

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KIZILIRMAK DELTASI'NDA YETİŞTİRİLEN ANADOLU MANDALARININ  
*PRL*, *CSN3* VE *PIT-1* GENLERİ BAKIMINDAN GENOTİPLERİNİN PCR-RFLP  
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Emine TOPARSLAN

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

TEMMUZ 2015  
SAMSUN





T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIZILIRMAK DELTASI'NDA YETİŞTİRİLEN ANADOLU MANDALARININ  
PRL, CSN3 VE PIT-1 GENLERİ BAKIMINDAN GENOTİPLERİNİN PCR-RFLP  
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Emine TOPARSLAN  
(13210270)**

**Tezin Savuma Tarihi : 30/07/2015**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Levent MERCAN**



**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında**  
**Emine TOPARSLAN Tarafından Hazırlanan**

**KIZILIRMAK DELTASI'NDA YETİŞTİRİLEN ANADOLU  
MANDALARININ *PRL*, *CSN3* VE *PIT-1* GENLERİ BAKIMINDAN  
GENOTİPLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 30/07/2015 tarihinde yapılan sınav ile  
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Başkan : Prof. Dr. Mehmet KURAN**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ahmet OKUMUŞ**

**Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDEM**

**Yrd. Doç. Dr. Levent MERCAN**

**Yrd. Doç. Dr. Uğur ŞEN**

**30/07/2015**

**Prof. Dr. Hüseyin DEMİR**

**Enstitü Müdürü**



*Aileme ve sevdiklerime,*



## ÖNSÖZ

Üniversite hayatımın başladığı ilk yıldan yüksek lisans çalışmasının bitimine kadar geçen sürede benden bilgi, tecrübe ve desteğini esirgemeyen ve bu zaman içerisinde gösterdiği anlayıştan dolayı minnettar olduğum danışmanım, hocam, Yrd. Doç. Dr. Levent MERCAN'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte bana yol gösteren ve yardımcı olan Prof. Dr. Ahmet OKUMUŞ'a, Prof. Dr. Mehmet KURAN'a, Prof. Dr. M. Akif ÇAM'a, Doç. Dr. Deniz Ekinci'ye, Doç. Dr. Ünal KILIÇ'a, Doç. Dr. E. Selim KÖKSAL'a, Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS'a, Yrd. Doç. Dr. Uğur ŞEN'e, Araş. Gör. Fatih BİLGİ'ye, Araş. Gör. A. Can OLCAY'a, Araş. Gör. Zafer SEÇGİN'e ve desteğini benden esirgemeyen Dr. Sevcan MERCAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans yolunda her zaman yanımda olan ve bana güç veren Yük. Lis. Öğr. Büşra ABANOZ, Yük. Lis. Öğr. Ömer TAŞ, Yük. Lis. Öğr. Gürkan BİLİR, Yük. Lis. Öğr. Çiğdem OTUR başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak her zaman yanımda olan sevgili annem ve babam; Kevser-Öznur TOPARSLAN'a, kardeşlerim; Elif TOPARSLAN ve Fatma TOPARSLAN'a, üniversite hayatımın ilk gününden beri yürüdüğüm bu yolda beni yalnız bırakmayan Hilal BEDİR ve Mehmet Emin GENÇKURT'a minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Temmuz 2015

Emine TOPARSLAN

Ziraat Mühendisi



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR .....	xv
<b>KIZILIRMAK DELTASI'NDA YETİŞTİRİLEN ANADOLU MANDALARININ <i>PRL</i>, <i>CSN3</i> VE <i>PIT-1</i> GENLERİ BAKIMINDAN GENOTİPLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>xvii</b>
<b>GENOTYPING OF <i>PRL</i>, <i>CSN3</i> AND <i>PIT-1</i> GENES İN ANATOLIAN WATER BUFFALOS REARED IN KIZILIRMAK DELTA BY PCR-RFLP.....</b>	<b>xix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xix</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1 Mandaların Sınıflandırılması .....	3
2.2 Dünyada Manda Yetiştiriciliğinin Genel Yapısı .....	5
2.3 Türkiye’de Manda Yetiştiriciliğinin Genel Yapısı.....	6
2.4 Manda Sütünün Önemi.....	7
2.5 Süt Verimi Üzerine Etkili Olan Gen Bölgeleri .....	9
2.5.1 <i>PRL</i> (prolaktin) geni.....	9
2.5.2 <i>CSN3</i> (kappa-kazein) geni .....	10
2.5.3 <i>PIT-1</i> (hipofiz özel transkripsiyon faktörü) geni .....	11
2.6 <i>PRL</i> , <i>CSN3</i> ve <i>PIT-1</i> Gen Bölgelerinde Yapılan Çalışmalar .....	11
2.7 Genetik Karakterizasyonda Moleküler Markörler .....	13
2.8 PCR (Polimerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	14
2.9 Restriksiyon Endonükleazlar ve PCR-RFLP Yöntemi .....	15
2.9.1 Restriksiyon endonükleazlar .....	15
2.9.2 PCR-RFLP yöntemi .....	16
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1 Materyal .....	19
3.1.1 Hayvan materyali .....	19
3.1.2 Araştırmada kullanılan cihazlar ve yardımcı malzemeler.....	20
3.1.3 Kimyasal maddeler ve primerler .....	20
3.2 Yöntem .....	21
3.2.1 Örneklerin toplanması.....	21
3.2.2 Genomik DNA’nın özütlenmesi .....	21
3.2.3 Çalışmada kullanılan primerlerin seçimi .....	24
3.2.4 PCR reaksiyon karışımı .....	24
3.2.5 Agaroz jel elektroforezi yöntemi ve dökümantasyon .....	25
3.2.6 Sodyum hidroksit – borik asit tamponu (SB).....	27
3.2.7 Agaroz jelin hazırlanması .....	28

3.2.8 Jelin yüklenmesi ve örneklerin yürütülmesi.....	28
3.2.9 Restriksiyon enzimleri ile kesim .....	28
3.2.10 Jellerin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi .....	29
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....</b>	<b>33</b>
4.1 Araştırma Bulguları .....	33
4.1.1 Anadolu mandası popülasyonunda <i>PRL</i> , <i>CSN3</i> ve <i>PIT-1</i> genlerinin PCR amplikon büyüklükleri.....	33
4.1.2 Anadolu mandası popülasyonunda <i>PRL</i> 'nin allelik durumu.....	34
4.1.3 Anadolu mandası popülasyonunda <i>CSN3</i> 'ün allelik durumu .....	35
4.1.4 Anadolu mandası popülasyonunda <i>PIT-1</i> 'in allelik durumu .....	36
4.2 Tartışma.....	37
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>41</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>45</b>

## ÇİZELGELER LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Manda ( <i>Bubalus bubalis</i> )'nın bilimsel sınıflandırılması .....	4
Çizelge 2.2. Dünyada manda varlığı en yüksek olan ilk yedi ülkede yıllara göre manda sayısı (baş) .....	5
Çizelge 2.3. Türkiye'de yıllara göre manda varlığı, sağılan ve kesilen hayvan sayıları ile ürün miktarı .....	6
Çizelge 2.4. Manda ve inek sütü kompozisyonu (%).....	8
Çizelge 3.1. Kan örneklerine ait çalışma kodları, küpe numaraları ve cinsiyet bilgisi.....	19
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan cihazlar ve menşeleri .....	20
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin çalışma kodu, orjinal kodu, ileri ve geri primer dizilişi .....	24
Çizelge 3.4. PCR için gerekli reaktiflerin yoğunluk ve miktarları .....	24
Çizelge 3.5. <i>PRL</i> , <i>PIT-1</i> , <i>CSN3</i> için uygulanan PCR termal döngü düzenleri .....	25
Çizelge 3.6. SB tamponu için gerekli kimyasallar.....	28
Çizelge 3.7. Kesim işleminde kullanılan reaktifler ve kullanım miktarları.....	29
Çizelge 3.8. Restriksiyon enzimlerinin kesim noktası ve çalıştığı sıcaklık.....	29



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Manda ırklarına ait genel gruplandırma .....	5
Şekil 3.1. O.M.Ü Ziraat Fakültesi Genetik-Biyoteknoloji Laboratuvarı .....	21
Şekil 3.2. peqGOLD kandan DNA özütlenme kiti (peqlab) .....	22
Şekil 3.3. peqGOLD kandan DNA özütlenmesi işleminin kısa bir özeti .....	23
Şekil 3.4. Biomatik 50 bç-500 bç standart markör .....	26
Şekil 3.5. peqlab 100 bç-1500 bç standart markör .....	26
Şekil 3.6. Invitrogen 50 bç-2652 bç standart markör .....	27
Şekil 3.7. Jelin elektroforetik ayrılması ile oluşan bantların Syngene-Gene Tools programı yardımıyla moleküler büyüklüklerinin belirlenmesi .....	30
Şekil 3.8. Standart markör bant piklerini gösteren grafik ve tanım çizelgesi örneği	31
Şekil 4.1. Anadolu mandası popülasyonunda <i>PRL</i> gen bölgesinden elde edilen amplikonlar .....	33
Şekil 4.2. Anadolu mandası popülasyonunda <i>CSN3</i> gen bölgesinden elde edilen amplikonlar .....	34
Şekil 4.3. Anadolu mandası popülasyonunda <i>PIT-1</i> gen bölgesinden elde edilen amplikonlar .....	34
Şekil 4.4. Anadolu mandası popülasyonunda <i>PRL</i> gen bölgesinin <i>RsaI</i> enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler .....	35
Şekil 4.5. Anadolu mandası popülasyonunda <i>CSN3</i> gen bölgesinin <i>HindIII</i> enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler .....	35
Şekil 4.6. Anadolu mandası popülasyonunda <i>PIT-1</i> gen bölgesinin <i>HinfI</i> enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler .....	36



## KISALTMALAR

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>A</b>	: Adenin
<b>AFLP</b>	: Amplified fragment length polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
<b>Arg</b>	: Arjinin
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>bp</b>	: Base pair (Baz çifti)
<b>C</b>	: Sitozin
<b>CSN3</b>	: Kappa-kazein geni
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>G</b>	: Guanin
<b>Gly</b>	: Glisin
<b>HapAA</b>	: Haplotip allel homozigot genotipi
<b>HapAG</b>	: Haplotip allel heterozigot genotipi
<b>İle</b>	: İzolösün
<b>JAK</b>	: Janus kinaz ailesi
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>PIT-1</b>	: Anterior pituitary-specific transcription factor-1 gene (Hipofiz özel transkripsiyon faktörü-1 geni)
<b>PRL</b>	: Prolaktin geni
<b>PRLR</b>	: Prolaktin reseptörü
<b>RAPD</b>	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)
<b>Ser</b>	: Serin
<b>SNP</b>	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
<b>SSR</b>	: Simple Sequence Repeat - Microsatellite (Basit Dizi Tekrarları - Mikrosatelit)
<b>STAT</b>	: Transkripsiyon sinyal ileticileri ve aktivatörleri
<b>T</b>	: Timin
<b>Thr</b>	: Treonin
<b>Val</b>	: Valin



**KIZILIRMAK DELTASI'NDA YETİŞTİRİLEN ANADOLU  
MANDALARININ *PRL*, *CSN3* VE *PIT-1* GENLERİ BAKIMINDAN  
GENOTİPLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**ÖZET**

Manda sütü mandalardan elde edilen en önemli verim karakterlerinin başında gelmektedir. Süt verimi ve kalitesi ile ilgili özellikleri kontrol eden genler poligenik yapıda olup, çok sayıda gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu genlerden *PRL*, *CSN3* ve *PIT-1*; süt verimi, kalitesi ve sütün ürüne işlenmesi üzerinde en etkili olduğu bildirilen genlerdir. Bu çalışmada Samsun ili Kızılırmak Deltası'nda Anadolu mandası yetiştiriciliği yapan işletmelerden alınan 35 Anadolu mandası kan örneği; *PRL*, *CSN3* ve *PIT-1* genlerinin belirli lokusları bakımından Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile genotiplenmiştir. Araştırma sonucunda örneklerde *PRL* GG homozigot, *CSN3* BB homozigot, *PIT-1* BB homozigot olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çalışılan genotiplerin *PRL* ve *PIT-1* ilgili lokusu bakımından düşük, *CSN3* lokusu bakımından ise yüksek verim karakterine sahip alleller bakımından homozigot olduğunu ortaya koymuştur. Bölgedeki manda popülasyonunun genetik bir darboğaza sürüklenmesini önlemek, uygulanacak ıslah programları için gerekli genetik çeşitliliği ortaya çıkarabilmek için daha geniş çaplı, daha fazla hayvanda ve derinlemesine bir popülasyon tarama çalışmasına ihtiyaç bulunduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Anadolu mandası, *PRL*, *CSN3*, *PIT-1*, PCR-RFLP.



## **GENOTYPING OF *PRL*, *CSN3* AND *PIT-1* GENES IN ANATOLIAN WATER BUFFALOS REARED IN KIZILIRMAK DELTA BY PCR-RFLP**

### **ABSTRACT**

Buffalo milk is one of the most important production characteristics of buffalo. The genes that control milk yield and quality characteristics, are in polygenic structure and controlled by many genes. Some of these genes; *PRL*, *CSN3* and *PIT-1* are reported to be effective genes on milk yield, milk quality and have some advantages on processing of milk products. In this study, 35 samples of Anatolian buffalo from the buffalo farms in Kızılırmak Delta in Samsun province were genotyped using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method in terms of *PRL*, *CSN3* and *PIT-1* genes specific loci. The results show that all the samples are identified as in homozygous genotype in terms of *PRL* as GG, *CSN3* as BB, and *PIT-1* as BB. These results revealed that the studied genotypes showed homozygous structure for poor yield related alleles in *PRL* and *PIT-1* loci but high yield related allele in *CSN3* locus. It was concluded that there is need for more extensive and in depth population surveys to avoid drift of buffalo populations to a genetic bottleneck and to reveal the genetic diversity necessary for the future breeding programs in the region.

