



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA LEPTİN GENİ Arg25Cys
MUTASYONUNUN PCR-RFLP METODU İLE
BELİRLENMESİ**

Çiğdem BENGİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAHRAMANMARAŞ
Şubat-2010**

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA LEPTİN GENİ Arg25Cys MUTASYONUNUN
PCR-RFLP METODU İLE BELİRLENMESİ**

Çiğdem BENGİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kod No :

Bu Tez 12/02/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oy Birliği/~~Oy Çoğunluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Doç. Dr. Ali KAYGISIZ
DANIŞMAN

Prof. Dr . Metin DIĞRAK
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. İsmail Akyol
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Süleyman TOLUN
Enstitü Müdürü

Bu tez KSÜ araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2008/4-5

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
ÖNSÖZ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı	1
1.2. Kantitatif Karakterler ve Seleksiyondaki Önemi	1
1.3. QTL(Kantitatif Karakter Lokusları)	1
1.4. MAS (Marker Destekli Seleksiyon)	2
1.5. Leptin Geninin Yapısal Özellikleri	2
1.5.1. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Sığırlardaki Canlı Ağırlık Artışına Etkisi	3
1.5.2. Leptin Salgılanmasının Düzenlenmesi.....	3
1.5.3. Leptin reseptörleri.....	3
1.5.4. Yem tüketimi enerji metabolizmasına etkisi.....	3
1.5.5. Obesite-leptin ilişkisi	4
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Leptin Polimorfizminin Besi, Karkas ve Canlı Ağırlık Özellikleri ile İlişkisi	5
2.2. Leptin Polimorfizminin Süt Verim Özellikleri ile İlişkisi.....	6
2.3. Leptin Allel Frekansları.....	8
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	12
3.1.2. Kontrol Gruplarından Alınan Kan Örnekleri.....	12
3.1.3. Leptin Gen Bölgesi Sekansı	12
3.2. Metot.....	13
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu	13
3.2.2. Leptin Genini Belirleyen Primerlerin Tasarlanması	13

3.2.3. Moleküler Teknikler	13
3.2.3.1. PCR Şartları.....	13
3.2.3.2. PCR Sonrası Jel Analizi.....	14
3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesilmesi ve Jel Analizi	14
3.2.4. Veri Analizi	14
3.2.4.1. Gen Frekanslarının Hesaplanması	14
3.2.4.2. Normalize Eşdeğerlik ve Standart Genetik Mesafe Hesabı	15
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	16
4.1. Kan Örneklerinin Genomik DNA İzolasyonu	16
4.2. Leptin Geninin PCR Analizi.....	16
4.3. PCR Ürünlerinin Kesilmesi	17
4.4. DNA Örneklerinin Genotiplendirilmesi	17
4.4.1. Allel ve Genotip Frekanslarının Hesaplanması	17
4.4.2. Hardy-Weinberg Denge Testi'nin Uygulanması	18
4.4.3. Normalize Eşdeğerlik ve Standart Genetik Mesafe Hesabı	19
4.5. Leptin Polimorfizminin Vücut Ölçüleri ile İlişkisi	20
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	21
KAYNAKLAR.....	22
ÖZGEÇMİŞ	27

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZET

YERLİ KARA SIĞIR IRKINDA LEPTİN GENİ Arg25Cys MUTASYONUNUN
PCR-RFLP METODU İLE BELİRLENMESİ

Çiğdem BENGİ

Danışman: Doç. Dr. Ali KAYGSIZ

Yıl: 2010, Sayfa: 27

Jüri: Doç. Dr. Ali KAYGISIZ
Prof. Dr. Metin DIĞRAK
Yrd. Doç. Dr. İsmail AKYOL

Sığırların leptin geni yönünden göstermiş olduğu genotipik farklılıklar (polimorfizm); yem tüketimi, enerji dengesi, yağ depolanması, döl verimi, süt verimi ve süt bileşimi üzerine etkilidir. Dolayısıyla bu gen genetik ilerleme açısından üzerinde durulması gereken bir seleksiyon kriteri olma potansiyelindedir. Yerli Kara sığır ırkı, yetiştiriciler açısından ekonomik öneme sahip, önemli bir yerli gen kaynağıdır. Çalışmada bu ırkın leptin geni yönünden göstermiş olduğu genetik polimorfizmlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Toplanan 45 Yerli Kara sığır ırkına ait kromozomal DNA'lar izole edilmiş ve 106 bç uzunluğundaki leptin gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu ile çoğaltılmıştır. 73. nükleotidteki sitozin (C) veya timin (T) mutasyonunu belirlemek için 106 bç uzunluğundaki PCR ürünü *Bam*HI kesme enzimi ile kesilmiştir. Gen frekansı hesaplamaları 73. pozisyona göre yapılarak gen frekansları $p(C)= 0.52$ ve $q(T)= 0.48$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen moleküler genotipik tiplendirme sonuçları fenotipik göğüs çevresi ölçüleri ile ilişkilendirilmiştir. Genotipik ve fenotipik karşılaştırma sonuçlarına göre CT ve CC genotipli hayvanların göğüş çevresi uzunluğu, TT genotipli hayvanlardan daha düşük düzeyde tespit edilmiştir. Sonuç olarak leptin geninde meydana gelen tek nükleotid mutasyonu (T→C) ile Arg25Cys amino asit değişim mutasyonu oluşmakta ve bu mutasyon fenotip tahmininde bir seleksiyon kriteri olarak önerilebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Leptin Geni, Arg25Cys Polimorfizmi, Seleksiyon Kriteri, Yerli Kara Sığır Irkı

