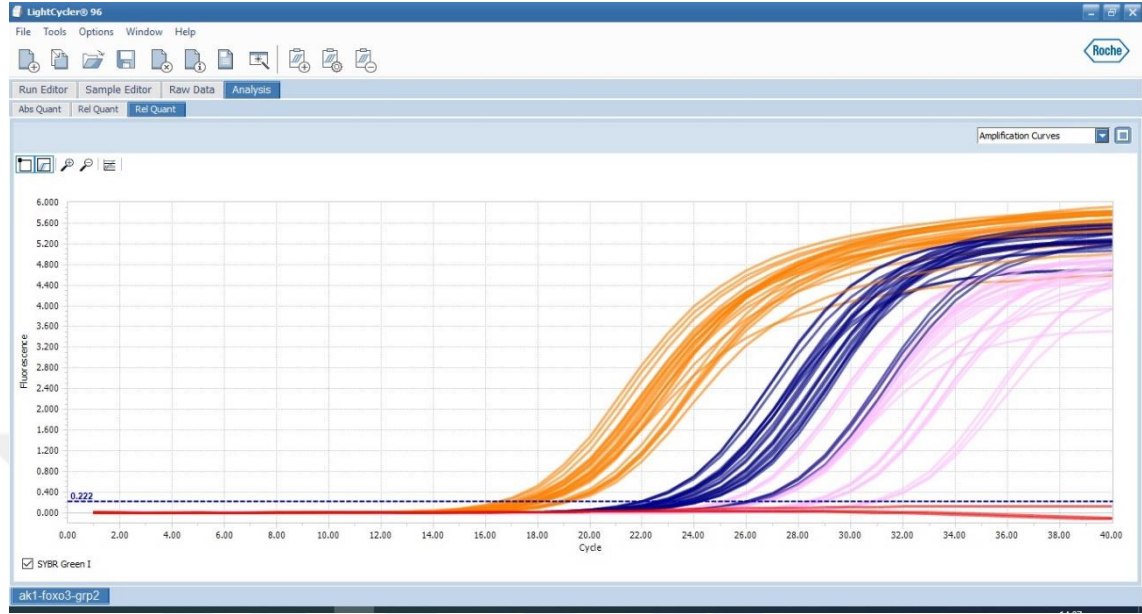
EK-51. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi.



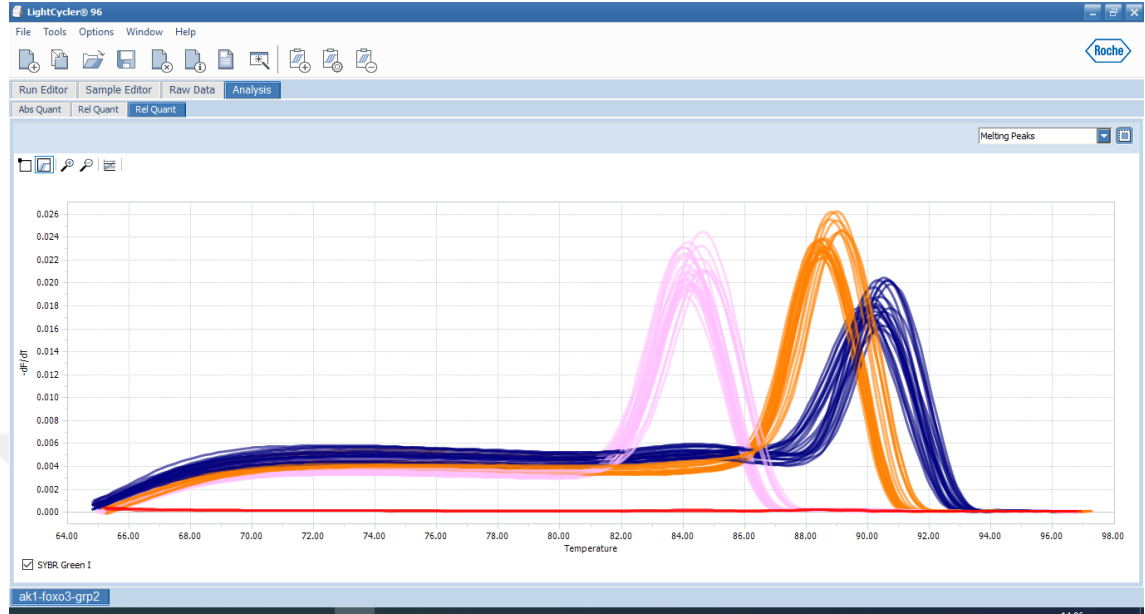
EK-52. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *AK1* ve *FOXO3* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



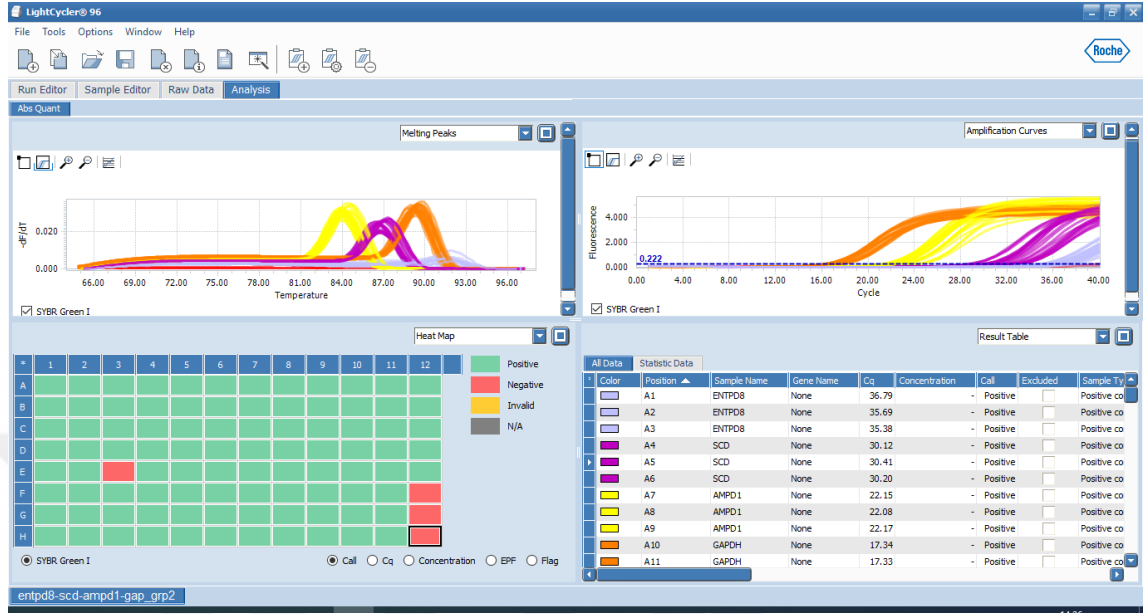
EK-53. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının AK1 ve FOXO3 mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