**Key words:** Anatolian water buffalo, *PRL*, *CSN3*, *PIT-1*, PCR-RFLP.



## 1. GİRİŞ

Yerel ırklar, yetiştirildikleri bölgenin ekolojik şartlarına olduğu kadar yetiştiricilerin geleneksel üretim koşullarına da uyum sağlamış olan genotiplerdir. Bu özellikleri belirli bir coğrafyada yaşayan ve hayvancılık ile uğraşan çiftçiler için bu genotipleri alternatifsiz kılmaktadır. Bununla birlikte ekonomik verim karakterleri bakımından yetersiz olmaları melezleme ile verimlerinin artırılması çabalarına maruz kalmalarına neden olmaktadır. Bu genotiplerin yüzyıllar boyunca kazandıkları allelik zenginlikler ve özgün karakterleri bu melezlemeler yüzünden bozulmakta, yerel popülasyonların yapısında genetik erozyon ve genetik kirlenme meydana gelmektedir. Yerli ırklar yaşadıkları yörenin çevre koşullarına uyum sağlamalarından dolayı yerel besin kaynaklarıyla yetinerek üreyebilmekte, göreceli olarak az, ancak kendine özgü verim verebilme yeteneğine sahiptir. Yerel genetik kaynakların melezlemeler nedeniyle yok olması bu niteliklerin de yok olması demektir. Kültür ırklarının her yöreye adapte olamaması dolayısıyla yetiştirilemediği alanlarda yerli ırkların tercih edilmesi ve ekonomik gelire katkı sağlaması göz önüne alındığında yerli ırkların yok olması ıslah ve yetiştiriciler başta olmak üzere ülke açısından büyük kayıp olacaktır. Gelecekte şartların hangi karakterlere gereksinim duyacağını tahmin etmek neredeyse imkansızdır. Yerli ırkların bugün bilinmeyen üstün niteliklerinin yıllar sonra ihtiyaç duyulduğunda kullanılabilmesi için bu kaynakların korunması gerekmektedir (Ertuğrul ve diğ., 2000).

Ülkemizde Anadolu mandası yetiştiriciliği Karadeniz Bölgesi'nde Samsun ve Sinop; Orta Anadolu'da Çorum, Amasya; İç Batı Anadolu'da Afyonkarahisar, Balıkesir; Doğu Anadolu'da Sivas, Muş; Güney Doğu Anadolu'da ise Diyarbakır'da daha yoğun şekilde bulunmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008). Doğaya bağımlı yetiştiriciliği, bulunduğu bölgeye adapte olması ve yörede bulunan yerel besin kaynağıyla yetinebilmesi açısından manda ve manda ürünleri üretici ile tüketicilere çok önemli imkanlar sağlamaktadır. Manda sütünden elde edilen yoğurt, kaymak, peynir, kaymaklı lokum ve tereyağı, özellikle Afyonkarahisar ve Samsun illerimizin kültürel anlamda isimlerini duyurmuş ve yöre halkına ekonomik kazanç imkanı

sunmaktadır. Bununla birlikte bölgedeki mandaların süt veriminin ıslahı ile ilgili yapılan çalışmalar pedigrı kayıtlarına dayalı damızlık seçimi şeklindedir. Literatürde bölgedeki mandaların belirli verim özelliklerini determine eden gen bölgeleri bakımından genotipik durumları ile ilgili moleküler veri bulunmamakta dolayısıyla da seleksiyon çalışmalarında moleküler verilerden faydalanılamamaktadır.

Bu bağlamda çalışmanın amacı bölgemizdeki mandalarda süt verimi (*PRL*, *PIT-1*) ve sütün ürüne işlenmesinde kolaylık sağlayan (*CSN3*) bazı gen bölgelerinin polimorfizm durumlarının tespit edilmesi olmuştur. Bu sayede yörede yetiştirilen mandaların ilgili genler bakımından genetik yapısının ortaya konulması, araştırmacılara halihazırda uygulanmakta olan ya da ileride uygulanacak ıslah çalışmalarına moleküler bakış açısı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Ülkemizde farklı ekolojik yapılarda zengin sulak alan habitatları yer almakta olup aynı zamanda Batı Paleartik bölgede 4 önemli kuş göz yolundan ikisi ülkemiz üzerinden geçmektedir. Kızılırmak Deltası 1182 km uzunluğundadır ve 78000 km<sup>2</sup>'lik havzaya sahiptir. Türkiye'nin Karadeniz kıyılarındaki doğal özelliklerini kısmen koruyabilmiş en büyük sulak alandır. Delta 56000 ha alana sahiptir ve bu alanın 6110 ha sulak alandır. Kızılırmak'ın Anadolu içinde yaptığı uzun hareketin sonunda, binlerce yıldan beri taşıyıp getirdiği alüvyonlar sonucunda bu delta oluşmuştur. 1979 yılında Orman Bakanlığı tarafından "Yaban Hayatı Koruma Sahası" olarak koruma altına alınmıştır. Canlı türleri açısından zengin bir çeşitliliğe sahip olan delta mandalar için de doğal yaşam alanıdır. Ülkemizde manda popülasyonunun en çok bulunduğu yerlerden biride Kızılırmak Deltası'dır. Yöre halkı deltada doğaya bağımlı manda yetiştiriciliği yaparak geçimlerini sağlamaktadırlar. Mandalar et ve süt veriminin yanısıra sulak alan ekosisteminin en önemli parçalarından biridir (Can ve Taş, 2012).

### 2.1 Mandaların Sınıflandırılması

Manda, Bovidae ailesinde bulunan, et, süt, deri ve iş gücünden yararlanmak için Asya, Avrupa, Afrika, Güney Amerika ve Avustralya'da 38 ülkede yaygın olarak yetiştirilen ve dünyada en çok Asya kıtasında bulunan bir türdür. Farklı çevre koşullarına uyum sağlayabilen, düşük kaliteli ve ucuz kaba yemleri değerlendirebilen kanaatkar hayvanlardır (Nanda ve Nakao, 2003). Manda, özellikle Kuzey Amerika ve Asya'da Water Buffalo (su mandası) sözcükleriyle tanımlanırken, Türkçe'deki manda kelimesinin Hindistan'dan geldiği düşünülmektedir (Atasever ve Erdem, 2008).

Ülkemiz mandaları, nehir mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve Anadolu mandası olarak adlandırılmaktadırlar. Genel olarak Kuzey Anadolu sahilinde Samsun ve Sinop; Orta Anadolu'da Çorum, Amasya; İç Batı Anadolu'da Afyonkarahisar, Balıkesir; Doğu Anadolu'da Sivas, Muş;

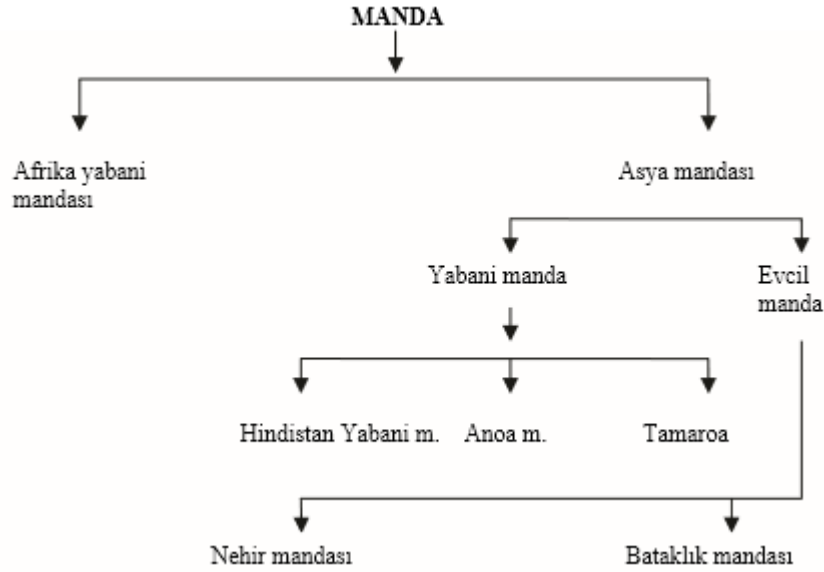
Güneydoğu Anadolu'da ise Diyarbakır'da daha yoğun şekilde bulunmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008).

Manda (*Bubalus bubalis*)'nın bilimsel sınıflandırılması Çizelge 2.1'de, manda ırklarına ait gruplandırma ise Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Manda (*Bubalus bubalis*)'nın bilimsel sınıflandırılması (Atasever ve Erdem, 2008)

Taksonomik grup	Bilimsel adı	Türkçe
Alem	Animalia	Hayvanlar
Şube	Chordata	Kordalılar
Sınıf	Mammalia	Memeliler
Takım	Artiodactyla	Çift toynaklılar
Familya	Bovidae	Boynuzgiller
Alt familya	Bovinae	Sığırlar
Cins	Bubalus	Antiloplar
Tür	B. bubalis	Mandalar

Mandaların 74 ayrı ırkı bulunmakla birlikte bu ırklar Bataklık mandaları ve Nehir (ırmak) mandaları olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Bataklık mandalarının çeki gücünden, ırmak mandalarının et ve süt verimlerinden faydalanılmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008).



**Şekil 2.1.** Manda ırklarına ait genel gruplandırma (Atasever ve Erdem, 2008).

## 2.2 Dünyada Manda Yetiştiriciliğinin Genel Yapısı

Manda, tüm dünyaya yıllık 80 milyon ton süt (toplam süt miktarındaki payı % 10,7) ve 3.7 milyon ton et (toplam et miktarındaki payı % 1.19) katkıda bulunmaktadır. FAO istatistiklerine göre dünyada 1970-2013 yılları arasında yetiştirilen manda sayısı ülkelere göre Çizelge 2.2’de verilmiştir. 2013 yılında birinci sırayı en fazla manda varlığıyla Hindistan almaktadır. Sağılan manda sayısı ile dünyada ilk 3 sırayı Hindistan (38.9 milyon), Pakistan (12.5 milyon) ve Çin (5.5 milyon) almaktadır. En fazla süt üretimiyle (70 milyon ton) ve manda başına düşen süt miktarıyla (1799 kg) yine dünyada ilk sırayı Hindistan almaktadır (URL-1).

**Çizelge 2.2.** Dünyada manda varlığı en yüksek olan ilk yedi ülkede yıllara göre manda sayısı (baş)\*

Yıl	Hindistan	Pakistan	Çin	Nepal	Mısır	Vietnam	İtalya
1970	56.118.000	9.345.000	15.713.063	1.020.000	2.009.000	2.270.700	48.600
1980	66.070.000	11.547.000	18.439.752	2.500.000	2.346.583	2.313.000	88.900
1990	80.570.000	17.373.008	21.421.975	3.012.565	2.897.467	2.854.100	112.400
2000	93.831.000	22.669.000	22.595.017	3.525.952	3.379.410	2.897.200	182.000
2013	109.400.000	33.680.000	23.253.300	5.241.873	4.200.000	2.559.539	402.659

\*FAO, 2015.

Mısır, Asya ve Kafkas ülkeleri gibi dünyanın bazı bölgelerinde manda sütünden dahi (mayalanmış ekşi süt), ghee (bir çeşit tereyağı) ve yoğurt üretimi popüler hale gelmiştir. İtalya’da manda sütü endüstrisi mozzarella peynirinin manda sütünden elde

edilmesi nedeniyle oldukça gelişmiştir. Manda sütüne olan talebin artması süt veriminin ıslahına yönelik çalışmaları ve entansif yetiştiriciliği yaygınlaştırmıştır (Thomas, 2008). İtalya’da 2013 yılında sağılan hayvan sayısının 241.164 baş, üretilen toplam süt miktarının 194.893 ton, hayvan başına bir laktasyonda elde edilen süt veriminin ise 8.081 kg olduğu bildirilmektedir (URL-1). İtalya’da birim hayvandan elde edilen süt veriminin yüksek olmasının nedeni genetik ıslah çalışmalarının programlı bir şekilde uygulanmasıdır.

Brezilya ve Arjantin gibi Güney Amerika ülkelerinde de hem süt hem de et için manda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Hindistan ve Pakistan’da, Mumbai, Kalküta ve Karaçi gibi büyük şehirlere yakın bölgelerde çeşitli büyüklüklerdeki sürüler halinde manda çiftliği bulunmaktadır. Sadece Mumbai’de bile 200.000’den fazla manda bulunduğu bildirilmektedir. Son yıllarda İngiltere’de ve ABD’de de manda yetiştiricilerinin sayısının artmakta olduğu bildirilmiştir. (Thomas, 2008).

### 2.3 Türkiye’de Manda Yetiştiriciliğinin Genel Yapısı

Ülkemizde yetiştirilen mandalar Nehir mandalarının bir alt grubu olan Akdeniz mandalarından köken almakta ve “Anadolu mandası” olarak adlandırılmaktadır (Atasever ve Erdem, 2008). Türkiye’de 1991-2014 yılları arasında manda yetiştiriciliğindeki azalmaya bağlı olarak aynı yıllar içerisinde kesilen manda sayısındaki azalma Çizelge 2.3’de görülmektedir. Ülkemizde manda varlığıyla ilk 3 sırayı Samsun, Diyarbakır ve İstanbul almaktadır (URL-2).

**Çizelge 2.3.** Türkiye’de yıllara göre manda varlığı, sağılan ve kesilen hayvan sayıları ile ürün miktarı\*

Yıl	Yetişkin Toplam	Genç	Yavru	Sağılan Hayvan Sayısı (Baş)	Süt (Ton)	Toplam Kesilen Hayvan Sayısı (Baş)	Toplam Et (Ton)	Toplam Deri (Adet)
1991	260.604	105.546	366.150	171.082	161.348	59.913	8.803	65.904
1997	138.660	55.340	194.000	92.206	86.700	36.296	5.640	39.926
2005	80.344	24.621	104.965	38.205	38.058	8.920	1.577	9.812
2010	66.802	17.924	84.726	35.362	35.487	15.720	3.387	15.720
2014	96.757	25.069	121.826	54.795	54.687	2.176	526	2.176

\*TÜİK, 2015.

Ülkemizde genel olarak Samsun ve Sinop, Çorum, Amasya, Afyonkarahisar, Balıkesir, Sivas, Muş, Diyarbakır illerinde daha yoğun manda yetiştiriciliği

yapılmaktadır. Manda yetiştiriciliği ülkemizde süt ve et verimi açısından daha büyük önem taşımaktadır. Yerli manda ırkımızın genel olarak fiziksel özellikleri arasında yay şeklinde geriye kavisli boynuz ve siyah renk ağır basmaktadır. Yıllardır yaşadıkları yöreye adapte olmaları sayesinde hastalıklara karşı doğal bir dayanıklılık sağlamalarının yanısıra, ucuz yemleme olanağı ve ek işgücü istememesi gibi nedenlerle sığıra tercih edilebilmektedir (Atasever ve Erdem, 2008).

Sindirim yeteneklerinin sığıra göre daha iyi olması nedeniyle düşük kalitedeki kaba yemleri tüketerek daha düşük maliyetle canlı ağırlık kazanabilmektedir (Nanda ve Nakao, 2003). Türkiye’de manda başına elde edilen süt ve et verimleri, dünyada bu konuda öncü olan ülkelerin çok gerisinde kalmaktadır. Ancak ülkemizde en fazla manda sütü üretimi 8.147 ton ile Samsun’da yapılmaktadır. Diyarbakır’da 6.099 ton, İstanbul’da 5.339 ton, Tokat’da 3.050, ton, Afyonkarahisar’da ise bu rakam 2.263 tondur. Samsun’da ise en fazla manda sütü üretimi 2.237 ton ile Bafra ilçesindedir (URL-2). Sağım genellikle elle yapılmakta olup, laktasyon süreleri 180-280 gün; süt verimleri 800-1100 kg, ergin dişi manda canlı ağırlığı ise yaklaşık 500 kg’dır (Atasever ve Erdem, 2008).