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM UNIVERSITY
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT of ANIMAL SCIENCE**

MSc THESIS

ABSTRACT

**DETERMINATION of Arg25Cys MUTATION IN LEPTIN GENE IN
ANATOLIAN BLACK CATTLE BREED GENE BY USING THE METHOD
PCR-RFLP**

Çiğdem BENGİ

Supervisor: Doç. Dr. Ali KAYGSIZ

Year: 2010, Pages: 27

**Jury: Assoc. Prof. Dr. Ali KAYGISIZ
Prof. Dr. Metin DIĞRAK
Assoc. Prof. Dr. İsmail AKYOL**

The genotypical differences in cattle breeds by means of the gene leptin gene polymorphism has effect on feed consumption, energy balance, fat storage, fertility, milk yeilds and milk composition. Therefore leptin gene polimorfism could be considered as a potential selection criteria for genetic progression. Anatolian Black cattle breeds is important for native gene sources and play economical importance for the breeders. It is aimed to determine leptin gene polymorphism of Anatolian Black cattle in this study. Total 45 chromosomal DNA were isolated from Anatolian Black Cattle breeds and 106 bp regions of these templates DNA was amplified using polymerase chain reaction (PCR) method. In order to detect single nucleotide mutation at 73 position (C or T), the 106 bp PCR products were digest with *Bam*HI restriction enzyme. Gene frequency was made according to 73 position and frequency of cytosine p(C)= 0.52 and timine q (T)= 0.48) were calculated. The obtained molecular genotypic results are combined with phenotypic chest girth measurement. Genotypic and phenotypic results analysis showed that the CT and CC genotyped animals have shorted chest girth than TT genotyped ones. Consequently, T→ C mutation at 73 position in leptin gene making Arg25Cys amino acid changes could be recommended as a phenotype selection criteria.

Keywords: Leptin Gene Arg25Cys Polimorphism, Selection Criteria, Anatolian Black Cattle Breed

ÖNSÖZ

Leptin geni polimorfizmlerinin belirlenmesi, polimorfizmler yönünden genetik yapı (genotip) ve allel frekanslarının tespit edilmesi, polimorfizmlerin et verim özellikleri ile kemik gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması amacı ile yapılan çalışmada, Türkiye’de et verim ve kalitesinin yükseltilmesi için yeni olanaklar sağlanacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca seleksiyonla sağlanacak genetik ilerlemeye katkıda bulunulması beklenmektedir.

Bu çalışmanın yürütülmesinde göstermiş oldukları her türlü yardım ve katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İsmail AKYOL ve Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE hocalarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

BİGEM laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan ve yakınlıklarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Kalbiye Serdaroğlu, Arş. Gör. Yekta GEZGİNÇ, Ferit Can YAZDIÇ ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca rahmetli annem başta olmak üzere aileme sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Şubat 2010**KAHRAMANMARAŞ****Çiğdem BENGİ**

ÇİZELGELER DİZİNİ**SAYFA**

Çizelge 2.1. Bazı sığır ırklarında genotiplere ait çeşitli dönem ağırlıkları	6
Çizelge 2.2. Dört farklı etçi sığır ırkında leptin allel frekansları	8
Çizelge 2.3. Altı farklı sütçü sığır ırkında leptin allel frekansları.....	8
Çizelge 2.4. İran’da 6 farklı yerli ırkta leptin allel frekansları	9
Çizelge 2.5. Farklı genotipteki sığır ırklarında leptin genotip ve allel frekansları.....	9
Çizelge 2.6. Holstein boğalarda leptin genotip ve allel frekansları.....	9
Çizelge 2.7. Holstein boğalarda leptin genotip ve allel frekansları.....	10
Çizelge 2.8. İran’da yetiştirilen Shabestar ve Sarab yerli ırklarında leptin allel frekansları	10
Çizelge 2.9. İran’da 6 farklı ırkta leptin allel frekansları.....	10
Çizelge 2.10. Ürdün’de yetiştirilen Friesian ve yerli sığır ırkında leptin allel frekansları	11
Çizelge 4.1. Yerli Kara ırkına ait 45 adet DNA örneğinin gözlenen genotipleri.....	18
Çizelge 4.2. Yerli Kara sığır ırkı için χ^2 testi	18
Çizelge 4.3. Yerlikara sığır ırkına ait allel frekansı ile heterozigotluk-homozigotluk oranları	18
Çizelge 4.4. Esmer sığır popülasyonuna ait genotip sayıları ile allel frekansları	19
Çizelge 4.5. Genotiplere ait göğüs çevresi ölçüleri.....	20

ŞEKİLLER DİZİNİ**SAYFA**

Şekil 3.1. Sekansı yapılmış leptin gen bölgesinin (U50365) dizi analizi.	12
Şekil 4.1. İzole edilen kromozomal DNA örnekleri jel görüntüsü.....	16
Şekil 4.2. PCR analizi yapılan leptin geninin, 106 bç uzunluğundaki gen bölgesi. ..	16
Şekil 4.3. Kesme reaksiyonu sonrası jel analizi, M: 100 bp'lik markör	17
Şekil 4.4. Genetik uzaklık değerlerine ilişkin matristen yararlanılarak çizilen UPGMA dendogramı	20