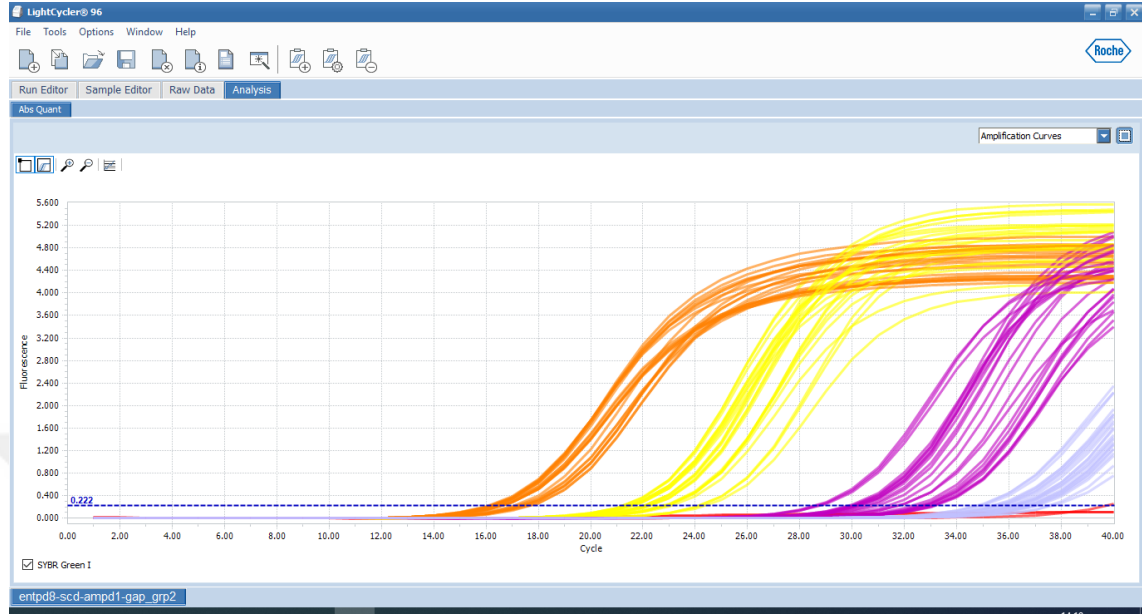
EK-54. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ADSL*, *PPAR γ* ve *ATIC* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



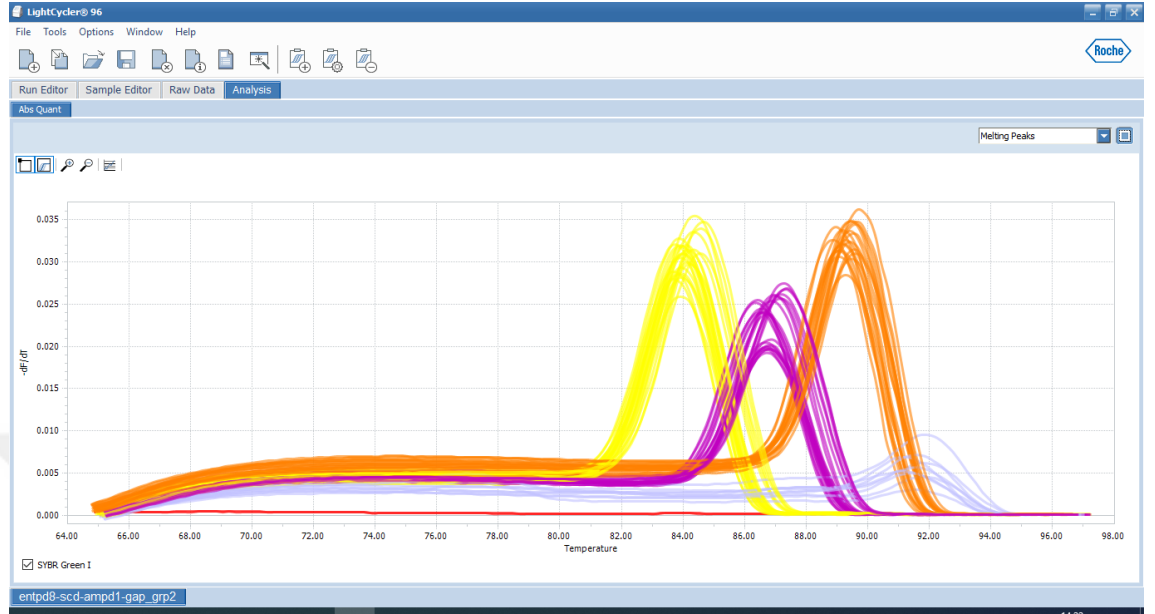
EK-55. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ENTPD8*, *SCD* ve *AMPD1* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