Dünyadaki manda sayısında yıldan yıla artış gözlenirken Türkiye’de manda sayısında düzenli bir artış gözlenememesinin nedeni manda yetiştiriciliğinin ülkemizdeki geleneksel yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Manda yetiştiriciliğinin entansif yetiştiricilik açısından cazip olamamasının nedenlerinden biri eldeki hayvanların verim düzeylerinin düşük olmasıdır. Bu durum manda yetiştiriciliğinin karlılığını azaltmakta ve sığıra alternatif olmasını zorlaştırmaktadır. Dünyada manda yetiştiriciliği bakımından ileri ülkeler, İtalya örneğinde olduğu gibi, mandalarda planlı ıslah programları yürütmektedirler. Islah çalışmalarının yaygınlaştırılması ve desteklenmesi ülkemizde manda yetiştiriciliğinin geleceği açısından faydalı görülmektedir.

## **2.4 Manda Sütünün Önemi**

Yapısal olarak manda sütü Çizelge 2.4’de gösterildiği gibi, inek sütüne göre daha az su, daha çok kuru madde, yağ ve protein içermektedir (Thomas, 2008; Barlowska ve diğ., 2011).

**Çizelge 2.4.** Manda ve inek sütü kompozisyonu (%)

Tür	Su	Kuru madde	Protein	Yağ	Laktoz
Manda	82,7	17,50	4,82	7,73	4,79
Sığır	87,9	12,40	3,42	4,09	4,82

Manda sütünü üstün kılan özellikleri; yüksek kurumadde, yüksek yağ ve kaloridir. Bu nedenle yoğurt, peynir, tereyağı, kaymak, dondurma gibi pek çok ürüne işlenmektedir. Son yıllarda organik ürünlere olan talebin artmasıyla manda sütü ve ürünlerine de ilgi artmıştır (Atasever ve Erdem, 2008). Ülkemizde bölgelere göre, bazı yörelerde kaymak üretimi ön plandayken, bazı yörelerde ise peynir üretimi ön plandadır. Örneğin Afyonkarahisar’da kaymak üretimi, Bafra’da yoğurt, peynir, kaymaklı lokum üretimi ön plandadır. Geleneksel olarak manda üretiminin yapıldığı yörelerden biri de Samsun’un Bafra ilçesinde bulunan Kızılırmak Deltası’dır. Deltada yaşayan insanların yüzyıllardır ana geçim kaynaklarının başında manda sütü ve bu süttten elde edilen yoğurt, peynir ve kaymak gibi ürünler gelmektedir. Deltanın ekolojik koşulları dikkate alındığında bu şartlar için en uygun tür mandadır. Türkiye’nin, manda yetiştiriciliği yapılan diğer yörelerinde olduğu gibi Kızılırmak Deltası’nda da üretimin niteliği çoğunlukla doğaya bağımlı bir yetiştiricilik kültürü şeklindedir. Deltanın, mandalar için uygun ekolojik şartlara sahip olması, bu mandalardan elde edilen süt, peynir, yoğurt, kaymak gibi ürünlerle de adını kültürel anlamda duyurmuş olması Kızılırmak Deltası’ndaki manda yetiştiricilerine ekonomik açıdan önemli katkı sağlamaktadır.

Günümüzde talep edilen, deltaya özgü en önemli organik ürünlerin başında manda sütü ve ürünleri gelmektedir. Bu durum, bölgede yetiştirilen mandalardan yüksek miktarda ve ürüne işlemede kolaylık sağlayan bir süt üretiminin gerçekleştirilebilmesini zorunlu kılmaktadır. Verimin artırılabilmesi, bu verim özelliği üzerine etkili olan gen bölgelerinde allelik açıdan en uygun genetik kompozisyona sahip bireylerin elde edilmesine bağlıdır. Bunun yolu da en iyi damızlık hayvanın seçilebilmesi ile mümkündür.

## 2.5 Süt Verimi Üzerine Etkili Olan Gen Bölgeleri

### 2.5.1 *PRL* (prolaktin) geni

Prolaktin laktasyon ve üreme üzerinde etkili olan, büyükbaş hayvanların ve omurgalıların ön hipofiz bezinin laktotrop hücreleri tarafından sentezlenen ve salgılanan pleiotropik bir polipeptid hormondur (Khaizaran ve Al-Razem, 2014).

Temel işlevi JAK / STAT sinyal yolağı yoluyla memelilerde laktasyon ve üreme ile ilgili birçok endokrin faaliyetlere katılmaktır. Prolaktin işlevinin başlangıç aşaması spesifik bir membran reseptörüne (PRLR) bağlanmasıdır ve JAK kinazların aktivasyonuna ve sonrasında da fosforilasyon STAT5 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna katkıda bulunur. Buna ek olarak, Prolaktin süt üretim süreçleri sırasında sinyal iletiminde önemli bir rol oynar ve PRLR dimerizasyonu yoluyla hareket ederek emzirme uyarılması için kendi fizyolojik fonksiyonlarını uygular (Lü ve diğ., 2010).

Ayrıca hücre farklılaşmasında, gelişmesinde ve bağışıklık fonksiyonlarının düzenlenmesinde de görev alır (Alfonso ve diğ., 2012). Süt verimi ve kalitesindeki önemi sebebiyle *PRL* önemli bir gen olarak kabul edilir. Çünkü bu gen meme bezi gelişiminde, süt üretiminin başlatılmasında ve devamının sağlanmasında ve süt protein genlerinin ekspresyonunun korunmasında çok önemli rol oynar (Othman ve diğ., 2011). Ancak bu gende meydana gelen SNP'ler sütün kimyasal yapısını etkilemekte olup bunlardanyüksek süt verim karakterine sahip hayvanların damızlık olarak seçilmesinde kullanışlı birer araç olarak faydalanılabilir. Sığır 23. kromozomda *PRL*'nin haritası çıkarılmıştır (NCBI AC\_000180.1). Bu genin tamamı 9388 bp uzunluğundadır, 5 ekson ve 4 intron içermektedir ve 199 amino asit kodlamaktadır. Bazı çalışmalarda sığır *PRL*'nin genetik polimorfizmi taranmıştır ve 20'den fazla SNP'nin var olduğu bildirilmiştir (Khaizaran ve Al-Razem, 2014). Belirlenen SNP'lerin çoğunun sessiz mutasyon olması ve/veya intronlar içinde bulunmasına rağmen, en önemli SNP 4. eksonu etkilemektedir ve 8398. nükleotid pozisyonunda guanin bazının adenin bazına dönüşmektedir. Bu polimorfizm RsaI kesim enzimiyle tanımlanabilmektedir. Bu SNP, *PRL* ile süt verim performansı arasındaki ilişkinin genetik karakterizasyonu ve tanımlanması için kullanılan genetik markördür (Lü ve diğ., 2010).

### 2.5.2 CSN3 (kappa-kazein) geni

Kazein meme bezi hücrelerinden salgılanan bir proteindir. Süt proteininin %80'ini oluşturmaktadır ve 4 gruba ayrılır;  $\alpha_{S1}$ -casein (CSN1S1),  $\alpha_{S2}$ -casein (CSN1S2),  $\beta$ -casein (CSN2) ve kappa-casein (CSN3) (Kaminski ve diğ., 2007; Gedik, 2009). Süt kalitesi, peynirin ve tereyağının pıhtılaşması ve kazein misellerinin formasyonu, stabilizasyonu ve toplanmasındaki önemli rolleri sebebiyle en çok üzerinde durulan süt proteinlerindedir (Masina ve diğ., 2007). Sütte bulunan miseller, minerallerin çözünürlüğünü artırmakta ve ananın besin maddelerinin yavruya transferini kolaylaştırmaktadır. Sütün kazein bileşenleri hayvan türleri arasında önemli farklılıklar göstermesine rağmen (Gerencs ve diğ., 2002), kappa-kazeinin biyolojik rolü her yerde aynı görülmüştür (Martin ve Grosclaude, 1993). Kazein geninin polimorfizmi, sütün bileşenleri, işlenmesi, kalitesi gibi verim karakterleri ile de ilişkilidir (Dayem ve diğ., 2009).

Tüm kappa-kazein bileşenleri kimozin (chymosin) ile parçalanabilir. Kimozin sütün pıhtılaşmasından ve oluşan misellerin boyu ve fonksiyonundan sorumlu olan bir proteindir. Bu süreç peynirin pıhtılaşma sürecinin ilk aşamasıdır (Yahyaoui ve diğ., 2003; Gedik, 2009). *CSN3*'ün genetik varyantları sütün protein içeriği, peynir verimi ve verim sıklığı ile ilişkilidir ve pıhtılaşma süresinin üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. *CSN3*'ün süt üretimi üzerine olan büyük etkisi bu gen bölgesi ile ilgili sığır, keçi, koyun, manda gibi bir çok türde çok sayıda çalışmanın yapılmasına neden olmuştur (Othman ve diğ., 2011; Feligini ve diğ., 2005; Ren ve diğ., 2011).

Bugüne kadar sığırlarda yapılan çalışmalarda *CSN3*'ün 6 varyantı tespit edilmiştir. Bunlar; A, B, C, E, F ve G varyantlarıdır (Kaminski, 1996; Prinzenberg ve diğ., 1996; Barroso ve diğ., 1998). Kappa-kazein proteininin en yaygın iki lokus tipi *CSN3 A* ve *CSN3 B* tipidir. *CSN3* lokusunun 148. kodonunda *CSN3 A* tipinde bulunan aspartik asit (Asp) amino asidinin sentezinden sorumlu olan GAT kodonunda A→C (GAT→GCT) şeklinde bir mutasyon (transisyon tipinde) meydana gelmekte ve alanin (Ala) amino asidinin sentezinden sorumlu olan GCT kodonunun bulunduğu *CSN3 B* alleli oluşmaktadır. Bu mutasyon sonucunda oluşan *CSN3 B* alleleline sahip DNA moleküllerinde HindIII restriksiyon endonükleazı için bir tanıma (AAGCTT) ve dolayısıyla da bir kesim noktası meydana gelmektedir. Böylece, çalışmalarda yöntem olarak HindIII enziminden yararlanılarak PCR-RFLP yöntemi kullanılacaksa *CSN3 A*

allelinde herhangi bir kesim meydana gelmeyecek, buna karşılık *CSN3 B* allelinde ise bir restriksiyon meydana gelecektir (Pinder ve diğ., 1991).

Mandalarda *CSN3* 7. kromozom üzerinde tespit edilmiştir ve mRNA sekansı çıkarılmış ve 4 SNP tespit edilmiştir. ikinci eksonda 2 SNP tanımlanmıştır; dördüncü kodonda guanin bazının timin bazıyla yer değiştirmesi (Arjinin (AGG) yerine Serin (AGT)) ve sekizinci kodonda timin bazının guanin bazıyla yer değiştirmesi (Valin (GTT) yerine Glisin (GGT)); dördüncü eksonda 2 SNP tanımlanmıştır: yüz otuz beşinci kodonda timin bazının sitozin bazının yer değiştirmesi (İzolösün (ATC) yerine Treonin (ACC)) ve yüz otuz altı kodonda timin bazının sitozin bazıyla yer değiştirmesiyle oluşan sessiz mutasyondur (Mitra ve diğ., 1998).

### **2.5.3 *PIT-1* (hipofiz özel transkripsiyon faktörü) geni**

Hipofiz-özel transkripsiyon faktörü (*PIT-1*) geni memelilerde hipofiz gelişiminden ve hormon üretiminden sorumludur. Prolaktin hormon üretiminin düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Ön hipofizdeki prolaktin (*PRL*) geninin ve büyüme hormonu (*GH*) geninin ifadesini düzenler (Khaizaran ve Al-Razem, 2014). Kütlesi yaklaşık olarak 33 kDa'dur. *PRL* ve *GH* promotorlerinin yüksek DNA bağlanma afinitesine ihtiyaçları vardır. Hidroksillenmiş amino asit kalıntıları olan *PIT-1*, N-terminal trans-aktivasyon alanı ile kısmen aktifleşir. *PIT-1* sentezindeki azalma, *PRL* ve *GH* ekspresyonundaki azalma ve somatotropik ve laktotropik hücre hatlarının çoğalmasında ki azalmayla sonuçlanmıştır (Dybus ve diğ., 2004; Tang ve diğ., 2012).

*PIT-1* büyüme, karkas ve süt verim özellikleri için aday bir genetik markördür. *PIT-1* polimorfizminin sığırdaki süt verimi ve süt konformasyon özellikleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. *PRL* ve *CSN3* genlerinde benzer olarak meydana gelen birkaç polimorfizm sığır *PIT-1* lokusunda tespit edilmiştir. İlk polimorfizm ekson 6 üzerinde Hinfl kesim bölgesinde adenin bazının guanin bazı ile yer değiştirmesi şeklinde karakterize edilmiştir. Bu SNP, A ve B allellerini tespit etmek için kullanılmıştır (Othman ve diğ., 2011).

### **2.6 *PRL*, *CSN3* ve *PIT-1* Gen Bölgelerinde Yapılan Çalışmalar**

*PRL*, *CSN3* ve *PIT-1* ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda kısaca özetlenmiştir. Brym ve diğ. (2005) yaptıkları bir çalışmada Siyah Alaca ırkı sığırlarda ve Jersey ırkı sığırlarda *PRL*'nin 4. eksonu üzerinde bulunan SNP'yi tanımlamak için PCR-RFLP

yöntemiyle allelik varyasyonu belirlemişlerdir. 294 bç'lik bir gen bölgesini çoğaltmışlar ve kesim fragmenleri sonucunda Siyah Alaca ırkı sığırlarda A allel frekansını 0.113 ve G allel frekansını 0.887, Jersey ırkı sığırlarda A allel frekansını 0.706 ve G alleli frekansını 0.294 tespit etmişlerdir. Ayrıca AG genotipinin yüksek süt verimi sağlarken, GG genotipinin yüksek oranda yağ içerdiğini bildirmişlerdir.

Lü ve diğ. (2010) Holstein ırkı sığırlarda yaptıkları bir çalışmada altı farklı primer seti kullanarak *PRL* gen bölgesini çoğaltıp SSCP (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) yöntemi ile SNP taraması yapmışlardır. P1 primeriyle çoğaltılan gen bölgesinde GG genotipinde yüksek süt verimi tespit ederken, AA genotipinde yüksek yağ içeriği tespit etmişlerdir. Ayrıca promotor bölgede bulunan iki SNP için yaptıkları haplotip analizinde Hap-AG genotipinin yüksek süt verimine, Hap-AA genotipinin yüksek yağ içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Othman ve diğ. (2011) Mısır mandası üzerinde yaptıkları bir çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile *PRL*'nin 4. eksonundaki SNP'yi RsaI enzimi ile, *CSN3*'ün 4. eksonundaki SNP'yi HindIII, PIT geninin 6. eksonundaki SNP'yi HinfI kesim enzimi ile tanımlamışlardır. Çalışılan tüm genotiplerde *PRL*'nin GG homozigot tespit etmişlerdir ve en yüksek yağ oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışılan tüm genotiplerde *CSN3*'ü BB homozigot tespit etmişlerdir ve AA genotipine göre peynir veriminin %10 daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Çalışılan tüm genotiplerde *PIT-1* i BB homozigot olarak gözlemlemişlerdir. Yüksek süt verimi için A allelinin gözlenmesi gerektiğini ve yağ yüzdesinin düşük olduğunu, süt ve süt protein verimi için üstün olduğunu ifade etmişlerdir.