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

YK	: Yerli Kara
A	: Amper
A	: Adenin nükleotid
a.a.	: Amino asid
Ala	: Alenin aminoasid
MAS	: Marker Destekli Seleksiyon
Bp	: Baz çifti
C	: Sitozin nükleotid
°C	: Santigrat derece
cDNA	: Kromozomal DNA
dk	: Dakika
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asid
QTL	: Kantitatif karakter lokusları
EDTA	: Etilen diamin tetra asit
pmol	: Pikomol
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
F	: Forward
NaCl	: Sodyum Klorür
G	: Guanin nükleotid
BamHI	: Restriksiyon Endonükleaz Enzimi
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri
mM	: Mili molar
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
µl	: Mikrolitre
ng/ml	: Nanogram/mililitre
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: piko mol
R	: Rewerse
RFLP	: Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
rpm	: bir dakikadaki rotor devir sayısı
RT-PCR	: Rewerse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
sn	: Saniye
UV	: Ultra Viyole
T	: Timin nükleotid
TBE	: Tris-Brote-EDTA
UPGMA	: Unweighed pair-gro

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Türkiye biyolojik çeşitlilik ve gen kaynakları varlığı açısından diğer gelişmiş ülkelerden daha iyi durumdadır. Ülkemizde sığırların % 65-70'i yerli ırklarından oluşmaktadır. Yerli sığır ırklarında Yerli Kara, Boz ırk, Doğu Anadolu Kırmızısı, Kilis (Güney Anadolu Kırmızısı), Yerli Güney Sarısı ve Zavot sığırları koruma kapsamındadır (Anonim, 2004; Anonim 2006a; Anonim 2006b). Yerli sığır ırkları kötü çevre koşullarında yaşayabilme ve düşük de olsa verimliliklerini sürdürebilme özelliğine sahiptirler. İslah çalışmalarına yol gösterecek genotipik varyasyonun elde tutulması ancak gen kaynaklarının (gen çeşitliliğini) korunması ile mümkündür.

Hayvansal genetik kaynaklarının belirlenmesi ve bu bilgilerin uluslararası bir bilgi bankasında toplanmasına ihtiyaç vardır. Bu amaçla çeşitli ülkelerde gen bankaları kurulmuştur. Bu bankalar tehlike altındaki ırkların spermalarını toplamak, saklamak ve merkeze ulaştırmakta yükümlüdür. Hayvan ırkını tanımlayan uzmanlar bankaya giren her ırkı tanımlayarak, gelecekte kullanılmak üzere genetik kodun oluşmasını sağlamaktadırlar. Bu sebeple morfolojik, fizyolojik, genetik ırk özelliklerinin tam olarak tespit edilmesi gerekmektedir.

Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen Yerli Kara sığır ırkının leptin geni yönünden göstermiş olduğu genetik polimorfizmler ve bundan kaynaklı, sahip oldukları genetik yapı ve allel frekansları bu çalışma ile belirlenecek ve leptin geni seleksiyon kriteri olarak kullanılabilir.

1.2. Kantitatif Karakterler ve Seleksiyondaki Önemi

Çiftlik hayvanlarında ekonomik öneme sahip süt, yapağı, yumurta ve et verimleri gibi karakterler fazla sayıda genin kontrolü altındadırlar ve aynı zamanda çevre faktörleri tarafından da büyük ölçüde etkilenirler. Bu nedenle kantitatif karakterlerde fenotipik değer çoğu kez genotipik değeri iyi bir şekilde yansıtmamakta ve dolayısıyla fenotipe dayalı seleksiyonda verimlilik azalmaktadır. Bundan dolayı üzerinde durulan karakterin genotipik değerinin tahmini büyük önem taşımaktadır (Vanlı,1987).

Sığır, koyun ve kanatlılarda biyokimyasal polimorfizmin varlığı ortaya konduktan sonra, araştırmacılar değişik polimorfik karakterler ile çeşitli verim özellikleri arasındaki ilişkiyi bulmaya yönelmişlerdir. Böyle bir ilişki çeşitli verim özellikleri bakımından dolayı ya da erken seleksiyonu sağlamak açısından önemlidir.

1.3. QTL(Kantitatif Karakter Lokusları)

Tek gen çifti tarafından belirlenen kalitatif özelliklerin aksine kantitatif özellikler sürekli dağılım gösterirler. Ayrıca fazla sayıda genin etkili olduğu, ölçüm ve tartımla ifade edilebilen özelliklerdir. Bu özellikler üzerinde güçlü etkiye sahip olan gen yerleri 'Quantitative Trait Locus'(QTL) olarak adlandırılmaktadır. Gen lokusu kromozom üzerinde belirli bir karaktere ait genetik bilginin yer aldığı bölgedir. (Farnir ve ark., 2002).

1.4. MAS (Marker Destekli Seleksiyon)

Hayvancılığın ileri seviyelere çıkartılması için, aranılacak özelliklere sahip olan ve bu özelliklerini gelecek generasyonlara aktarabilecek yetenekteki damızlık hayvanların seçilmesi ve kullanılması seleksiyondur.

Farklı genotiplere ait DNA'daki nükleik asit dizilim farklılığını (polimorfizm) çeşitli şekillerde ortaya koyan DNA merkezleri; kalıtım derecesi düşük, ölçülmesi zor, özelliklerin belirlenmesini sağlarlar. Bu durum seleksiyonla sağlanacak genetik ilerlemenin daha fazla olmasına olanak tanımakta ve Marker Destekli Seleksiyon (MAS = Merker asisted Selection) olarak adlandırılmaktadır. Marker destekli seleksiyon yaşa ve cinsiyete bağımlı olmaksızın yapılabilmektedir ve bu nedenle seleksiyon yoğunluğunu kantitatif yöneme göre daha etkili kullanmayı mümkün kılmaktadır. Hayvanla ilgili genetik bilgiler doğumla birlikte yada çok genç yaşta elde edilebilir bu nedenle hayvanın verim zamanını beklemeye gerek kalmadan gerekli seleksiyon uygulanabilir (Sellier, 1994).