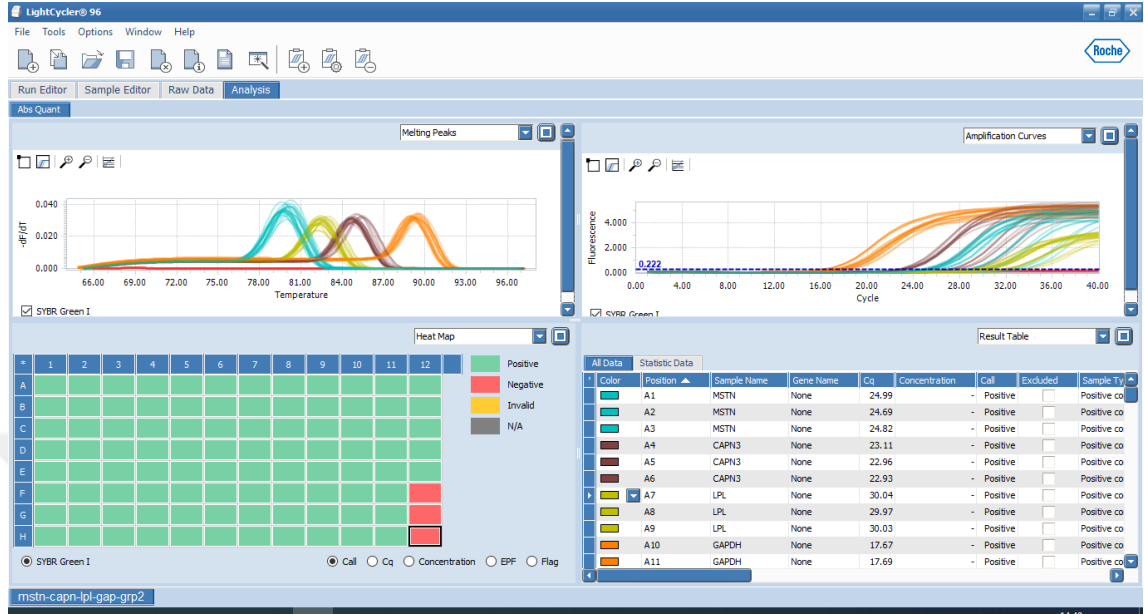
EK-56. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ENTPD8*, *SCD* ve *AMPD1* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



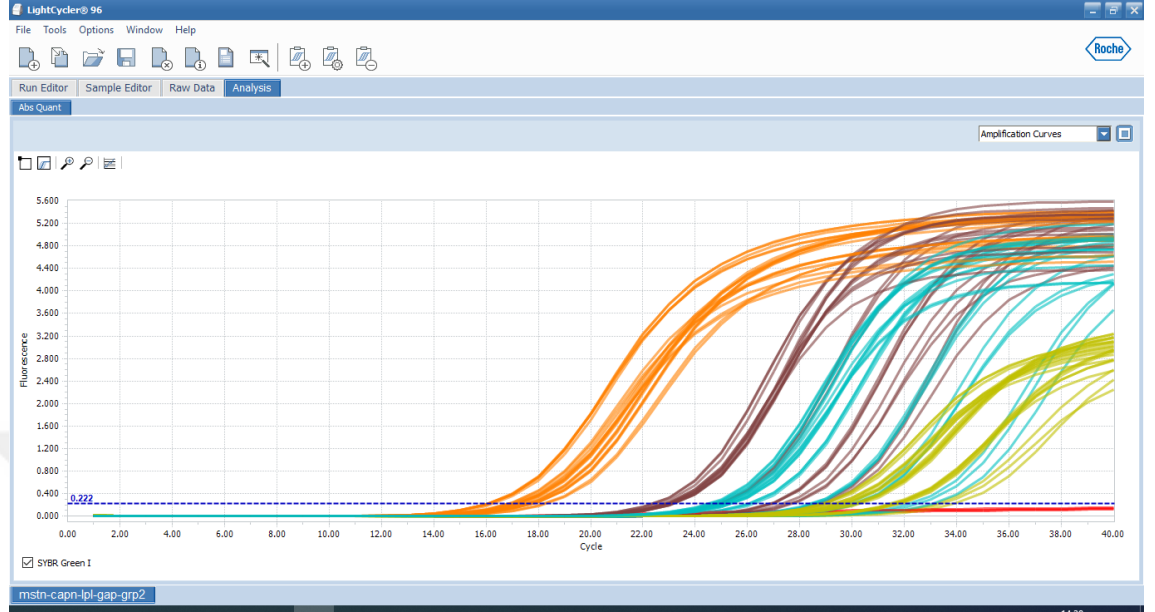
EK-57. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *ENTPD8*, *SCD* ve *AMPD1* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi.



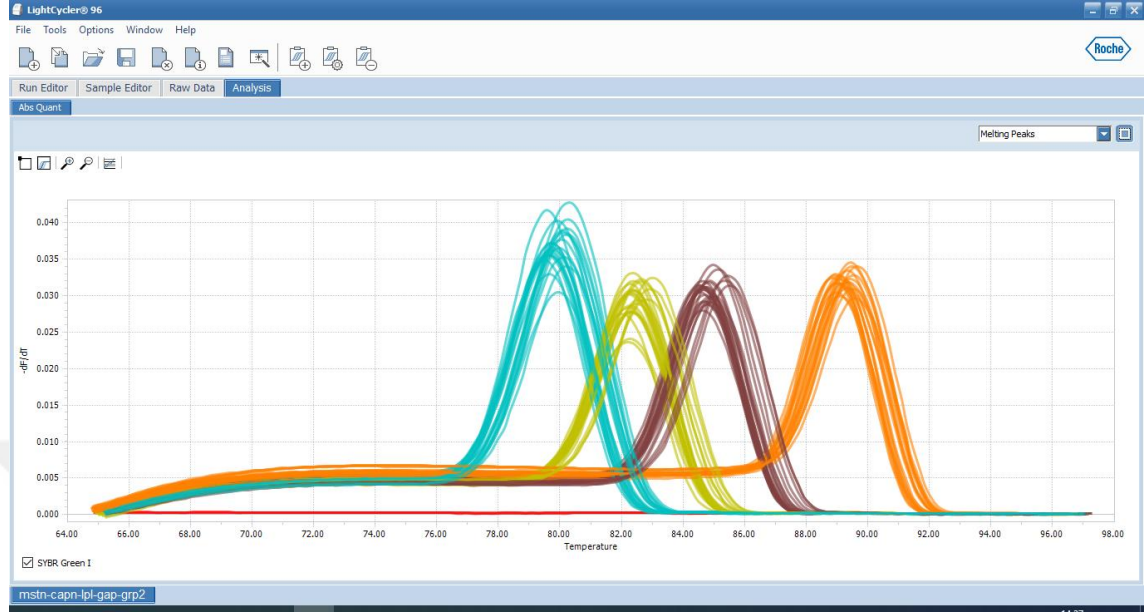
EK-58. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *MSTN*, *CAPN3* ve *LPL* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonuçlarının LightCycler® 96 yazılımında incelenmesi.