Alfonso ve diğ. (2012) Amerikan İsviçre Esmer sığırlarında allelik varyasyonu tespit etmek için yaptıkları bir çalışmada *PRL*'nin 3. eksonu üzerindeki SNP'yi RsaI enzimi kullanarak PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. A allel frekansını 0.8765 ve B allel frekansını 0.1235 olarak hesaplamışlardır. AA, AB, ve BB genotip frekansını ise sırasıyla 0.776, 0.174 ve 0.026 olduğunu bildirmişlerdir. AA genotipinin laktasyon boyunca yüksek süt verimine sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Javanmard ve diğ. (2005) İran sığır ve manda popülasyonları üzerinde yaptıkları bir çalışmada PCR-RFLP yöntemi ile *PIT-1*'in 6. eksonundaki SNP'yi HinfI kesim enzimi ile belirlemişlerdir. Araştırma sonunda A allel frekansını 0.766, B allel frekansını 0.233 olarak tespit etmişlerdir. AA genotip frekansını 0.567, AB genotip frekansını 0.400, BB genotip frekansını 0.033 olarak hesaplamışlardır.

Otoviano ve diğ. (2005) Brezilya mandalarında PCR-RFLP ve SSCP yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada *CSN3*'ün 4. eksonunu çoğaltmışlardır. Bu gen bölgesindeki SNP'ye uygun olan *HinfI* kesim enzimiyle kesip allelik varyasyonu belirlemişlerdir. Bütün örneklerde BB homozigot genotipini tespit etmişlerdir.

Dayem ve diğ. (2009) Mısır mandalarında PCR-RFLP yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada *CSN3*'ün 1. ekson ile 5. ekson arasındaki gen bölgesini 2 farklı primer seti ile çoğaltmışlardır. Amplikonları *HindIII*, *HinfI* ve *TaqI* kesim enzimleriyle kesip allelik varyasyonu araştırmışlardır. Kesim sonucunda bütün genotiplerin BB homozigot olduğunu bildirmişlerdir.

Ren ve diğ. (2011) Holstein ve Jersey ırkı sığırlarda ve Murrah ve Nili-Ravi ırkı mandalarda PCR-RFLP yöntemi ile yaptıkları bir çalışmada *CSN3*'ün 4. eksonunu çoğaltarak *HinfI* kesim enzimiyle allelik varyasyonu incelemişlerdir. Holstein ırkı örneklerinde yüksek oranda A allel frekansını tespit ederken, Jersey ırkı örneklerinde yüksek oranda B allel frekansını tespit etmişlerdir ve hiç AA genotipi tespit etmemişlerdir. Yüksek peynir verimi ve yüksek süt kalitesi için bütün manda örneklerinde ise BB genotipini gözlemlemişlerdir. Daha önceki çalışmalarda süt kalitesi ve peynir yapımı için B alleli üzerinde çok çalışıldığı ifade edilirken, Çin'de Holstein ırkında süt kalitesinin artırılması ve peynir yapımı için BB homozigot genotiplerde çalışıldığı ifade edilmiştir.

*CSN3 B* varyantı, peynir yapımı gibi sütün ürüne işlenme özellikleri ile ilişkilidir (Lin ve diğ., 1992; McLean, 1987). Yapılan çalışmalarda sığırlarda *CSN3 B* allelinin frekansının diğer allellere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun nedenlerinden biri de B allelinin frekansının artırılması amacıyla suni tohumlamada kullanılan boğalardan AB veya BB genotipinde olanların seçilmesi şeklinde yorumlanmıştır (Dayem ve diğ., 2009).

## **2.7 Genetik Karakterizasyonda Moleküler Markörler**

DNA analizi için kullanılan araçların son yıllarda gelişmesiyle birlikte ırklar içi ve ırklar arası varyasyonu karakterize edebilme kapasitesi artmıştır. Fenotipik özellikler ile yapılan sınırlı karakterizasyonu, son zamanlarda moleküler belirteçlerin artan sayısı ve diğer analizlerin karmaşık istatistiksel tekniklerinin geliştirilmesiyle tamamlanabilmektedir.

Popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitlilik seviyesinin belirlenmesi, koruma programlarının geliştirilmesi, evcilleştirilme ve göç yollarının tespiti gibi çalışmalar için oldukça önemlidir. Bu amaçla yapılan genetik karakterizasyon çalışmalarında alloenzimler, markör sistemleri, mitokondriyal DNA ve Y kromozomuna özgün markörler kullanılmaktadır. PCR uygulamalarında en çok tercih edilen markör sistemleri DNA markörleri ve polimorfik mikrosatellit markörleridir. Son yıllarda moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesiyle, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) analizinin daha kısa sürede ve daha ekonomik yapılabilmesi sağlanmıştır (Özşensoy ve Kurar, 2012) .

Moleküler genetik ve bilgisayar uygulamalarındaki gelişmelerle birlikte kantitatif karakterlerde varyasyonda payı olan genlerin belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. Ayrıca bu söz konusu genomik bölgelerin erken yaştaki erkek ve dişi çiftlik hayvanlarında genotiplenmesi ıslah ve seleksiyon açısından büyük hız ve avantaj sağlayacaktır. Ancak bu şekilde yapılan seleksiyon, farklı allelerin popülasyondaki dağılımlarına ve farklı allellerin ekonomik karakterler üzerindeki etkisine bağlıdır. Türkiye’de yetiştirilen yerli ve kültür ırklarının söz konusu gen bölgeleri bakımından genetik yapısının ortaya çıkarılması yetiştiricilik faaliyetlerinin planlanması ve yürütülmesi için gerekli bir adım olması nedeniyle bu durum son derece umut vericidir. Günümüzde çiftlik hayvanlarında et ve süt verimi ve üreme faaliyetleri gibi ekonomik karakterler ile ilişkili olduğu bilinen ve seleksiyonda kullanılacak çok sayıda aday gen bulunmaktadır (Şahin ve diğ., 2013).

## **2.8 PCR (Polimerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR), DNA’nın sıcaklık farklılıklarıyla döngüler boyunca yapay olarak çoğaltılması işlemidir. PCR’nin dayanıklılığı ve duyarlılığı, çok düşük miktardaki başlangıç materyalinden ve düşük kaliteli materyalden çok hızlı bir şekilde DNA’nın çoğaltılmasını sağlamaktadır. DNA’nın çoğaltılması için kalıp DNA’ya (tDNA), DNA dizisini kuşatan, 17-30 nükleotid uzunluğunda iki oligonükleotid primerine, eşit konsantrasyonlarda A, T, G, C nükleotidlerine (dNTP-Deoksiribonükleotid trifosfat), DNA polimeraz enzimine (Taq polimeraz) , katalizör amaçlı uygun katyonlara ( $Mg^{+2}$ ) ve tamponlara (Tris-Cl) ihtiyaç vardır.

PCR için gerekli sıcaklık koşullarının sağlandığı cihaza ‘‘Termal döngü cihazı’’ (Thermal cycler) adı verilir. Uygulanan sıcaklıklarla DNA'nın çoğaltılması 3 aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada DNA'nın çift zincir yapısının açılması için 93-95°C sıcaklıkta denatürasyon gerçekleştirir. Primerler denatüre olan DNA'nın zincirlerine zıt olacak şekilde hibridleşir ve bu iki bölge polimeraz yardımıyla DNA sentezini yönlendirir. İkinci aşama primerlerin DNA'ya bağlanabilmesi için en uygun sıcaklığa gelmesidir. Bu sıcaklık T<sub>m</sub> (annealing temperature-bağlanma sıcaklığı) olarak adlandırılır ve pratik olarak aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Sağlanan uygun sıcaklıkla primerler bağlandıktan sonra son aşama olarak kullanılan DNA polimerazın en aktif olduğu sıcaklıkla ortamdaki dNTP'leri kullanarak kalıp DNA sekansı boyunca (3'→5' yönünde) uzamanın gerçekleşmesidir. Sıcaklık değişimleriyle birlikte denatürasyon, primer hibridizasyonu ve uzama döngüleri tekrarlanır ve DNA'nın spesifik hedef bölgesi hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar. 22 döngü sonrasında yaklaşık 10<sup>6</sup> kat fazla bir çoğalma beklenmektedir ve uygulama sonrasında da bu çoğalma elde edilmektedir (Primrose ve Twyman, 2006; Mercan, 2010).

## **2.9 Restriksiyon Endonükleazlar ve PCR-RFLP Yöntemi**

Moleküler temelli yöntemlerin çoğu (AFLP, RAPD, SSR, SNP) PCR temelli markörlerdir. Farklı kullanım amaçlarına yönelik olarak optimize edilmiş olan bu yöntemler DNA seviyesinde polimorfizmin tespit edilmesine olanak sağlamıştır (Mercan, 2010).

### **2.9.1 Restriksiyon endonükleazlar**

1970'li yıllarda bakterilerin, nükleazlar içerdiği ve bu nükleazların DNA çift zincirinde bulunan kısa nükleotid dizilerini tanıyarak DNA çift zincirinin her ikisinde üzerinde bulunan spesifik bölgelerden DNA omurgasını kestiği tespit edilmiştir. Bu enzimler Tip II restriksiyon endonükleazlar olarak isimlendirilir. Bu enzimlerin bakteri içindeki fonksiyonu hücre içine giren viral DNA'ları yok etmektir, böylece virüslerin çoğalması engellenmiş olur. Bakteri kendi DNA'sını nükleotik saldırılardan korumak için kimyasal bir modifikasyonla hassas bölgelerdeki bazıları metiller ve enzim aktivitesini engeller. Enzimler çok sayıda prokaryotik

organizmadan izole edilmekte ve bunlar yine çok farklı nükleotid dizisi tanımaktadır. Bu enzimlerin çoğu 4-6 nükleotid uzunluğundaki dizileri tanır ve belirli bir tip iç simetri özelliğiyle karakterize edilmektedir (Karp, 2008). Örneğin HindIII restriksiyon enziminin kesim bölgesi aşağıdaki gibidir;

3'-TTCGA↑A-5'

5'-A↓AGCTT-3'

DNA'nın bir bölümünün ikili dönme simetrisine sahip olduğu söylenebilir. Çünkü, esas dizi içerisinde bir değişiklik olmaksızın 180° döndürülebilmektedir. Her iki zincirde de aynı yönde sekansı okur böylece bazları aynı sırada görmektedir. DNA'yı nükleotidleri birleştiren fosfodiester bağlarını ayırarak keser. Bazı enzimler yapışkan serbest uç oluştururken bazı enzimlerde küt uç oluşturmaktadır (Palladino ve Thieman, 2013).

Restriksiyon enzimlerinin keşfi ve saflaştırılması moleküler biyologlar açısından rekombinant teknolojisine ve gen klonlamaya yarayan makasların keşfi anlamına gelmektedir. Oldukça sık görülen 4-6 nükleotid dizileri DNA'nın her tipini belirli bölgelerden ayırmaktadır. Restriksiyon enzimlerinin kullanımı insan ve diğer organizmaların genomunda bulunan spesifik fragmenterin kesin olarak tanımlanmasına imkan verir. Belli bir DNA dizisinin enzimlerle kesimi gerçekleştirildikten sonra üretilen fragmentler jel elektroforezi ile ayrımlanabilmektedir (Karp, 2008).

### **2.9.2 PCR-RFLP yöntemi**

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism), dizisi bilenen genlerin allelik varyantlarının varlığını tespit etmek için nükleik asitleri incelemek amacıyla en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Gen ürünleri olan proteinler, genin farklı allelik yönlerini yansıttığı için bu türden polimorfizmlerin tespit edilmesi tür içi ya da türler arası varyasyonu moleküler düzeyde tanımlamak açısından önemlidir. Bu polimorfizmler DNA dizisinde restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini ortadan kaldırarak ya da yeni bir kesim bölgesi oluşturarak allelik varyasyonlara sebep olmaktadır. Hedef DNA dizisinin uygun restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucunda ortaya çıkan fragment büyüklükleri varyasyonlar hakkında bilgi vermektedir. RFLP yönteminde fazla miktarda DNA bulundurulması gerekliliği başta olmak üzere birçok dezavantajını ortadan kaldırmak için PCR-RFLP yöntemi geliştirilmiştir. RFLP yöntemiyle PCR işleminin kombine edilmiş halidir. PCR-RFLP yöntemi, DNA üzerinde polimorfik bölgenin önce PCR ile

çoğaltılıp sonra RFLP yöntemi ve jel elektroforezi ile ayrımlanmasıdır. Bu yöntemde çok miktarda DNA bulundurma zorunluluğu ortadan kaldırılmıştır. Az miktarda DNA'yı PCR ile çoğaltmak ve restriksiyon enzimleriyle kesmek RFLP yönteminin dezavantajlarının giderilmesine yardımcı olmuştur (Primrose ve Twyman, 2006).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Hayvan materyali

Çalışmanın hayvan materyalini Samsun (Bafra) Kızılırmak Deltası'ndaki işletmelerde yetiştiriciliği yapılan 6-7 aylık yaştaki malaklar oluşturmuştur. Kan örnekleri toplanan mandaların kulak numarası ve cinsiyeti Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Kan örneklerine ait çalışma kodları, küpe numaraları ve cinsiyet bilgisi

Çalışma kodu	Küpe No	Cinsiyet
1	2087472	ERKEK
2	2076165	DİŞİ
3	2087472	ERKEK
4	2076937	ERKEK
5	2086624	ERKEK
6	2088410	ERKEK
7	2124450	ERKEK
8	2099752	DİŞİ
9	2099751	ERKEK
10	2036168	ERKEK
11	2076166	DİŞİ
12	KULAK KÜPESİ YOK (K1)	DİŞİ
13	2125446	ERKEK
14	2124275	DİŞİ
15	2124277	DİŞİ
16	2125721	DİŞİ
17	2125676	ERKEK
18	2125445	DİŞİ
19	2125680	ERKEK
20	2124274	DİŞİ
21	2124278	ERKEK
22	2006550	DİŞİ
23	2048569	DİŞİ
24	2125679	DİŞİ
25	2048569	DİŞİ
26	2132898	ERKEK
27	2132900	DİŞİ