1.5. Leptin Geninin Yapısal Özellikleri

Leptin, adipoz doku tarafından salgılanan (Itossner, 1998), yem tüketimi ve yem değerlendirme, enerji dengesi, metabolizma ve üremenin denetiminde (Block ve ark., 2001; Lieferes ve ark 2002) önemli rol oynayan 16 kDa polipeptit bir hormon olup 3 ekson ve 2 intron bölgesine sahiptir. Yapılan bir çalışmada, 1820 bç'lik olan leptin genine ilişkin PCR ürünlerini *Sau3AI* kesme enzimi kullanarak fragmentlere ayrılmıştır. Leptin kodlayıcı gen sığırlarda 4. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarla leptin geninin polimorfik olduğu ortaya konmuştur (Pomp ve ark. 1997; Wilkins ve Davey 1997).

Konfortov ve ark. (1999) leptin geninin hem intron hem de ekson bölgelerini sekanslayarak toplamda 20 polimorfizm belirlemişlerdir. Leptin geninin ekson 2 bölgesinde "*ClaI*" ve "*Kpn2I*" şeklinde 2 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism / RFLP) belirlenmiştir: Bunlardan "*ClaI*" bir aminoasitin tirozinden fenilalanine dönüşmesine yol açan A/T baz değişikliğini, "*Kpn2I*" ise bir aminoasitin argininden sisteine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliğini ifade etmektedir. Genin ekson 3 bölgesinde ise "*NruI*" ve "*HphI*" şeklinde 2 farklı RFLP tespit edilmiştir: Bunlardan "*NruI*" bir aminoasitin valinden alanine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliğini, "*HphI*" ise bir aminoasitin alaninden valine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliğini ifade etmektedir. Ayrıca intron 2 bölgesinde bir *Sau3AI* polimorfizmi tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten BovMap veri tabanında 19 farklı tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) listelenmiştir.

Leptin allellerinin simgelenilmesi, bir aminoasidin argininden sisteine dönüşmesi durumunda (C) veya (A), Timine dönüşmesi durumunda ise (T) veya (B) ile ifade edilmektedir. Birinci durumda genotiplendirme CC, CT ve TT, ikinci durumda ise AA, AB ve BB şeklinde gösterilmektedir.

Plazma leptin seviyesi, vücuttaki yağ miktarı ve enerji dengesini etkileyen önemli bir faktördür. (Block ve ark.2001). Sığır ve koyunlarda plazma leptin seviyesi vücuttaki yağ miktarının artışı ve enerji dengesinin artışına paralel olarak artmaktadır (Blache ve ark.2000; Delavaud ve ark.2000; Ehrhardt ve ark.2000).

1.5.1. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Sığırlardaki Canlı Ağırlık Artışına Etkisi

Leptin geninin hem intron hem de ekson bölgesi sekanslandığında, toplamda 20 farklı polimorfik bölge gözlemlenmektedir. Leptin geninin ekson 2 bölgesinde 2 Kesme Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism / RFLP) belirlenmiştir: *ClaI* (bir aminoasitin tirozinden fenilalanine dönüşmesine yol açan A/T baz değişikliği) ve *Kpn2I* (bir aminoasitin argininden sisteine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) gözlemlenmektedir. Genin ekson 3 bölgesinde de 2 farklı RFLP tespit edilmiştir: *NruI* (bir aminoasitin valinden alanine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) ve *HphI* (bir aminoasitin alaninden valine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği). Ayrıca intron 2 bölgesinde bir *Sau3AI* polimorfizmi tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten BovMap veri tabanında 19 farklı tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) listelenmiştir (Konfortov ve ark. 1999).

Tek bir nükleotid mutasyonu (bir aminoasitin argininden sisteine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) allelik çeşitliliğinin yağlı dokulardaki leptin mRNA seviyeleriyle alakalı olduğu ve olgun ineklerdeki yağ depolanmasını artırdığı gözlemlenmiştir. CT ve CC genotipli hayvanların kemik ağırlıkları TT genotipli hayvanlardan daha düşüktür (Buchanan ve ark.,2002).

1.5.2. Leptin Salgılanmasının Düzenlenmesi

Leptinin salgılanma düzeyi vücut yağ kitlesi ve enerji dengesine ağırdır. Kan plazmasındaki düzey üretilen miktar ile orantılıdır (Buchanan ve ark. 2003). Leptinin salgılanması altı reseptörün etkisi altındadır. Obezlerde ve dişilerde daha fazla salgılanmaktadır. Laktasyondaki süt ineklerinde yapılan çalışmalar insülin ve glukozun plazma leptin düzeyini artırdığını; plazma leptin düzeyi düştüğünde ise büyüme hormonu ve serbest yağ asitlerinde artış olduğu gözlemlenmiştir (Block ve ark., 2003)

1.5.3. Leptin reseptörleri

Leptinin OB-Rb (uzun, tek form) ve OB-Ra (kısa 5 form) olmak üzere iki tip reseptörü bulunur. OB-Rb hücre içi sıvılara sinyal gönderen tek izoformdur, en fazla hipotalamusta bulunmasına rağmen süt sığırlarında yapılan çalışmalar böbrek, dalak, karaciğer, iskelet kasları, kalp, testis, akciğer, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, beyin ve yağ dokuda da bulunduğu tespit edilmiştir (Chelikani ve ark., 2004).