EK-59. İkinci örneklem döneminde Gerze ve hibrit ırklarının *MSTN*, *CAPN3* ve *LPL* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen amplifikasyon eğrisi.



EK-60. Gerze ve hibrit ırklarının ikinci büyüme dönemi örneklerinden *MSTN*, *CAPN3* ve *LPL* mRNA'ları için yapılan RT-qPCR analizi sonrası LightCycler® 96 yazılımından elde edilen erime eğrisi



EK-61. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin normallik testi istatistikleri

	İrklar	Shapiro-Wilk Testi		
		İstatistik	Serbestlik derecesi	P değeri
ADSL	Hibrit	,959	12	,770
	Gerze	,965	12	,858
PPARG	Hibrit	.	12	.
	Gerze	,723	12	,001
ATIC	Hibrit	.	12	.
	Gerze	,552	12	<,001
ENTPD8	Hibrit	,684	12	<,001
	Gerze	,944	12	,554
SCD	Hibrit	,801	12	,010
	Gerze	,714	12	,001
AMPD1	Hibrit	,856	12	,043
	Gerze	,895	12	,138
MSTN	Hibrit	,882	12	,092
	Gerze	,732	12	,002
CAPN3	Hibrit	,909	12	,209
	Gerze	,703	12	<,001
LPL	Hibrit	,884	12	,099
	Gerze	,874	12	,074
AK1	Hibrit	,871	12	,068
	Gerze	,878	12	,082
FOXO3	Hibrit	,917	12	,265
	Gerze	,886	12	,105

EK-62. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin T-testi istatistikleri

	Varyansların Eşitliği Levene Testi		Ortalamaların Eşitliği için t-testi							
	F	P değeri	t	Serbestlik derecesi	Önem		Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı	%95 Güven Aralığı	
					Tek-Tarafli p	İki-Tarafli p			Daha düşük	Daha yüksek
ADSL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	23,178	<,001	-8,518	22	<,001	<,001	-,00725	,00085	-,00901	-,00548
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-8,518	11,566	<,001	<,001	-,00725	,00085	-,00911	-,00538
LPL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	5,602	,027	-4,884	22	<,001	<,001	-,00005	,00001	-,00008	-,00003
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-4,884	12,967	<,001	<,001	-,00005	,00001	-,00008	-,00003
AK1 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	14,969	<,001	-4,655	22	<,001	<,001	-,06214	,013348	-,08982	-,03445
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-4,655	13,793	<,001	<,001	-,06214	,013348	-,09081	-,03347
FOXO3 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	1,690	,207	-3,847	22	<,001	<,001	-,00399	,00103	-,00614	-,00183
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-3,847	19,501	<,001	,001	-,00399	,00103	-,00616	-,00182

EK-63. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ilk örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin Mann-Whitney U testi istatistikleri

	<i>PPARγ</i>	<i>ATIC</i>	<i>ENTPD8</i>	<i>SCD</i>	<i>AMPD1</i>	<i>MSTN</i>	<i>CAPN3</i>
Mann-Whitney U	30,000	18,000	1,000	8,000	9,000	,000	,000
Wilcoxon W	108,000	96,000	79,000	86,000	87,000	78,000	78,000
Z	-3,033	-3,715	-4,176	-3,696	-3,638	-4,157	-4,158
Asimptotik Önem (2 uçlu)	,002	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001
Tam Önem [2*(1- uçlu)]	,014	,001	<,001	<,001	<,001	<,001	<,001

EK-64. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ikinci örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin normallik testi istatistikleri

	İrklar	Shapiro-Wilk Testi		
		İstatistik	Serbestlik derecesi	P değeri
ADSL	Hibrit	,935	12	,434
	Gerze	,936	12	,451
PPARG	Hibrit	,793	12	,008
	Gerze	,675	12	<,001
ATIC	Hibrit	,841	12	,028
	Gerze	,890	12	,119
ENTPD8	Hibrit	,959	12	,771
	Gerze	,951	12	,654
SCD	Hibrit	,977	12	,969
	Gerze	,897	12	,145
AMPD1	Hibrit	,864	12	,055
	Gerze	,905	12	,186
MSTN	Hibrit	,832	12	,022
	Gerze	,800	12	,009
CAPN3	Hibrit	,838	12	,026
	Gerze	,901	12	,162
LPL	Hibrit	,921	12	,292
	Gerze	,910	12	,215
AK1	Hibrit	,890	12	,118
	Gerze	,938	12	,476
FOXO3	Hibrit	,848	12	,035
	Gerze	,898	12	,152

EK-65. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ikinci örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin T-testi istatistikleri

	Varyansların Eşitliği Levene Testi		Ortalamaların Eşitliği için t-testi							
	F	P değeri	t	Serbestlik derecesi	Önem		Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı	%95 Güven Aralığı	
					Tek-Taraf lı p	İki-Tara flı p			Daha düşük	Daha yüksek
ADSL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	8,442	,008	-16,87	22	<,001	<,001	-,00921	0,00055	-0,01035	-0,00809
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-16,87	14,282	<,001	<,001	-,00921	0,00055	-0,01039	-0,00805
ENTPD8 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	10,672	,004	-3,25	22	,002	,004	-,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-3,25	14,769	,003	,005	-,00000	0,00000	0,00000	0,00000
SCD Varyansların eşit olduğu varsayıldı	21,463	<,001	-5,208	22	<,001	<,001	-,00009	0,00002	-0,00014	-0,00006
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-5,20	11,282	<,001	<,001	-,00009	0,00002	-0,00014	-0,00006