28	2132984	ERKEK
29	2132985	ERKEK
30	2132899	ERKEK
31	2132982	DİŞİ
32	KULAK KÜPESİ YOK (K2)	DİŞİ
33	2132981	ERKEK
34	2132983	DİŞİ
35	KULAK KÜPESİ YOK (K3)	ERKEK

### 3.1.2 Araştırmada kullanılan cihazlar ve yardımcı malzemeler

Araştırmada kullanılan cihazların adı, markası ve yapım yeri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Araştırmada kullanılan cihazlar ve menşeileri

Cihazın adı	Markası	Yapım yeri
Soğutmalı mikrosantrifüj	Eppendorf	Hamburg, Almanya
Biophotometer	Eppendorf	Hamburg, Almanya
Elektronik mikropipet	Eppendorf	Hamburg, Almanya
Hassas terazi	KERN	Balingen, Almanya
Ultra saf su cihazı	SG Water	Barsbüttel, Almanya
PCR cihazı	BIORAD	USA
PH metre	Eutech	Singapur
Isıtıcı blok	Echotherm	USA
Jel dökümantasyon sistemi	Syngene	Cambridge, İngiltere
Yatay elektroforez sistemi	Scie-Plas	Cambridge, İngiltere
Mikrodalga fırın	BEKO	Türkiye
Derin dondurucu ve soğutucular	Bosch	Almanya

### 3.1.3 Kimyasal maddeler ve primerler

Çalışmada kullanılan agaroz; Sigma-Aldrich (Taufkirchen, ALMANYA), DNA mastır miks; TURGEN 5X PCR Master Mix (Samsun, TÜRKİYE), primer setleri; Glysen (FRANSA) ve Axypet (POLONYA), DNA özütleme kiti; peqlab (peqGOLD Blood DNA Mini Kit, ALMANYA), standart markörler; peqlab (peqGOLD O’range 100 bp ladder, ALMANYA), Biomatik (50 bp ladder, KANADA), Thermo Scientific Invitrogen (50 bp ladder, New York, ABD), yükleme tamponu (Loading buffer); Dr. Zeydanlı (İzmir, TÜRKİYE), diğer tüm çözeltiler için gerekli kimyasallar; MERCK (New Jersey, ABD), Sigma- Aldrich (Taufkirchen, Almanya) ve AMRESCO (Ohio, ABD)’dan sağlandı.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Örneklerin toplanması

Kızılırmak Deltası'nda yetiştirilen mandalara ait örnekler Bafra İlçe Tarım Müdürlüğü'nün ilgili biriminden yardım alınarak toplandı. İçerisinde antikoagülant (pıhtılaşmayı önleyici) madde (EDTA: Etilendiamintetraasetikasit veya Lityum-Heparin) bulunan, 3 ml'lik steril tüplere konuldu. Kan tüpünün üzerine örneğin alındığı bölge, işletme sahibi ve örneğin cinsiyeti kodlanarak plastik buz aküleri içeren strafor kutularda Şekil 3.1'de gösterilen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genetik-Biyoteknoloji Laboratuvarı'na ulaştırıldı.



**Şekil 3.1.** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genetik-Biyoteknoloji Laboratuvarı.

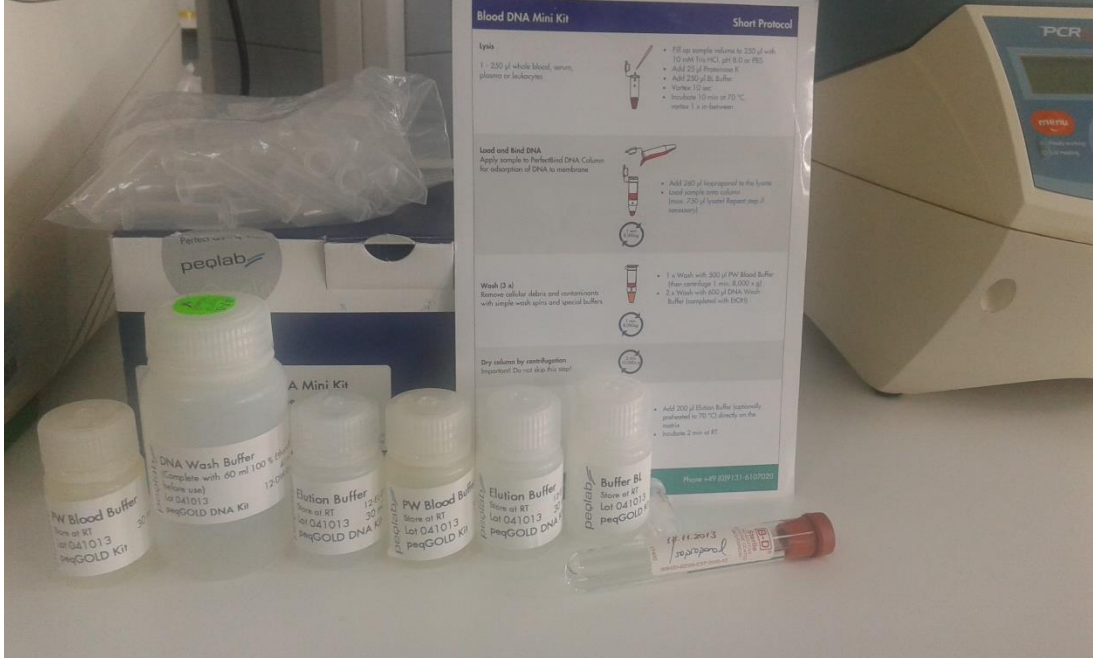
### 3.2.2 Genomik DNA'nın özütlenmesi

Elde edilmek istenen DNA'nın yüksek verim ve kalitede olması için genomik DNA'nın özütlenmesinde ticari bir kit olan peqGOLD (peqlab, ALMANYA) kullanıldı.

DNA özütleme işlemi için gerekli olan çeşitli hacimlerde (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl ve 100-1000 µl'lik) mikropipetler ve steril uçları, 1,5 ve 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri, santrifüj ve diğer gerekli malzemeler hazırlandıktan sonra kan

örnekleri derin dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra DNA özütleme işlemlerine geçildi.

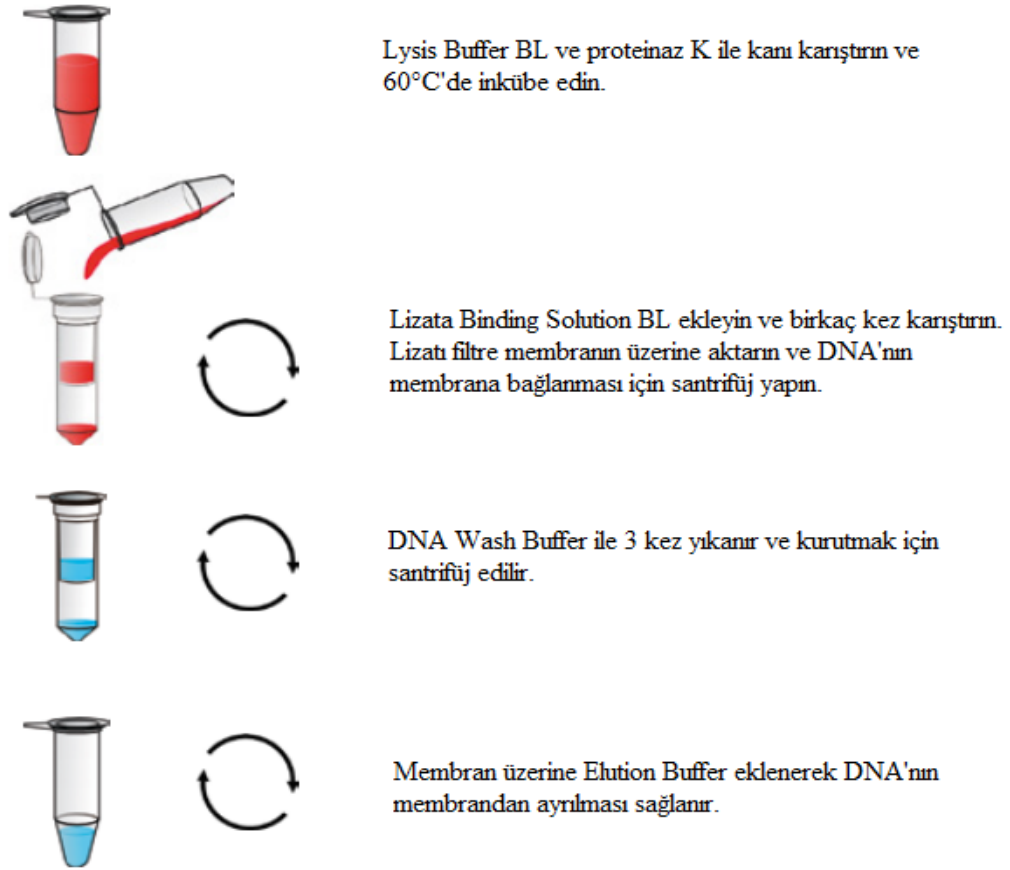
Ticari peqGOLD DNA özütleme kitinin temel çalışma prensibi santrifüj ve filtre membranlı tüplerin kullanımı esasına dayanmaktadır. peqGOLD kit içeriği Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. peqGOLD kandan DNA özütleme kiti (peqlab).

DNA özütleme işleminin ilk adımı olarak hücre parçalanması gerçekleştirildi. Bunun için oda sıcaklığında çözdürülen 50 µl kan örneği 2ml’lik santrifüj tüplerine konuldu. Üzerine 40 µl Tris-HCl (10mM), 25 µl Proteinaz-K, 250 µl BL Buffer eklenerek 10 saniye vortekslendi. 70°C’da 5 dakika inkübe edilip 1 saniye vortekslendikten sonra tekrar 70°C’da 5 dakika inkübe edildi. Bu aşamalardan sonra membranlı kolon kullanılarak DNA’nın membrana tutulması sağlandı. Bu amaçla çözeltiliye 260 µl isopropanol eklendi. Membranlı kolonlar toplama tüplerinin içine oturtulup bütün çözeltilinin membranın tam ortasına gelmesine dikkat edilerek transfer edilip, 8000g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı kısım uzaklaştırıldı. Membrana tutunan DNA’nın diğer maddelerden arındırılması için 3 adımda yıkama işlemi gerçekleştirildi. 1. yıkamada çözeltiliye 500 µl PW Blood Buffer eklenerek 8000 g’de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde biriken sıvı kısım uzaklaştırıldı. 2. yıkama işlemi için çözeltiliye 600 µl DNA Wash Buffer eklenerek 10000 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı kısım uzaklaştırıldı.

ve 2. yıkama işlemi tekrar edildi. Yıkama sonunda kolonların altındaki toplama tüpleri atılarak yerine temiz 2ml'lik mikrosantrifüj tüpleri yerleştirildi. Arındırılmış ve membrana tutunmuş olan DNA'nın membrandan bu tüplere alınması için membranın tam ortasına gelecek şekilde 200 µl Elution Buffer eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 5000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın kolondan tüplere indirilmesi sağlandı. Toplanan DNA'lar kısa süreli kullanım için +4°C'da, uzun süreli kullanımlar için -20°C'da saklandı. Şekil 3.3 'de bu işlemin kısa bir özeti gösterilmektedir.



Şekil 3.3. peqGOLD kandan DNA özütlenmesi işleminin kısa bir özeti (URL-3).

### 3.2.3 Çalışmada kullanılan primerlerin seçimi

Çalışmada Otman ve diğ. (2011) tarafından bildirilen primer çiftleri kullanıldı. Bu primerler ile *PRL*'nin 294 bç'lik bir bölgesinin, *CSN3*'ün 530 bç'lik bir bölgesinin, *PIT-1*'in 451 bç'lik bir bölgesinin çoğaltılabileceği bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve dizilişleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Çalışmada kullanılan primerlerin çalışma kodu, orjinal kodu, ileri ve geri primer dizilişi

Kodu	Orijinal adı		Primer dizilişi
P01	<i>PRL</i>	İleri (Forward)	CCAAATCCACTGAATTATGCTT
		Tersine (Reverse)	ACAGAAATCACCTCTCTCATTC
P02	<i>CSN3</i>	İleri (Forward)	ATAGCCAAATATATCCCAATTCAGT
		Tersine (Reverse)	TTTATTAATAAGTCCATGAATCTTG
P03	<i>PIT-1</i>	İleri (Forward)	AAACCATCATCTCCCTTCTT
		Tersine (Reverse)	AATGTACAATGTGCCTTCTGAG

### 3.2.4 PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyonlar 4 µl kalıp DNA (tDNA) ve 16 µl karışım (*reaction mix*) olacak şekilde 20 µl hacimde ince çepirli *RNase* ve *DNase-free* PCR tüplerinde gerçekleştirildi. PCR uygulamaları Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Cihazın kapak sıcaklığı 110 °C ve blok sıcaklığı 94 °C olarak ayarlandı. PCR'da kullanılan moleküler biyoloji hassasiyetindeki reaktiflerin yoğunluk ve miktarları Çizelge 3.4'de verilmiştir. *PRL*, *PIT-1*, *CSN3* genleri için uygulanan PCR termal döngü düzenleri Çizelge 3.5'de verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** PCR için gerekli reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Yoğunluk	Miktar
tDNA (kalıp DNA'lar)	10 ng/ µl	4 µl
İleri (Forward) primer	2,5 µM	0,5 µl
Geri (Reverse) primer	2,5 µM	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		11 µl
PCR Master Mix	5X	4 µl
	Toplam	20 µl

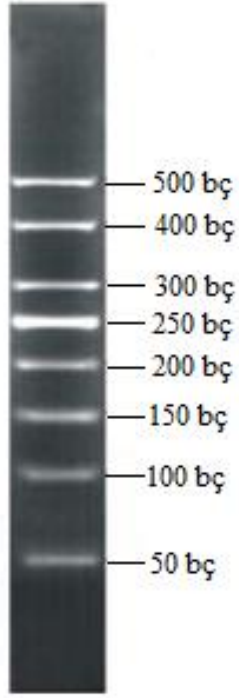
**Çizelge 3.5.** *PRL, PIT-1, CSN3* genleri için uygulanan PCR termal döngü düzenleri

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Öncül Denatürasyon	94	5 dakika	-
Denatürasyon	94	1 dakika	
Bağlanma (Annealing) ( <i>PIT-1, CSN3, PRL,</i> )	56-57-58	2 dakika	30
Uzama (Extension)	72	2 dakika	
Son uzama (Final extension)	72	10 dakika	-
Reaksiyon sonrası saklama	4		

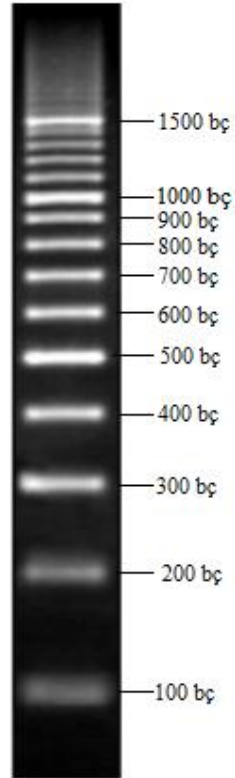
### 3.2.5 Agaroz jel elektroforezi yöntemi ve dökümantasyon

PCR işleminden sonra ürünlerin bant görüntülerinin elde edilebilmesi için elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez işlemi elektroforez tankı içerisinde gerçekleştirildi ve tank içine elektrolit çözelti (Sodyum hidroksit borik asit tamponu-SB) konuldu. Elektroforez uygulamasından hemen önce hazırlanan ve tank içerisine konulan agaroz jelin kuyucuklarına belirli oranlarla yükleme boyası ile karıştırılan PCR ürünleri (her kuyucuk için 2µl yükleme tamponu ve 5 µl PCR ürünü) yüklenerek elektrik akımına maruz bırakıldı.