OB-Ra reseptörlerin beyin damarları ve sinir ağında bulunması, leptinin merkezi sinir sistemine taşınmasında önemli görev üstlendiğini göstermektedir. Kısa form reseptörlerin bulunduğu doku ve organlar; böbrek, karaciğer, dalak, hipofiz, beyin damarları ve diğer dokularda bulunur (Chelikani ve ark., 2004).

1.5.4. Yem tüketimi enerji metabolizmasına etkisi

Leptinin süt sığırlarında iştah ve yem tüketimi üzerine etkisini hipotalamusta gerçekleştirilmektedir. Doğum sonrası süt ineklerinde enerji yetersizliği plazma leptin düzeyinin düşmesine neden olmaktadır. Süt veriminin düşmesine bağlı olarak enerji yetersizliğinin ortadan kalkması, leptin konsantrasyonunun yükselmesine neden

olmaktadır. Laktasyon başındaki süt hayvanlarının, yem tüketiminin düşük ve hayvanlar negatif enerji dengesinde olduğu zaman leptin düzeyi de düşük olmaktadır (Liefers ve ark.,2005).

1.5.5. Obesite-leptin ilişkisi

Obez aşırı yağ birikimi anlamına gelmekte ve obesite nedeni olarakta aşırı yeme gösterilmektedir (Friedman, 2003). Obez hayvanlarda leptin konsantrasyonunun düşük olduğu belirlenmiştir . Leptin genine sahip olmayan farelerde sinirsel uyarılarla iştahlarının arttığı ve fazla yiyerek yağlandıkları belirlenmiştir (Pinto ve ark., 2004). Yağlı ergin Charolais, Holstein ırkı inekler, yaşama payı enerji ihtiyacının yüzde 30'u düzeyinde beslemeye tabi tutulduklarında, yağlı ergin hayvanlarda yem tüketiminin fazla olduğu ve yağ dokudaki hücrelerde artış olduğu görülmüştür. Düşük düzeyde beslenen zayıf ineklerde plazma leptin seviyesi düşmüş, yağlı ineklerde artmış; besleme düzeyi yükseltildiğinde ise plazma leptin seviyesi de yükselmiştir (Delavaud ve ark., 2006). Angus, Şarole, Hereford buzağı, düve ve boğalarla yapılan besi denemesinde boğalarda karkas yağ doku kitlesine bağlı olarak plazma leptin seviyesinin yüksek olduğu, genç buzağılarda ise daha düşük olduğu belirlenmiştir (Geary ve ark., 2003).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Leptin Polimorfizminin Besi, Karkas ve Canlı Ağırlık Özellikleri ile İlişkisi**

Hale ve ark.(1999) tarafından Angus sığır ırkı ile yapılan çalışmada, leptin geninin karkas özelliği için markör olarak kullanılmasının yararlı olabileceği öne sürülmüştür.

Zwierchowski ve ark. (2001), farklı etçi sığır ırkları ile yaptıkları çalışmada leptin genindeki polimorfizm ile yem tüketimi ve yemden yararlanma arasında bir ilginin olduğunu ve bazı karkas özelliklerinin genotipik farklılıktan etkilendiğini göstermişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar AA genotipli boğaların daha yüksek yem tüketimine sahip olduğunu, AB genotiplilerin ise parçalanmış karkastan seçilen örneklerde daha fazla yağsız et ürettiklerini ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda leptin geninin karkas özellikleri ve yem tüketimi için markör gen olarak kullanılabilirliğini ifade etmektedirler.

Buchanan ve ark.(2002), gebeliğin olumsuz etkileri nedeniyle yem alımının sınırlandığı laktasyonun ilk dönemlerinde yüksek süt veriminin devam ettirilebilmesi için kuru dönemde vücutta yağ depolanmasının önemli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, 4 farklı etçi sığır ırkından oluşan (Angus, Hereford, Simental ve Charolais) toplam 154 boğa üzerinde leptin geninin ekson 2 bölgesindeki *Kpn2I* (bir aminoasitin arginininden sisteine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) polimorfizmini PCR-RFLP yöntemiyle tespit etmek ve bu baz değişikliğinin et sığırlarında karkas yağlanması üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, T allelini artıran yağ depolanması ve yağ dokuda daha yüksek seviyede leptin mRNA'sı ile ilişkili bulmuşlar ve aynı genetik varyasyonun süt sığırlarında da mevcut olduğunu bildirmişlerdir.

Oprzadek ve ark. (2003), Siyah-Alaca ırkıyla yaptıkları çalışmada karkas özellikleri ile polimorfik leptin geni varyantları arasında önemli ilişkiler bulunduğunu bildirmişlerdir.

Lusk (2006), yapmış olduğu çalışmada leptin geni üzerindeki iki Single Nucleotide Polymorphism (SNP) (UASMS2 ve R25C) canlı ağırlık ve sırt yağı kalınlığı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yapılan analizler sonucunda R25C polimorfizminin tek başına canlı ağırlık ve sırt yağı kalınlığına etki etmediği, ancak UASMS2 polimorfizminin canlı ağırlık üzerine etkisi önemli düzeyde ($P < 0.001$) bulunmuştur. Canlı ağırlık artışı UASMS2-CC genotipli hayvanlarda daha düşük, UASMS2-TT genotipli hayvanlarda ise daha yüksek olmuştur. UASMS2 ve R25C polimorfizmlerinin kombine etkileri araştırıldığında ise R25C-CC / UASMS2-TT genotipine sahip hayvanlarda sırt yağı kalınlığının hızlı bir şekilde ilerlediği, R25C-CC / UASMS2-CC genotipine sahip hayvanlarda ise sırt yağı kalınlığının çok yavaş ilerlediği gözlemlenmiştir ($P < 0.001$).