Devamı Arkada

EK-65'in devamı

AMPD1 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	2,313	,143	-2,82	22	,005	,010	-,00952	0,0033 7	-0,01652	-0,00254
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-2,82	20,812	,005	,010	-,00952	0,0033 7	-0,01654	-0,00251
LPL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	1,334	,260	-17,29	22	<,001	<,001	-,00013	0,0000 1	-0,00015	-0,00012
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-17,29	17,611	<,001	<,001	-,00013	0,0000 1	-0,00015	-0,00012
AK1 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	,420	,524	-9,54	22	<,001	<,001	-,01712	0,0018 0	-0,02085	-0,01341
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-9,54	20,242	<,001	<,001	-,01712	0,0018 0	-0,02087	-0,01339

EK-66. Gerze ve hibrit tavuk ırklarının ikinci örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin Mann-Whitney U testi istatistikleri

	<i>PPARγ</i>	<i>ATIC</i>	<i>MSTN</i>	<i>CAPN3</i>	<i>FOXO3</i>
Mann-Whitney U	55,000	1,000	,000	,000	,000
Wilcoxon W	133,000	79,000	78,000	78,000	78,000
Z	-,982	-4,100	-4,157	-4,157	-4,157
Asimptotik Önem (2 uçlu)	,326	<,001	<,001	<,001	<,001
Tam Önem [2*(1-uçlu)]	,347	<,001	<,001	<,001	<,001

EK-67. Gerze tavuk ırkının iki örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin normallik testi istatistikleri

	İrklar	Shapiro-Wilk Testi		
		İstatistik	Serbestlik derecesi	P değeri
ADSL	Gerze-1	,966	12	,868
	Gerze-2	,930	12	,382
PPARG	Gerze-1	,690	12	<,001
	Gerze-2	,675	12	<,001
ATIC	Gerze-1	,921	12	,292
	Gerze-2	,873	12	,071
ENTPD8	Gerze-1	,944	12	,548
	Gerze-2	,915	12	,250
SCD	Gerze-1	,714	12	,001
	Gerze-2	,870	12	,066
AMPD1	Gerze-1	,895	12	,138
	Gerze-2	,887	12	,109
MSTN	Gerze-1	,732	12	,002
	Gerze-2	,800	12	,009
CAPN3	Gerze-1	,703	12	<,001
	Gerze-2	,901	12	,162
LPL	Gerze-1	,874	12	,074
	Gerze-2	,910	12	,215
AK1	Gerze-1	,878	12	,082
	Gerze-2	,938	12	,476
FOXO3	Gerze-1	,867	12	,059
	Gerze-2	,898	12	,152

EK-68. Gerze tavuk ırkının iki örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin T-testi istatistikleri

	Varyansların Eşitliği Levene Testi		Ortalamaların Eşitliği için t-testi							
	F	P değeri	t	Serbestlik derecesi	Önem		Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı	%95 Güven Aralığı	
					Tek-Tarafli p	İki-Tarafli p			Daha düşük	Daha yüksek
ADSL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	3,501	,075	- 2,351	22	,014	,028	-0,0023	0,0010	- 0,0044	- 0,0003
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			- 2,351	18,43	,015	,030	-0,0023	0,0010	- 0,0044	- 0,0003
ATIC Varyansların eşit olduğu varsayıldı	5,330	,031	- 1,947	22	,032	,064	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			- 1,947	17,72	,034	,068	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ENTPD8 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	,143	,709	1,062	22	,150	,300	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			1,062	20,77	,150	,301	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AMPD1 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	2,307	,143	-,525	22	,302	,605	-0,0023	0,0043	- 0,0113	0,0067
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-,525	15,93	,303	,607	-0,0023	0,0043	- 0,0115	0,0069

Devamı Arkada

EK-68'in devamı

LPL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	1,374	,254	- 7,753	22	<,001	<,001	-0,0001	0,0000	- 0,0001	- 0,0001
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			- 7,753	18,12	<,001	<,001	-0,0001	0,0000	- 0,0001	- 0,0001
AK1 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	32,502	<,001	5,088	22	<,001	<,001	0,0643	0,0126	0,0381	0,0906
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			5,088	11,29	<,001	<,001	0,0643	0,0126	0,0366	0,0921
FOXO3 Varyansların eşit olduğu varsayıldı	10,148	,004	4,354	22	<,001	<,001	0,0039	0,0009	0,0020	0,0058
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			4,354	13,38	<,001	<,001	0,0039	0,0009	0,0020	0,0058

EK-69. Gerze tavuk ırkının iki örneklem örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin Mann-Whitney U testi istatistikleri

	<i>PPARγ</i>	<i>SCD</i>	<i>MSTN</i>	<i>CAPN3</i>
Mann-Whitney U	31,000	57,000	22,500	32,000
Wilcoxon W	109,000	135,000	100,500	110,000
Z	-2,368	-,867	-2,859	-2,310
Asimptotik Önem (2 uçlu)	,018	,386	,004	,021
Tam Önem [2*(1-uçlu)]	,017 ^b	,410 ^b	,003 ^b	,020 ^b

EK-70. Hibrit tavuk ırkının iki örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin normallik testi istatistikleri

	İrklar	Shapiro-Wilk Testi		
		İstatistik	Serbestlik derecesi	P değeri
ADSL	Hibrit-1	,966	12	,867
	Hibrit-2	,956	12	,730
PPARG	Hibrit-1	,825	12	,018
	Hibrit-2	,793	12	,008
ATIC	Hibrit-1	,917	12	,259
	Hibrit-2	,841	12	,028
ENTPD8	Hibrit-1	,716	12	,001
	Hibrit-2	,960	12	,777
SCD	Hibrit-1	,801	12	,010
	Hibrit-2	,977	12	,969
AMPD1	Hibrit-1	,856	12	,043
	Hibrit-2	,864	12	,055
MSTN	Hibrit-1	,882	12	,092
	Hibrit-2	,832	12	,022
CAPN3	Hibrit-1	,909	12	,209
	Hibrit-2	,841	12	,028
LPL	Hibrit-1	,884	12	,099
	Hibrit-2	,921	12	,292
AK1	Hibrit-1	,871	12	,068
	Hibrit-2	,890	12	,118
FOXO3	Hibrit-1	,917	12	,265
	Hibrit-2	,848	12	,035