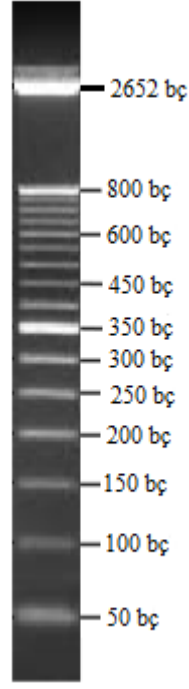
PCR sonucu elde edilen replikonların moleküler büyüklüklerinin tespitinde Şekil 3.4'de gösterilen Biomatik 50 bç- 500 bç standart markörü, Şekil 3.5'de gösterilen peqGOLD 100 bç-1500 bç standart markörü ve Şekil 3.6'da Invitrogen 50 bç-2652 bç standart markörü kullanıldı.



Şekil 3.4. Biomatik 50 bç-500 bç standart markör.



Şekil 3.5. peqGOLD O'range 100 bç-1500 bç standart markör.



**Şekil 3.6.** Invitrogen 50 bç-2652 bç standart markör.

Jel üzerinden oluşan bantlar Syngene (Cambridge, İngiltere) marka jel dokümantasyon sistemi ile yukarıda belirtilen standart markörler referans alınarak değerlendirmelerin yapılabilmesi için elektronik ortama aktarıldı.

### **3.2.6 Sodyum hidroksit – borik asit tamponu (SB)**

Bu çalışmada elektrolit çözeltisi olarak SB (sodyum hidroksit- borik asit) çözeltisi kullanıldı. Çözelti hazırlanışında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.6.'da verilmiştir. Çözelti 1X yoğunlukta ve pH 8.0-8.5 aralığında hazırlanarak son hacmi distile su kullanılarak 1 litreye tamamlandı. Çözeltinin içerisinde bulunan kimyasalların daha iyi çözünmesi için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözelti içerisinde çözünmeyen madde kalmaması için yüksek sıcaklıkta bekletildi. Çözünmeyen tuz partiküllerinin jel elektroforezi işlemi sırasında DNA'yı agaroz jelden ayırıp tank içerisindeki tampona karıştırmasını önlemek için çözelti 2 kez filtre membrandan geçirildi. Son olarak bu çözelti hem elektroforez tankına konuldu hem de agaroz jel hazırlanmasında kullanıldı.

**Çizelge 3.6. SB tamponu için kullanılan kimyasallar**

1X'lik SB Tampon çözeltisi (1Litrelilik)	Miktar
Sodyum hidroksit	0.4 g
Borik asit	2.20 g
Saf su	1 L'ye tamamlanır

### **3.2.7 Agaroz jelin hazırlanması**

PCR işleminin hemen ardından DNA fragmentlerinin ayrımı için agaroz jel kullanıldı. Bu amaçla %2'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanması için 8 g agaroz bir beher içerisine aktarılıp SB tamponuyla üzeri 400 ml'ye tamamlandı. Bu karışım mikrodalga fırında tamamen çözünüp homojen bir görüntü elde edilene kadar kaynatıldı. İşlem sırasında 15-20 saniye aralıklarla çözelti çıkarılıp yavaşça karıştırıldı. Kaynama işlemi tamamlandıktan sonra agaroz jel soğumaya bırakıldı. Jelin sıcaklığı 50-55°C olduğu sırada DNA'ya bağlanarak UV ışık altında bantların görüntülenmesini sağlayan Etidyum bromürden (EtBr) 16µl (10mg/l) eklendi. Agaroz jel yeterince soğuduğunda jel kasetine dökülüp 2 adet 26 kuyucuklu tarak kasete yerleştirildi. Bu aşamada taraklara yakın kısımlarda bulunan hava kabarcıkları kasetin kenarlarına doğru çekilip taraklardan uzaklaştırıldı. Agaroz jelin polimerizasyonu gerçekleştikten sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılıp jel kaseti elektroforez tankının içine yerleştirildi. Önceden hazırlanan 1X SB elektrolit çözeltisi jelin üst kısmını kapatana kadar elektroforez tankına eklendi.

### **3.2.8 Jelin yüklenmesi ve örneklerin yürütülmesi**

PCR işleminden sonra -20°C'da saklanan PCR ürünlerinin her birinden sırasıyla 5 µl alınarak 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplere konuldu. Üzerlerine 2 µl yükleme tamponu eklendi. Toplam 7 µl hacime ulaşan bu karışım jel kasetindeki kuyucuklardan ilki ve sonuncusu markörlerin yüklenmesi için boş bırakılıp baştan başlanarak sırasıyla yüklendi. Markörler için ayrılan her kuyucuğa 1 µl standart markör yüklendi ve örnekler %2'lik jelde (20x30cm, 200 V, 40 dakika) yürütüldü.

### **3.2.9 Restriksiyon enzimleri ile kesim**

Çalışmada Thermo Scientific (ABD) marka HindIII, RsaI ve HinfI restriksiyon enzimleri kullanıldı. Kesim işlemi için kullanılan kimyasallar ve kullanım miktarları Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Kesim işleminde kullanılan reaktifler ve kullanım miktarları

Reaktif	Miktar
Su	: 17 µl
10X FastDigest Green Buffer	: 2 µl
PCR ürünü	: 10 µl
FastDigest Enzyme	: 1 µl

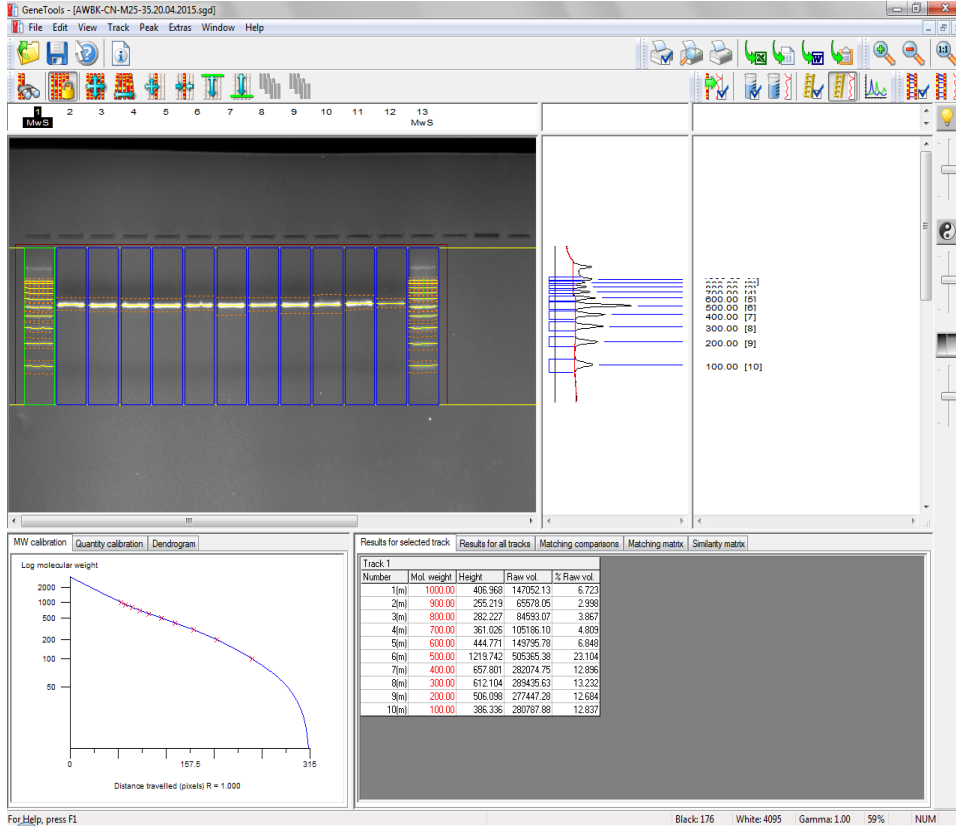
Bütün bileşenler bir araya getirildikten sonra 37°C 'da 20 dakika, sonrasında 65°C 'da 10 dakika inkübe edildi. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra allelik polimorfizm durumunu belirlemek için kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütüldü. Elde edilen sonuçlar SYNGENE Jel Görüntüleme sistemi yardımıyla fotoğraflandı. Elde edilen jel görüntüleri fragment büyüklüklerinin tam olarak belirlenmesini sağlayan görüntüleme sisteminin yazılımı Syngene-GeneTools programı yardımıyla analiz edildi. Kullanılan restriksiyon enzimleri, baz dizilişleri ve optimum çalıştıkları sıcaklık değeri Çizelge 3.8 'da verilmiştir.

**Çizelge 3.8.** Restriksiyon enzimlerinin kesim noktası ve çalıştığı sıcaklık.

Kullanılan kesim enzimleri	Kesim noktası	Çalıştığı sıcaklık	İnkübasyon süresi	İnaktif edici sıcaklık	İnaktifleşme süresi
RsaI	5'-GT↓AC-3' 3'-CA↑TG-5'	37°C	20 dakika	65°C	10 dakika
HindIII	5'-A↓AGCTT-3' 3'-TTCGA↑A-5'	37°C	20 dakika	65°C	10 dakika
HinfI	5'-G↓ANTC-3' 3'-CTNA↑G-5'	37°C	20 dakika	65°C	10 dakika

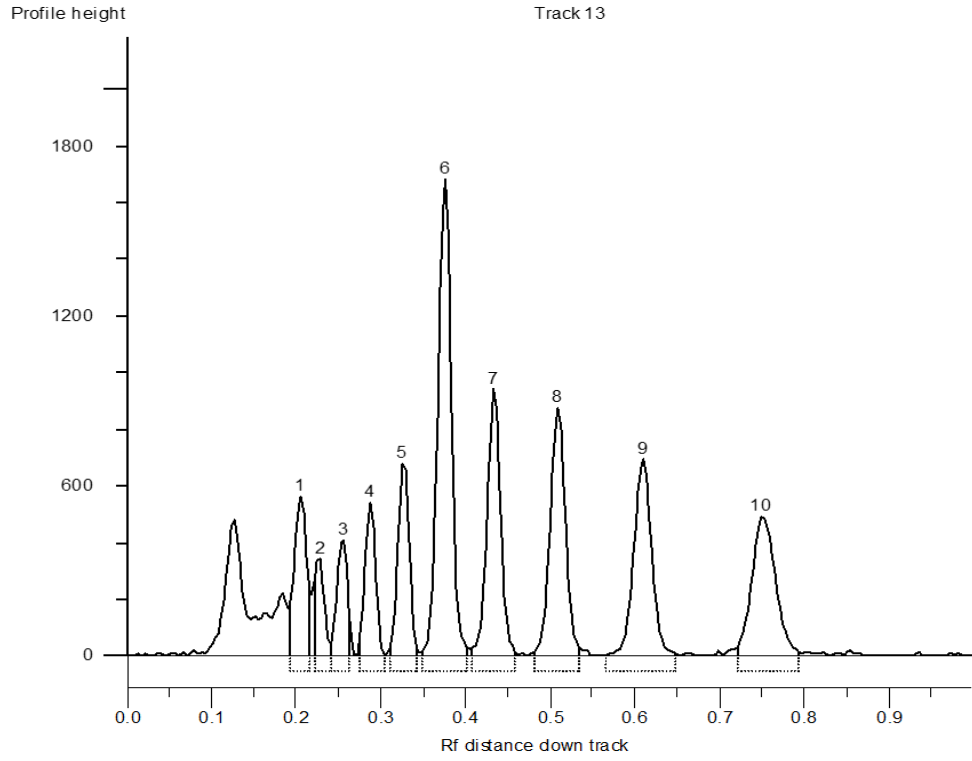
### 3.2.10 Jellerin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Jellerin görüntülenmesi işlemi Syngene (Cambridge, İngiltere) marka jel dokümantasyon cihazında yapıldı. Jelin fotoğrafının çekilmesini takiben bant büyüklüklerinin belirlenmesi işlemine geçildi. Bu aşamada cihaz ile birlikte verilen Syngene-GeneTools programı kullanıldı. Bu program yardımıyla elde edilen PCR ürünlerinin baz çifti (bç) cinsinden moleküler büyüklükleri çıkarıldı. Jelin yürütülmesi sonucu elektroforetik olarak ayrımlanan bantların moleküler büyüklüklerine göre değerlendirilmesi işlemi Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.7.** Jelin elektroforetik ayrışması ile oluşan bantların Syngene-GeneTools programı yardımıyla moleküler büyüklüklerine göre değerlendirilmesi.

Programın bant büyüklüklerini tanımlaması için öncelikle standart markörlere ait bantların büyüklükleri tanımlandı. Yürütme sonucu elde edilen bantların büyüklükleri program tarafından standart markör piklerine göre hesaplandı. Şekil 3.8’de standart markör bant piklerini gösteren grafik ve tanım çizelgesi verilmiştir.



<b>Track 1</b>				
<b>Number</b>	<b>Mol. weight</b>	<b>Height</b>	<b>Raw vol.</b>	<b>% Raw vol.</b>
1(m)	1000.00	406.968	147052.13	6.723
2(m)	900.00	255.219	65578.05	2.998
3(m)	800.00	282.227	84593.07	3.867
4(m)	700.00	361.026	105186.10	4.809
5(m)	600.00	444.771	149795.78	6.848
6(m)	500.00	1219.742	505365.38	23.104
7(m)	400.00	657.801	282074.75	12.896
8(m)	300.00	612.104	289435.63	13.232
9(m)	200.00	506.098	277447.28	12.684
10(m)	100.00	386.336	280787.88	12.837

Şekil 3.8. Standart markör bant piklerini gösteren grafik ve tanım çizelgesi örneği.