Zhang ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada, 539 baş Nanyang(NY), Quinchuan(QC), Luxi(LX), Xizhen(XZ) ve Holstein gibi bazı sığır ırklarında leptin geni polimorfizmlerinin, canlı ağırlık, vücut uzunluğu, sağrı genişliği gibi parametrelere olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada genotiplere ait çeşitli dönem ağırlıkları aşağıdaki gibi bulunmuştur.

Çizelge 2.1. Bazı sığır ırklarında genotiplere ait çeşitli dönem ağırlıkları

	AA	AB	BB
Doğum	30.90±4.05	30.26±12.48	29.28±1.55
6. ay	170.13±13.78	157.76±8.57	157.55±0.06
12 ay	227.90±28.36	221.65±21.91	222.28±21.08
18 ay	301.63±45.46	300.07±28.30	295.28±24.04

Kulig ve Kmiec (2008) Polonya'nın Güneydoğu bölgesinde bulunan bir çiftlikteki 129 baş Limozin ırkı ineklerde yapmış oldukları çalışmada A59V ve *Sau3AI* leptin geni polimorfizminin ortalama günlük canlı ağırlık artışı, kuyruk sokumu uzunluğu, göğüs çevresi gibi büyüme özelliklerine olan etkilerini araştırmışlardır. Yapılan istatistik analiz değerlendirmeleri sonucunda, A59V polimorfizminin 210 günlük vücut ağırlığı ve ortalama günlük ağırlık artışı artışı (3 gün - 210 gün) üzerine etkisinin önemli ($P<0.01$ ve $P<0.05$) olduğu ortaya konmuştur. *Sau3AI* polimorfizmi ile canlı ağırlık artışı arasında hiçbir ilişki gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda, 210 günlük canlı ağırlık ve ortalama günlük canlı ağırlık artışının (3 gün - 210 gün) CC/CC genotipli hayvanlarda CC/CT ve CC/CT genotiplere göre daha düşük olduğu bulunmuştur.

2.2. Leptin Polimorfizminin Süt Verim Özellikleri ile İlişkisi

Santos-Alvarez ve ark. (1999) süt sığırlarında buzağılamadan önce artan vücut kondisyonunun laktasyon döneminde süt üretimini desteklemek için enerji depoları oluşturduğunu fakat yine de süt sığırlarının laktasyonun erken dönemlerinde yüksek süt verimi karşın gebeliğin fiziksel ve hormonal olumsuz etkileri sonucu düşük düzeyde kuru madde almaları nedeniyle negatif enerji dengesinde olduklarını bildirmişlerdir.

Liefers ve ark.(2002) iki farklı sürüdeki toplam 595 baş Holstein ineğinde leptin geni intron 2. bölgesindeki *Sau3AI* ve ekson 3. bölgesindeki *HphI* polimorfizmlerinin laktasyonun ilk 15 haftasında süt verim özellikleri, canlı ağırlık ve yem tüketimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada, *Sau3AI* polimorfizmi açısından AA, AB genotipleri arasında süt verimi, protein verimi, laktoz verimi ve yem tüketimi arasındaki farklılıkların önemli düzeyde olduğu, AB genotipli hayvanların AA genotipli hayvanlara göre 1.23 ila 1.32 kg/gün daha fazla süt verdiği, 0.39 kg/gün daha yüksek kuru madde tükettiği, 0.73 kg/gün daha fazla yem tükettiği, laktasyonun 15. haftasında ortalama 9.1 kg kilo artışı olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, sonuç olarak *Sau3AI* polimorfizminin süt veriminin yanı sıra yem tüketimi ve canlı ağırlık artışını etkilediğini bildirmişlerdir.

Buchanan ve ark. (2003) et sığırlarında artan yağ depolanması ve yağ dokuda daha yüksek seviyede leptin mRNA'sı ilişkili olduğu bilinen leptin geni ekson II bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizminin süt sığırlarında süt verim özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla 416 Holstein ineğin genotipik ve laktasyon verilerini karşılaştırarak yaptıkları çalışmada tüm laktasyon dönemi boyunca TT ve TC genotipli ineklerin CC genotiplilere göre sırasıyla 1.5 kg/gün ve 0.91 kg/gün fazla süt verdiğini; laktasyonun ilk 100 günlük döneminde TT ve TC genotipli ineklerin CC genotiplilere göre sırasıyla 2.44 kg/gün ve 1.74 kg/gün fazla süt verdiğini; laktasyonun 101-200. günleri arası bu farkın TT ve TC genotipli inekler lehine sırasıyla 1.74 kg/gün ve 1.38 kg/gün, laktasyonun 200. gününden sonraki dönemde ise TT ve TC genotipli inekler lehine sırasıyla 0.24 kg/gün ve 0.22 kg/gün olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta leptin TT genotipinin süt yağ verimini

değiştirmeksizin süt verimi ve protein verimindeki artışla ilişkili olduğunu ve T alleli bakımından homozigot hayvanların göstermiş olduğu süt verimi üstünlüğünün süt üreticileri için ekonomik yönden büyük önem taşıdığını ortaya koymuşlardır.