EK-71. Hibrit tavuk ırkının iki örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin T-testi istatistikleri

	Varyansların Eşitliği		Ortalamaların Eşitliği için t-testi							
	Levene Testi		t	Serbestlik derecesi	Önem		Ortalama Farkı	Std. Hata Farkı	%95 Güven Aralığı	
	F	P değeri			Tek-Tarafli p	İki-Tarafli p			Daha düşük	Daha yüksek
ADSL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	3,030	,096	-,805	22	,215	,429	-0,0002	0,0003	-0,0008	0,0004
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-,805	16,93	,216	,432	-0,0002	0,0003	-0,0008	0,0004
LPL Varyansların eşit olduğu varsayıldı	1,287	,269	-4,459	22	<,001	<,001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			-4,459	21,49	<,001	<,001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
AKI Varyansların eşit olduğu varsayıldı	20,015	<,001	4,169	22	<,001	<,001	0,0193	0,0046	0,0097	0,0290
Varyansların eşit olmadığı varsayıldı			4,169	12,22	<,001	,001	0,0193	0,0046	0,0092	0,0294

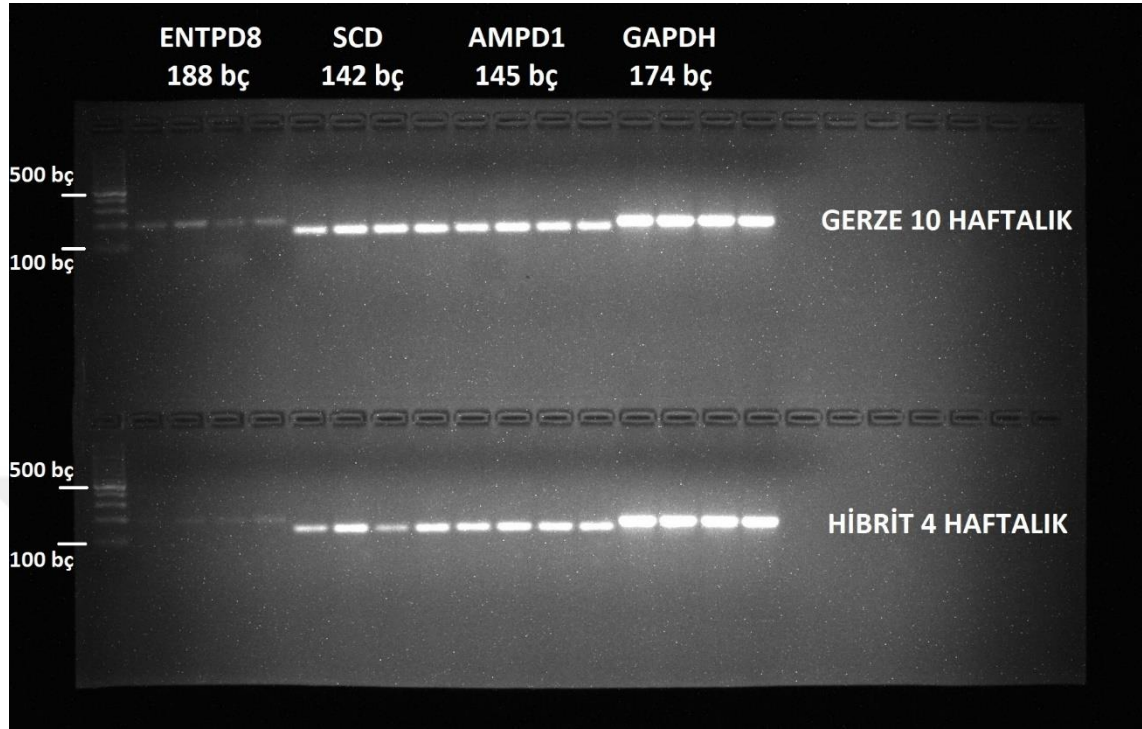
EK-72. Hibrit tavuk ırkının iki örneklem dönemine ait gen ifadesi seviyelerinin Mann-Whitney U testi istatistikleri

	<i>PPARγ</i>	<i>ATIC</i>	<i>ENTPD</i> <i>8</i>	<i>SCD</i>	<i>AMPD</i> <i>1</i>	<i>MSTN</i>	<i>CAPN3</i>	<i>FOXO</i> <i>3</i>
Mann-Whitney U	31,000	15,000	27,500	52,000	18,000	30,500	66,500	26,000
Wilcoxon W	109,000	93,000	105,500	130,000	96,000	108,500	144,500	104,000
Z	-2,367	-3,292	-2,570	-1,155	-3,118	-2,397	-,318	-2,656
Asimptotik Önem (2 uçlu)	,018	<,001	,010	,248	,002	,017	,751	,008
Tam Önem [2*(1- uçlu)]	,017	<,001	,008	,266	,001	,014	,755	,007