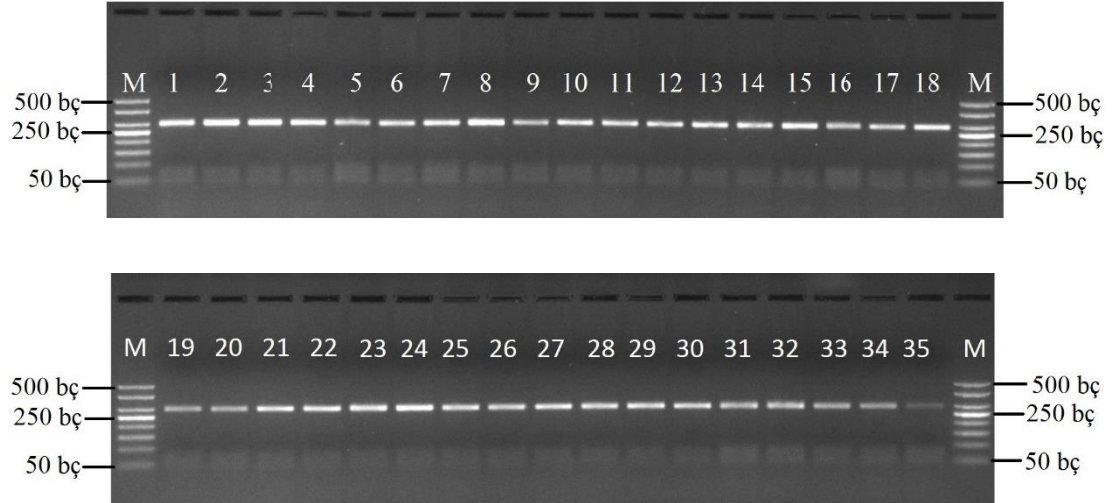


## 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

### 4.1 Araştırma Bulguları

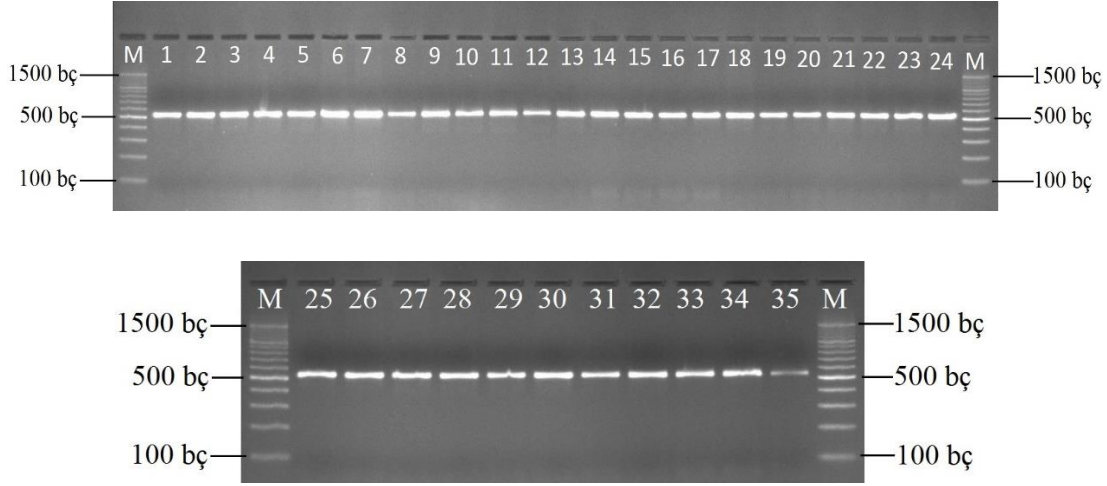
#### 4.1.1 Anadolu mandası popülasyonunda *PRL*, *CSN3* ve *PIT-1* genlerinin PCR amplikon büyüklükleri

*PRL* gen bölgesinin çoğaltılması için primer tablosunda gösterilen P01 kodlu primer çifti kullanıldı. Elde edilen sonuçlarda amplikon büyüklükleri 308 bç-332 bç arasında hesaplandı. Şekil 4.1’de manda kan örneklerini temsilen kullanılan çalışma kodları ile kodlanan 1-35 arasındaki PCR amplikonları gösterilmiştir.



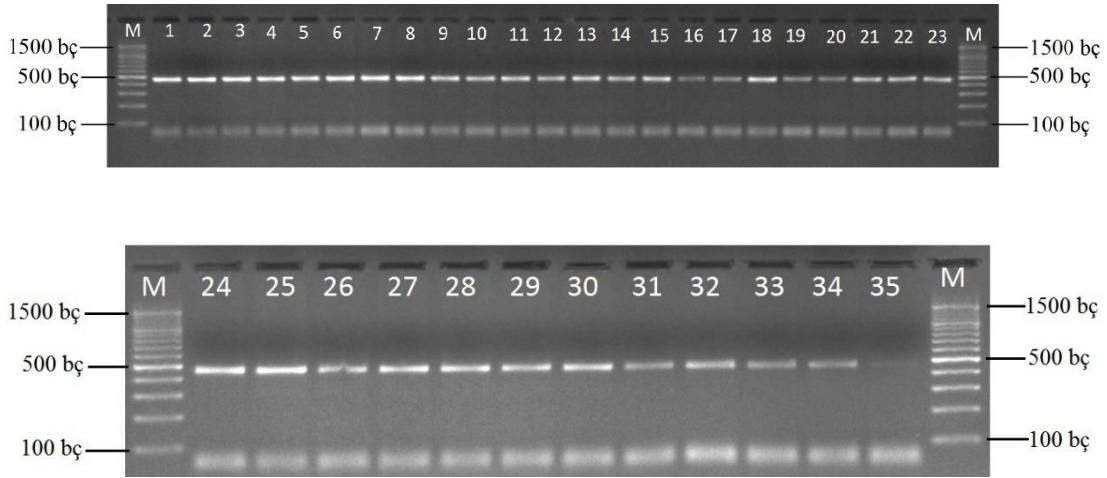
**Şekil 4.1.** Anadolu mandası popülasyonunda *PRL* gen bölgesinden elde edilen amplikonlar.

*CSN3* gen bölgesinin çoğaltılması için primer tablosunda gösterilen P02 kodlu primer çifti kullanıldı. Elde edilen sonuçlarda amplikon büyüklükleri 519 bç-556 bç arasında hesaplandı. Şekil 4.2’de manda kan örneklerini temsilen kullanılan çalışma kodları ile kodlanan 1-35 arasındaki PCR amplikonları gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** Anadolu mandası popülasyonunda *CSN3* gen bölgesinden elde edilen ampliconlar.

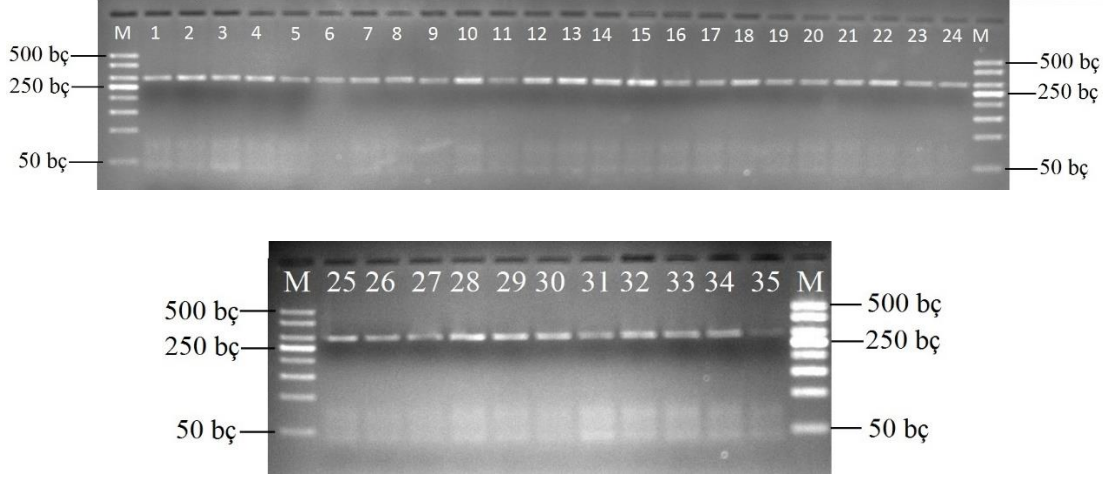
*PIT-1* gen bölgesinin çoğaltılması için primer tablosunda gösterilen P03 kodlu primer çifti kullanıldı. Elde edilen sonuçlarda amplicon büyüklükleri 451 bç-482 bç arasında hesaplandı. Şekil 4.3’de manda kan örneklerini temsilen kullanılan çalışma kodları ile kodlanan 1-35 arasındaki PCR ampliconları gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** Anadolu mandası popülasyonunda *PIT-1* gen bölgesinden elde edilen ampliconlar.

#### 4.1.2 Anadolu mandası popülasyonunda *PRL* ’nin allelik durumu

Anadolu mandası örneklerinin *PRL* PCR ampliconları *RsaI* kesim enzimi ile kesildikten sonra jel elektroforez sisteminde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.4’de verilmiştir.

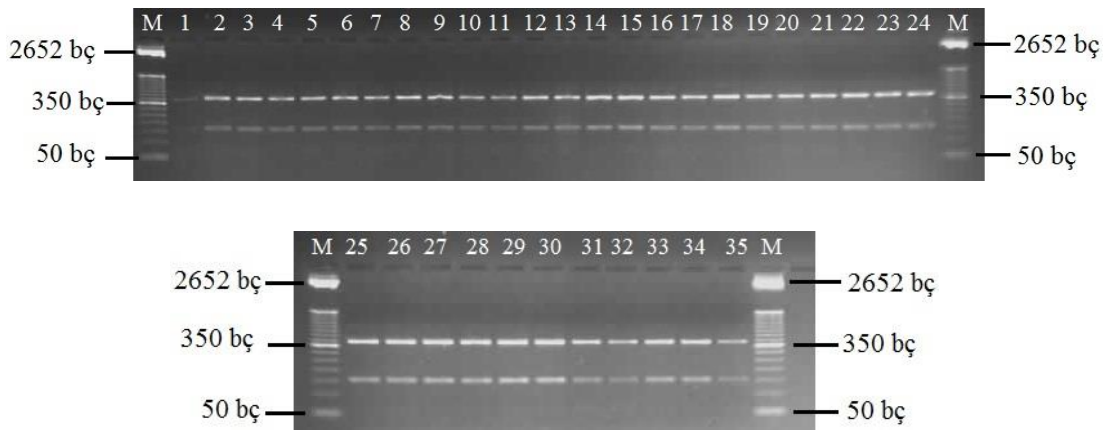


**Şekil 4.4.** Anadolu mandası popülasyonunda *PRL* gen bölgesinin *RsaI* enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler.

Othman ve diğ. (2011) 'nin ve Khaizaran ve diğ. (2009) 'nin yaptıkları çalışmalar sonucunda; *PRL* gen bölgesinde herhangi bir kesim gerçekleşmemesinin GG genotipini yansıttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da *PRL* gen bölgesinde kesim gerçekleşmemiştir ve bu popülasyon için *PRL*'nin GG genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.

#### 4.1.3 Anadolu mandası popülasyonunda *CSN3* geninin allelik durumu

Anadolu mandası örneklerinin *CSN3* PCR amplikonları *HindIII* kesim enzimi ile kesilerek jel elektroforez sisteminde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



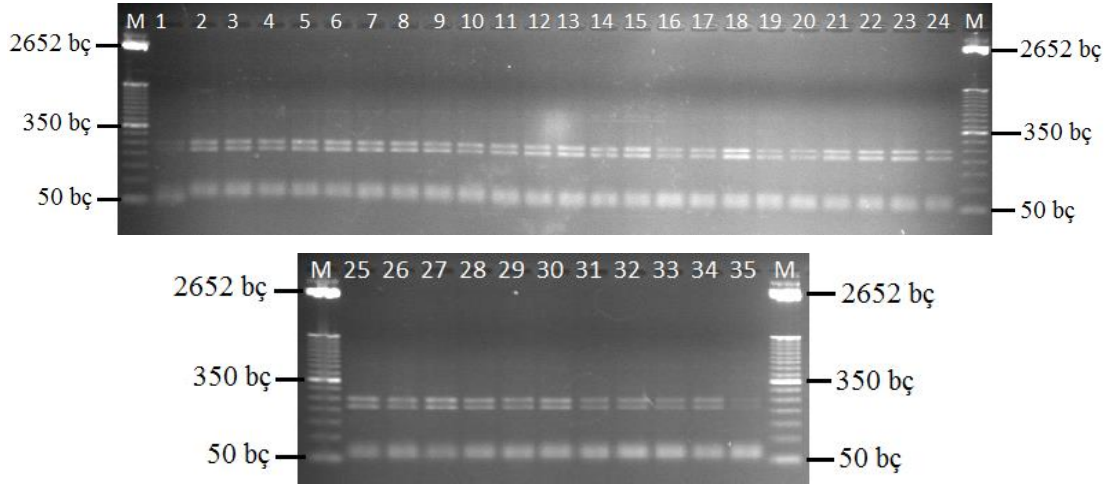
**Şekil 4.5.** Anadolu mandası popülasyonunda *CSN3* gen bölgesinin *HindIII* enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler.

Çalışılan genotiplerin *CSN3* gen bölgelerinde bir kesim gerçekleşti ve fragment büyüklükleri 1. allel için 373 bp-405 bp, 2. allel için 142 bp-162 bp arasında

hesaplanmıştır. Othman ve diğ. (2011) 'nin ve Khaizaran ve diğ. (2009) 'nin yaptıkları çalışmalar sonucunda; *CSN3* gen bölgesinde bir kesim sonucunda iki bant oluşmasının BB genotipini yansıttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da *CSN3* gen bölgesinde bir kesim sonucu iki bant meydana gelmiştir ve bu popülasyon için *CSN3*'ün BB genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.

#### 4.1.4 Anadolu mandası popülasyonunda *PIT-1* geninin allelik durumu

Anadolu mandası örneklerinin *PIT-1* PCR ampliconları *Hinf*I kesim enzimi ile kesilerek jel elektroforez sisteminde yürütüldü. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



**Şekil 4. 6.** Anadolu mandası popülasyonunda *PIT-1* gen bölgesinin *Hinf*I enzimi ile kesim sonucu oluşan fragmentler.

Çalışılan örneklerin *PIT-1* gen bölgelerinde bir kesim gerçekleşmiştir ve fragment büyüklükleri 1. allel için 245 bç-265 bç, 2. allel için 214 bç-233 bç hesaplanmıştır. Othman ve diğ. (2011) 'nin ve Khaizaran ve diğ. (2009) 'nin yaptıkları çalışmalar sonucunda; *PIT-1* gen bölgesinde bir kesim sonucunda iki bant oluşmasının BB genotipini yansıttığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da *PIT-1* gen bölgesinde bir kesim sonucu iki bant meydana gelmiştir ve bu popülasyon için *PIT-1*'in BB genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.