Madeja ve ark. (2004), 117 Polonya Alacası Boğa üzerinde yaptıkları çalışmada süt ve protein verimi bakımından damızlık değerleri üzerine ekson 3 bölgesindeki *HphI* polimorfizminin önemsiz olduğunu bildirmişlerdir.

Komisarek, ve ark.(2005), Arg4Cys^{TT} genotipli ineklerin Arg4Cys^{CC} ve Arg4Cys^{CT} genotipli ineklere göre daha fazla süt ve protein verimine sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Kulig (2005a), Polonya Siyah Alaca sığırlarda LEP/*HphI*, LEP/*Sau3AI* genotip polimorfizmi bakımından gen frekanslarını ile leptin genotipleri ile süt verim özellikleri arasındaki ilişkileri araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, LEP/*HphI* ve LEP/*Sau3AI* genotipleri ile süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler önemli bulunmuş olup LEP/*HphI*^{CC} ve LEP/*Sau3AI*^{BB} genotiplerinin daha yüksek süt verdiği tesbit edilmiştir.

Kulig (2005b), leptin geninin ekson 3 bölgesindeki *HphI* ve intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* polimorfizm kombinasyonları (*HphI* / *Sau3AI*) ile süt verim özellikleri (süt verimi, yağ verimi, protein verimi, yağ yüzdesi ve protein yüzdesi) arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla 5 farklı çiftlikte yetiştirilen, farklı oranlarda Holstein genotipi taşıyan (ortalama %68), en az bir laktasyon dönemini tamamlamış 860 Siyah Alaca inek üzerinde I., II., III. laktasyon dönemleri süt verimleri kayıtlarını kullanarak yaptığı araştırmada leptin genotip kombinasyonları (*HphI* / *Sau3AI*) ile süt, protein ve yağ verimi arasındaki ilişkiyi istatistiksel açıdan önemli düzeyde bulmuş (P<0.01) ve bu verim özelliklerinin CC/BB genotipli hayvanlarda daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmacı ayrıca Leptin geninin ekson 3 bölgesindeki *HphI* ve intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* polimorfizmlerinin süt verimi ve sütün protein ve yağ içeriği için moleküler marker olarak kullanılabilceğini öne sürmüştür.

Kulig ve ark.(2008), 699 baş Kırmızı Beyaz Holstein Friesian ineğinde leptin gen polimorfizminin somatik hücre sayısı, günlük süt verimi ve bileşimine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, LEP/*Sau*' ve LEP/*Sau3AI* genotipleri ile sütün bileşimi arasındaki ilişkiler önemli (P<0.01, P<0.05) bulunmuş olup LEP/*Sau3AI*^{CC} ve LEP/*Sau*'22 genotiplerin damızlık olarak tercih edilmesi durumunda sütün yağ içeriğinin artmasına katkıda bulunulabileceğini bildirilmiştir.

Sadeghi ve ark.(2008), İran'da döl kontrolünden geçirilmiş Holstein boğalarında yaptığı çalışmada, TT genotipli boğaların TC ve CC genotipli boğalara göre süt, yağ ve protein verimi bakımından daha yüksek damızlık değerine sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Kulig ve ark.(2009), 181 baş Jersey ineğinde leptin gen polimorfizminin süt, yağ ve protein verimi ile protein ve yağ içeriklerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, A59V polimorfizminin süt, protein ve yağ verimini önemli derecede etkilediği (P<0.01, P<0.05), *Sau3AI* polimorfizminin ise etkisinin önemsiz olduğu ancak, *Sau3AI* CC/TT genotipli ineklerin diğer genotiplere göre daha düşük süt yağı içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, A59V CC ve CT genotipli hayvanların damızlık olarak

seçilmesinin süt, yağ ve protein veriminin artışına katkıda bulunabileceğini ifade etmişlerdir.

2.3. Leptin Allel Frekansları

Buchanan ve ark. (2002)'nin, dört farklı ırk için bildirdikleri *Kpn21* leptin allel frekansları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Dört farklı etçi sığır ırkında leptin allel frekansları

İrk	N	C	T
Angus	60	0.42 ^a	0.58
Hereford	22	0.45 ^{ab}	0.55
Charolais	55	0.66 ^b	0.34
Simental	17	0.68 ^b	0.32
Toplam	154	0.54	0.46

a, b; farklı harflerle gösterilen populasyonlarda allel frekansları farklıdır (P<0.05).

Çalışmada, erken gelişme özellikleriyle tanınan Britanya ırklarının (Angus, Hereford) daha yüksek oranda T alleli taşımalarına karşın Avrupa ırkları (Simental, Charolais) ağırlıklı olarak C alleli taşıdıkları tesbit edilmiştir.

Buchanan ve ark.(2003)'ün, bazı sütçü ırklar için bildirdikleri *Arg25Cys* leptin allel frekansları Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Altı farklı sütçü sığır ırkında leptin allel frekansları

İrk	N	T	C
Holstein	416	0.46	0.54
Ayrshire	17	0.62	0.38
Brown Swiss	21	0.45	0.55
Canadienne	9	0.11	0.89
Guernsey	16	0.06	0.94
Jersey	20	0.53	0.47

Kulig (2005a), Polonya Siyah Alaca sığırlarda *LEP/Sau3AI* polimorfizmi bakımından genotip frekanslarını $LEP/Sau3^{AA} = 0.642$, $LEP/Sau3^{AB} = 0.19$, $LEP/Sau3^{BB} = 0.014$, $LEP/Sau3AI^{AC} = 0.135$, $LEP/Sau3AI^{BC} = 0.012$, $LEP/Sau3AI^{CC} = 0.007$, allel frekanslarını ise $A = 0.805$, $B = 0.114$ ve $C = 0.081$ olarak bildirmişlerdir.