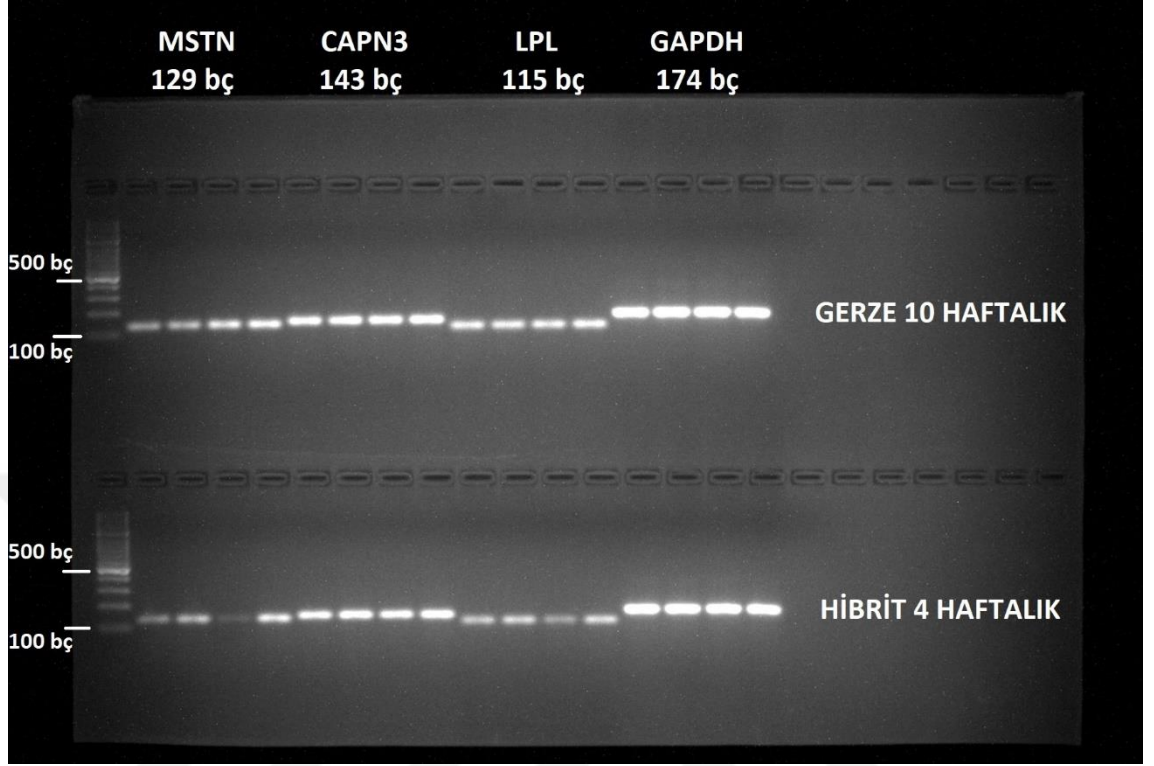
EK-73. İlk örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



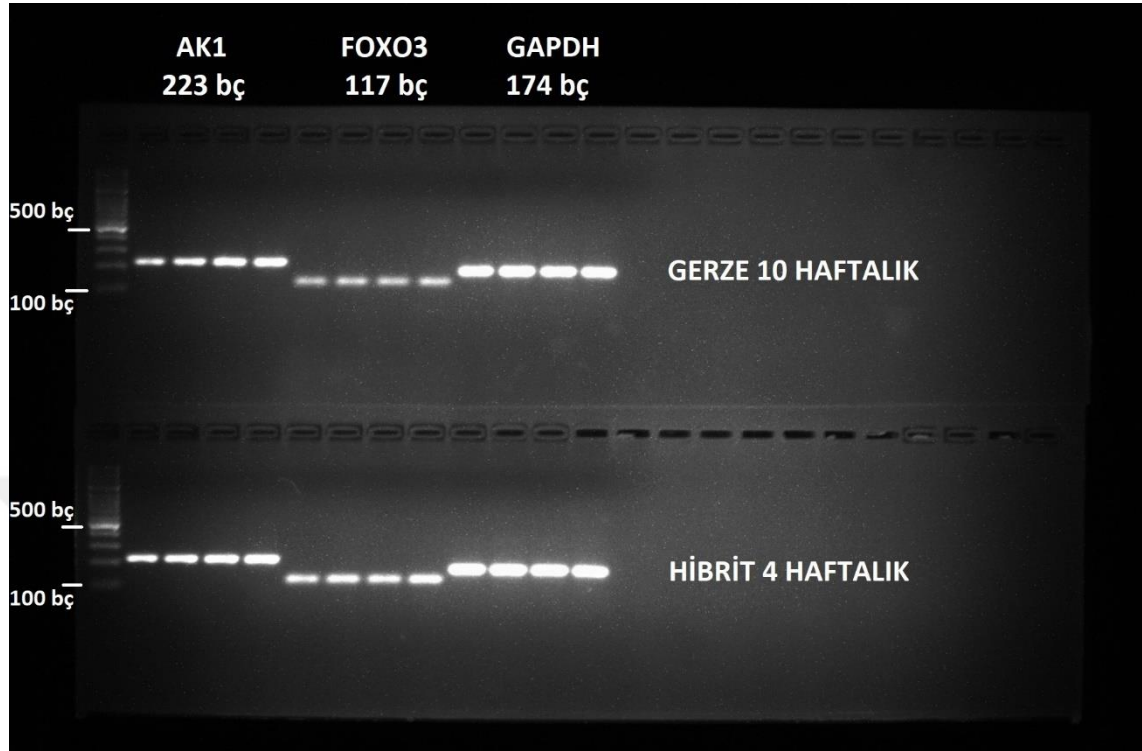
EK-74. İlk örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



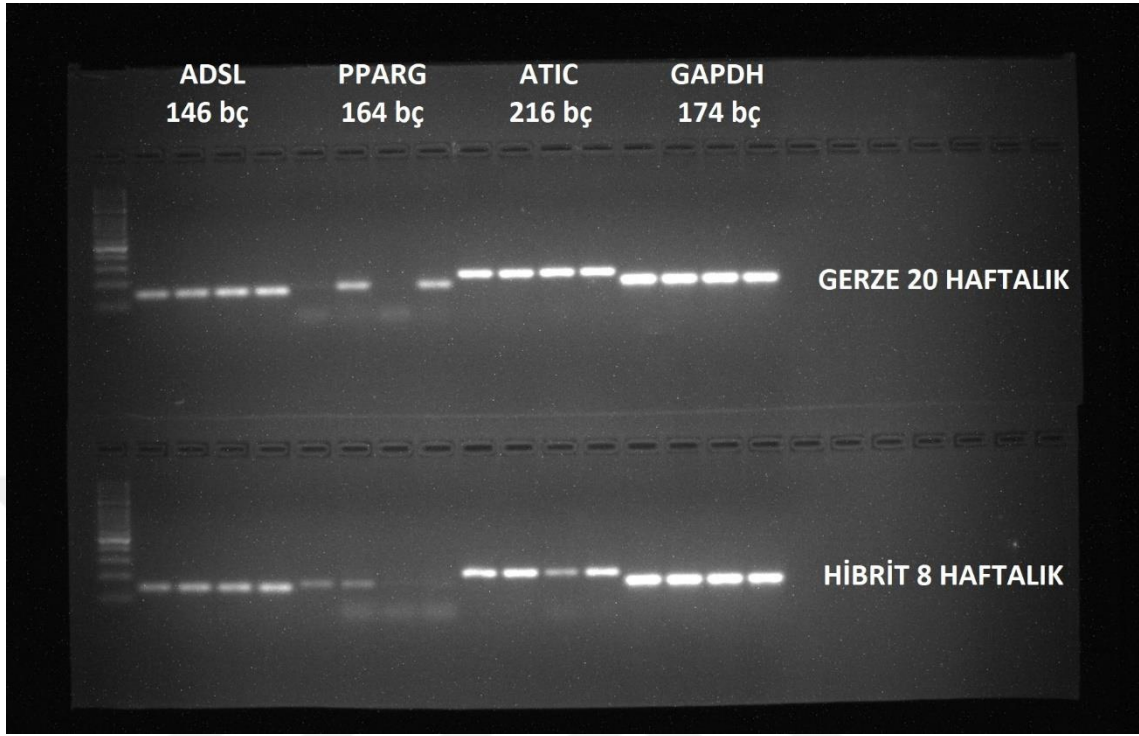
EK-75. İlk örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