## 4.2 Tartışma

Sütçü ırklarda *PRL* üzerinde 8398. nükleotid pozisyonunda sessiz mutasyon ile guanin bazının adenin bazıyla yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen SNP *RsaI* kesim enzimi ile tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda 294 bç'lik kesilmemiş fragmentler GG homozigot genotipini, 162 bç ve 132 bç'lik iki fragment AA homozigot genotipini, kesilmemiş 294 bç ile kesilmiş olan 162 bç-132 bç'lik üç fragment AG heterozigot genotipini gösterdiğini ifade etmişlerdir ( Othman ve diğ., 2011, Khaizaran ve Al-Razem, 2014). Bu bulgular sonucunda AA allelinin en yüksek süt verimine sahip olduğunu ve G allelinin süt ve süt proteini verimi için yetersiz olduğunu bildirmişlerdir (Othman ve diğ., 2011; Khaizaran ve Al-Razem, 2014). Mısır mandalarında yapılan çalışmada yüksek frekansta GG homozigot genotipini tespit etmişler ve bu genotiplerde yağ oranının en yüksek değere sahip olduğunu bildirmişlerdir (Othman ve diğ., 2011). Bu çalışmada incelenen örneklerde *PRL* için kesim gerçekteşmemesi sonucunda P01 primer seti ile çoğaltılan gen bölgesi için *RsaI*'in tanımlayabileceği bir SNP'nin olmadığını bu yüzden çalışılan tüm örneklerin GG homozigot genotipte olduğunu göstermektedir.

*CSN3* tiplerinden *CSN3 A* tipi 148. nükleotid pozisyonunda bulunan adenin bazının sitozin bazı ile yer değiştirmesi sonucunda *CSN3 B* tipi meydana gelmekte ve bu SNP *HindIII* kesim enzimi için bir kesim bölgesi oluşturmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda 530 bç'lik kesilmemiş bantlar AA homozigot genotipini, 370 bç ve 160 bç'lik iki bant BB homozigot genotipini, kesilmemiş 530 bç ile kesilmiş olan 370 bç-160 bç'lik üç bant AB heterozigot genotipini gösterdiğini ifade etmişlerdir (Othman ve diğ., 2011; Khaizaran ve Al-Razem, 2014). Bu gen için tüm Mısır mandalarında BB homozigot genotipini tespit etmişlerdir ve BB genotipinin peynir veriminin AA genotipinden %10 daha fazla olduğunu belirtilerek ıslah açısından B allelinin öncül tercih olmasının önemli olduğunu bildirmişlerdir (Othman ve diğ., 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise BB genotipinin düşük yağ ve düşük süt proteini içerdiğini tespit ederek AA genotipinin bunun aksine bir özelliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (Beata ve diğ., 2008).

Çalışılan örneklerde *CSN3* P02 primer seti ile çoğaltılıp *HindIII* kesim enzimiyle kesilmiştir ve tüm manda örneklerinde tek bir kesim bölgesi tanımlanmıştır. Elde edilen bulgular literatür bulgularıyla örtüşmekte olup tüm örneklerin BB homozigot genotipine sahip olduğu tespit edilmiştir.

*PIT-1* üzerinde bulunan polimorfizmlerden biri de 6. ekson üzerinde bulunan guanin bazının adenin bazı ile yerdeğiştirmesi sonucunda oluşan SNP'dir. Bu polimorfizm HinfI kesim enzimi için uygun bir bölge oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda 451 bç'lik kesilmemiş bantlar AA homozigot genotipini, 244 bç ve 207 bç'lik iki bant BB homozigot genotipini, kesilmemiş 451bç ile kesilmiş olan 244 bç-207 bç'lik üç bant AB heterozigot genotipini ifade ettiği belirtilmektedir (Othman ve diğ., 2011, Khaizaran ve Al-Razem, 2014). Yapılan bir çalışmada *PIT-1* için HinfI kesim enzimi kullanarak Mısır mandalarında allelik polimorfizme bakmışlardır. Çalışılan örneklerde BB genotipini tespit etmişlerdir. Yüksek süt verimi için AA allelinin görölmesinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. AA genotipinin yağ yüzdesinin düşük olması ve süt ve süt proteinlerinin yüksek olması nedeniyle üstün olduğunu belirtmişlerdir. BB genotipinin ise süt verimi ve protein içeriğinin düşük olduğunu ve yağ yüzdesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Othman ve diğ., 2011).

Bu çalışmada *PIT-1* P03 primer seti ile çoğaltılıp HinfI kesim enzimiyle kesilen örneklerin sonucunda tüm örneklerde tek bir kesim bölgesi tespit edilmiş, bu nedenle çalışılan tüm örneklerin BB genotipinde olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada süt verimi ve ürüne işlemede önemli olan özellikler üzerine etkili olduğu bildirilen genlerin ilgili lokusları incelenmiştir. Elde edilen bulgular popölasyonun incelenen gen bölgeleri bakımından homozigotluk derecesinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Çalışılan lokuslar, ifade edildiği gibi, polimorfizm düzeyi yüksek, popölasyondaki genel genetik çeşitliliği değerlendirmek için uygun lokuslar değildir. Sadece süt verimi ve sütün kalitesi ile ilgili bazı gen bölgelerindeki genetik polimorfizm düzeylerinin ortaya çıkarılmasında kullanılan lokuslardır. Çalıştığımız popölasyonda bu genler bakımından homozigotluğun bu kadar yüksek çıkmasının nedeni incelenen hayvan sayısının sınırlı olmasından kaynaklanabildiği düşünölmüştür. Yine de bu çalışmada elde edilen bulgular bölgedeki manda popölasyonunun üzerinde durulan genler bakımından homozigotlaştığına dair bir ilk uyarı olarak değerlendirilmelidir.

Yapılan moleküler analizler açısından bakıldığında allellerin fragment büyüklüklerinin tam ve doğru olarak belirlenebilmesi için DNA dizileme işlemlerinin yapılması allelik yapının kesin olarak ortaya konulabilmesi açısından gereklidir. Bölgedeki manda popölasyonunun genetik bir darboğaza süröklenmesini önlemek, uygulanacak ışlah programları için gerekli genetik çeşitliliği ortaya çıkarabilmek için

daha geniş çaplı, daha fazla hayvan ve markör kullanılarak derinlemesine bir popülasyon tarama çalışmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Elde edilen bulgular, çalışılan manda popülasyonunun *PRL* ve *PIT-1* bakımından sadece istenmeyen allellere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum ilgili genlerin istenen allellerinin bölgedeki mandalarda tespit edilerek bu allelleri taşıyanların damızlık olarak seçilmesi gerekliliğini işaret etmektedir. Diğer yandan çalışılan popülasyonun sütün ürüne işlenmesi ile ilgili *CSN3* bakımından ise ideal alleli taşıdığı belirlenmiştir. Bu durum da sütün ürüne işlenmesi bakımından yapılacak ıslah çalışması açısından damızlık seçimi noktasında bu hayvanların doğrudan kullanılabilceğini göstermektedir.



## 5. KAYNAKLAR

- Alfonso, E., Rojas, R., Herrera, J. G., Ortega, M. E., Lemus, C., Cortez, C., Ruiz, J., Pinto, R., Gómez, H., 2012. Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle, *African Journal of Biotechnology*, 11(29), 7338-7343.
- Atasever, S., Erdem, H., 2008. Manda Yetiştiriciliği ve Türkiye'deki Geleceği, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 59-64.
- Barlowska, J., Szwajkowska, M., Litwinczuk, Z., Król, J. 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production, *COMPR. REV. FOOD SCI. F.*, 10, 291-302.
- Barroso, A., Dunner, S., Canon, J., 1998. Technical note: detection of bovine Kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), *J. Anim. Sci.*, 76, 1535-1538.
- Beata, S., Wojciech, N., Ewa, W., 2008. Relations between Kappa-Casein Polymorphism (CSN3) and milk performance traits in Heifer cows, *J. Cent. Eur. Agric.*, 9, 641-644.
- Brym, P., Kaminski, S., Wojcik, E., 2005. Nucleotide sequence polymorphisms with exon 4 of bovine prolactin gene and its association with milk performance traits, *J. Appl. Genet.*, 46(2), 179- 185.
- Can, Ö., Taş, B., 2012. Ramsar Alanı İçinde Yer Alan Cernek Gölü ve Sulak Alanının (Kızılırmak Deltası, Samsun) Ekolojik ve Sosyo-Ekonomik Önemi, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 5(2), 1-11.
- Dayem, A. M. H. A., Mahmoud, K. Gh. M., Nawito, M. F., Ayoub, M. M., Darwish S. F., 2009. Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls, *Livestock Science*, 122, 286-289.
- Dybus, A., Szatkowska, I., Czerniawska-Platkowska, E., Grzesiak, W., Wojcik, J., Rzewucka, E., Zych, S., 2004. PIT1-HinfI gene polymorphism and its associations with milk production traits in Polish Black-and-White cattle, *Aech. Tierz.*, 47, 557-563.
- Ertuğrul, M., Akman, N., Dellal, G., Goncagül, T. 2000. Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması Ve Türkiye Hayvan Gen Kaynakları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi*, Ankara, Türkiye, 17-21 Ocak, s, 285- 300.
- Feligrini, M., Vlaco, S., Curik, V., C., Parma, P., Greppi, G., and Enne, G., 2005. A single nucleotide polymorphism in the sheep k-casein coding region, *Journal of Dairy Research*, 72, 317-321.
- Gedik, Y., 2009. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Alaca Sığır Popülasyonlarından Beta-Laktoglobulin ve Kappa-Kazein Genotiplerinin PCR-RFLP Yöntemi Kullanılarak

- Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gerencs, J., Barta, E., Boa, S., Kastanis, P., Bosze, Z., Whitelaw, C.B., 2002. Comparative analysis on the structural features of the 5 flanking region of k-casein genes from six different species, *Genet. Sel. Evol*, 34, 117-128.
- Javanmard, A., Asadzadeh, N., Banabazi, M. H., Tavakolian, J., 2005. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary-specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP, *Iranian Journal Of Biotechnology*, 3, 2.
- Kaminski, S., 1996. Molecular nature and application in dairy cattle breeding Bovine kappa-casein (CASK) gene, *J. Appl. Genet*, 37, 179-196.
- Kaminski, S., Cieslinska, A., Kostyra, E., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health, *J Appl Genet*, 48(3), 189–198.
- Karp, G., 2008. *Restriction Endonucleas Technology*, Arber, W., Nathans, D., Smith, O. H., Mitchell, P., 7<sup>th</sup> Ed, Cell and Moleküler Biology, Van Hoffmann Press, USA.
- Khaizaran, Z. A., Al-Razem, F., 2014. Analysis of selected milk traits in Palestinian Holstein- Friesian cattle in relation to genetic polymorphism, *Journal of Cell and Animal Biology*, 8(5),74-85.
- Lin, C. Y., Sabour, M. P., Lee, A. J., 1992. Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: a review, *Anim. Breed. Abstr*, 60, 1-10.
- Lü, A., Hu, X., Chen, H., Jiang, J., Zhang, C., Xu, H., Gao, X., 2010. Single nucleotide polymorphisms in bovine PRL gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins, *Mol Biol Rep*, 37,547–551.
- Martin, P., Grosclaude, F., 1993. Improvement of milk protein quality by gene technology, *Livest. Prod. Sci*, 35, 95-115.
- Masina, P., Rando, A., Di Gregorio, P., Cosenza, G., Mancusi, A., 2007. Water buffalo kappa-casein gene sequence, *Ital. J. Anim. ScI.*, 6, (2), 353-355.
- McLean, D. M., 1987. Influence of milk protein variants on milk composition, yield and cheese making properties, *Anim. Genet.*, 18, 100-102.
- Mercan L., 2010. Yerli Tavuk Genotiplerinin Ticari Genotipler İle Olan Genetik Farklılığının SSR Yöntemi ile Analizi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Mitra, A., Schlee, P., Krause, I., Blusch, J., Werner, T., Balakrishnan, C. R., Pirchner, F., 1998. Kappa-casein polymorphisms in Indian dairy cattle and buffalo: a new genetic variant in buffalo, *Anim. Biotechnol.*, 9, 81-87.
- Nanda, A. S. and Nakao, T., 2003. Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus, *Animal Science Journal*, 74, 443–455.
- Otaviano, A.R., Tonhati, H., Sena, J.A.D., Munoz, F.C. 2005. Kappa-casein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*), *Genet. Mol. Biol.*, 28(2), 237-241.

- Othman, O. E., Zayed, F. A., El Gawead, A. A., El-Rahman, M. R. A., 2011. Genetic polymorphism of three genes associated with milk trait in Egyptian buffalo, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 9, 97-102.
- Özşensoy, Y., Kurar, E., 2012. Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(2), 11-19.
- Palladino, M. A., Thieman, W. J., 2013. *Restriksiyon endonükleazlar*, Editör: Tekeoğlu, M., Özyörük, F., Biyoteknolojiye Giriş, 3. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 59.
- Pinder, S.J., Perry, B.N., Skindmore, C.J., Savva, D., 1991. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use of the polymerase chain reaction, *Animal Genetics*, 22, 11-20.
- Primrose, S. B., Twyman, R. M., 2006. Principles of Gene Manipulation and Genomics, 7<sup>th</sup> Ed., *Blackwell Publishing*, Malden, USA.
- Ren, D., Miao, S., Chen, Y., Zou, C., Liang, X., and Liu, J., 2011. Genotyping of the k-casein and  $\beta$ -lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP, *J. Genet*, 90, e1–e5.
- Şahin, Ş., Öner, Y., Elmacı, C., 2013. Esmer ve Siyah Alaca ırkı sığırlarda bazı ekonomik özellikler ile ilişkili gen bölgelerinin PCR-RFLP tekniği ile incelenmesi, *Tarım Bilimleri Dergisi*, Ankara, Türkiye.
- Tang, L., Yang, D., Ouyang, W., Zhang, L., Lan, X., Zhang, C., Zhang, R., Zhang, A., Zhang, L., Chen, H., 2012. Association of polymorphisms in the PIT-1 intron 5 with body measurements in Chinese Cattle, *Afr. J. Biotech*, 11(42), 9906-9910.
- Thomas, C. S., 2008. *Efficient dairy buffalo production*, DeLaval International AB, Tumba, Sweden.
- URL-1: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E> (Ziyaret Tarihi: 25 Mayıs 2015).
- URL-2: <http://tuikapp.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul> (Ziyaret Tarihi: 1 Haziran 2015)
- URL-3: <http://www.peqlab.de/wcms/en/pdf/12-3484-00.pdf> (Ziyaret Tarihi: 24 Mayıs 2015).
- Yahyaoui, M.H., Angiolillo, A., Pilla, F., Sanchez, A., and Folch, J.M. 2003. Characterization and genotyping of the caprine  $\kappa$ -Casein variants, *Journal Dairy Science*, 86, 2715-2720.



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı :** Emine TOPARSLAN

**Doğum Yeri ve Tarihi :** SELÇUKLU / 01.01.1990

**Adres :** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji  
Bölümü

**E-Posta :** eminetoparslan@gmail.com

**Lisans :** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji  
Bölümü