EK-76. İlk örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



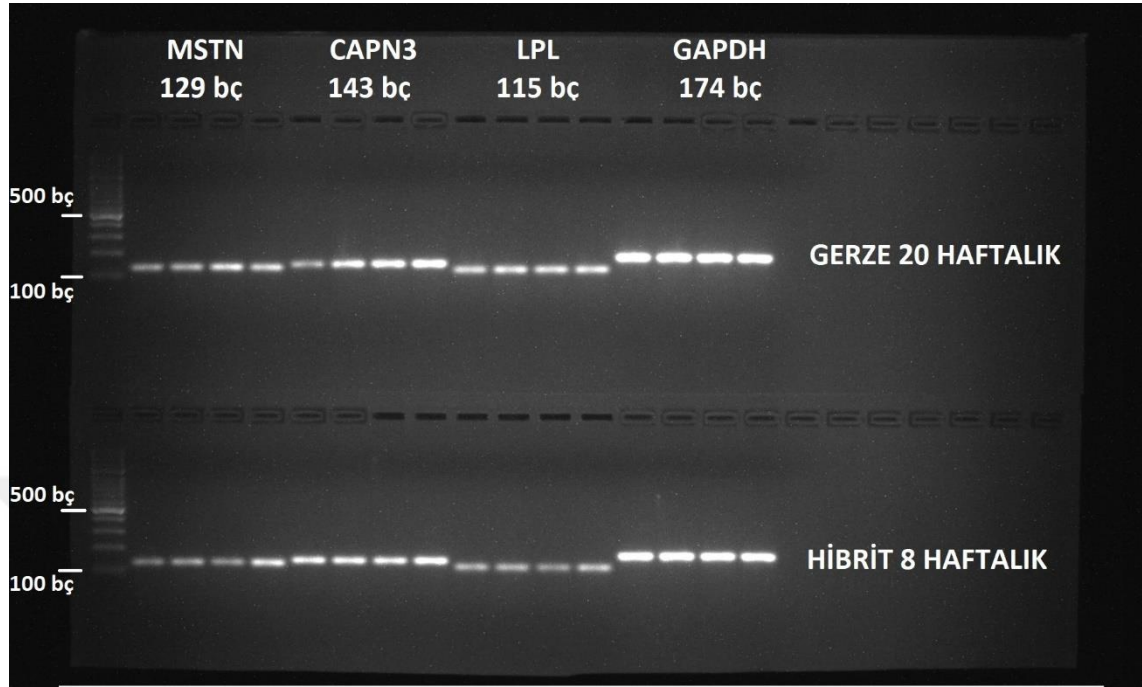
EK-77. İkinci örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



EK-78. İkinci örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



EK-79. İkinci örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



EK-80. İkinci örneklem dönemi için Gerze ve hibrit tavuk ırklarına ait cDNA örneklerinin 12 çift primer ile RT-qPCR analizi sonrasında alınan jel görüntüsü



ÖZGEÇMİŞ

Emine TOPARSLAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2018-2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı, Biyoteknoloji Programı Antalya
Yüksek Lisans 2013-2015	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı Samsun
Lisans 2009-2013	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Samsun

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- **Toparslan E.** & Mercan L. (2019). Genotyping of prolactin, kappa casein, and pituitary transcription factor 1 genes of the Anatolian water buffalo population in the Kızılırmak Delta, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 43(6), 784-790.
- 2- **Toparslan E.**, Karabag K. & Bilge U. (2020). A workflow with R: Phylogenetic analyses and visualizations using mitochondrial cytochrome b gene sequences, PLoS ONE, 15(12), e0243927. Doi: 10.1371/journal.pone.0243927
- 3- Gültekin, A.K., Özdemir, D., Bener, L. **Toparslan, E.**, et al. (2023). Identification of local camel populations in Türkiye using morphological, genetic, and breeding info. Trop Anim Health Prod 55, 321.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- **Toparslan, E.**, Mercan, L., Karabağ, K. (2018). Çiftlik Hayvanlarında Bazı Ekonomik Verim Karakterleri Üzerine Epigenetik Etkiler. Akademia Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, ICAE 2018 Özel Sayı, 135-145. ISSN : 2587-1897.
- 2- **Toparslan, E.** ve Mercan, L. (2018). Türkiye Yerli Manda Popülasyonlarında Yapılan Moleküler Genetik Çalışmalar. Akademia Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, ICAE 2018 Özel Sayı, 146-158. ISSN : 2587-1897.
- 3- **Toparslan, E.**, and Özdemir, D. (2022). Molecular Mechanisms Regulating Skeletal Muscle Development in Chickens. VI. International Congress on Domestic Animal Breeding, Genetics and Husbandry - 2022 (ICABGEH-2022). October 03-05, 2022, Samsun, Turkey.
- 4- **Toparslan, E.**, and Özdemir, D. (2022). Molecular Factors Affecting Chicken Meat Quality and Flavor. IV. Balkan Agricultural Congress. 31 August-02 September 2022, Edirne, Turkey.