Javanmard ve ark. (2005) 'ın, İran'da 6 farklı yerli ırk veya melez genotipler için *Sau3AI* leptin polimorfizmi bakımından bildirdiği genotip ve allel frekansları Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. İran’da 6 farklı yerli ırkta leptin allel frekansları

Populasyon	Genotip frekansları				Allel frekansları		Heterozigot
	N	AA	AB	BB	A	B	
Sarabi	82	0.561	0.378	0.061	0.75	0.25	0.3750
Golpayegani(G)	57	0.544	0.351	0.105	0.7193	0.2807	0.4038
Sistani	38	0.211	0.263	0.526	0.3421	0.6579	0.4501
Taleshi	70	0.100	0.757	0.143	0.4786	0.5214	0.4991
Manzadrani	26	0.231	0.308	0.462	0.3846	0.6154	0.4734
Dashtiyari	8	0.000	0.25	0.75	0.125	0.875	0.2188
G * Brown Swiss	13	0.000	0.308	0.692	0.1538	0.846	0.2604

Araştırmacılar, gen göçüne kapalı bu populasyonlarda söz konusu gen yerleri bakımından heterozigotluğun 0.5’in altında olmasına dikkat çekmişlerdir.

Choudhary ve ark.(2005)’in, *Bos indicus* (Hariana) ve *Bos taurus* (Holstein Friesian ve Jersey) familyalarına ait farklı sığır ırkları için *Kpn21* leptin polimorfizmi bakımından bildirdiği genotip ve gen frekansları Çizelge 2.5’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Farklı genotipteki sığır ırklarında leptin genotip ve allel frekansları

Populasyon	Genotip frekansları				Allel frekansları	
	N	CC	CT	TT	C	T
HF * Hariana	205	0.68	0.27	0.05	0.82	0.18
Holstein Friesian(HF)	17	0.25	0.69	0.06	0.60	0.40
Jersey	40	0.18	0.52	0.30	0.44	0.56

Bu çalışma hem *Bos taurus* hem de *Bos indicus* familyalarında tasarlandığı halde, 94 bp leptin geninin (*Kpn21*) sadece *B. Taurus* ve *Bos taurus***Bos indicus* melezi familyasına mensup ırklarda polimorfik olduğu gözlenmiştir.

Komisarek ve ark. (2005)’in, Polonya’da yetiştirilmekte olan 213 baş Holstein boğa için leptin polimorfizmi bakımından bildirdiği genotip ve gen frekansları Çizelge 2.6’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Holstein boğalarda leptin genotip ve allel frekansları

Polimorfizm	Genotip frekansları			Allel frekansları	
	CC	CT	TT	C	T
LEP-Arg25Cys	0.26	0.56	0.18	0.54	0.46

Çalışmada genotiplerin dağılımlarının Hardy-Weinberg açılımına uygun olduğu bildirilmiştir.

Szyda ve Komisarek (2007)’in, Polonya’da yetiştirilmekte olan 252 baş Holstein boğa için leptin polimorfizmi bakımından bildirdiği genotip ve gen frekansları Çizelge 2.7’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. Holstein boğalarda leptin genotip ve allel frekansları

Polimorfizm	Genotip frekansları			Allel frekansları	
	CC	CT	TT	C	T
R25C(LEP)	0.27	0.57	0.16	0.555	0.445

Nassiry ve ark.(2007), *Bsp21* leptin genotip ve allel frekanslarını Golpayani ırkında TT = 0.00, TC = 0.58 ve CC = 0.42, T = 0.29 ve C = 0.71, Taleshi ırkında ise TT = 0.27, TC = 0.36 ve CC = 0.36, T = 0.45 ve C = 0.55 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada her iki populasyonun da Hardy-Weinberg kanunu bakımından dengeden uzaklaştığı bildirilmiştir.

Sadeghi ve ark.(2008), İran’da 134 baş döl kontrolünden geçmiş Holstein boğasında *Kpn21* leptin genotip frekanslarını TT = 0.216, TC = 0.418 ve CC = 0.366, allel frekanslarını ise T = 0.425 ve C = 0.575 olarak bildirmişlerdir.

Javanmard ve ark.(2008)’ın, İran’da 2 (Shabestar ve Sarab) farklı yerli sığır ırkında *Sau3AI* leptin polimorfizmi bakımından bildirdiği genotip sayıları ve allel frekansları Çizelge 2.8’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.8. İran’da yetiştirilen Shabestar ve Sarab yerli ırklarında leptin allel frekansları

Populasyon	n	Genotipler			Allel frekansları	
		AA	AB	BB	A	B
Shabestar	35	15	14	6	0.63	0.37
Sarabi	31	6	14	11	0.42	0.58

Araştırmacılar, iki populasyonda allel frekansları bakımından farkın istatistiki olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Nassiry ve ark.(2008), İran’da 6 farklı ırk için leptin polimorfizmi bakımından bildirdiği genotip ve allel frekansları Çizelge 2.9’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.9. İran’da 6 farklı ırkta leptin allel frekansları

Populasyon	n	Allel frekansları	
		C	T
Sarabi	86	0.68	0.32
Taleshi	66	0.55	0.45
Sistani	94	0.69	0.31
Brown Swiss	104	0.55	0.45
Holstein	161	0.57	0.43
Golpayegani	76	0.71	0.29

Araştırmacılar, en fazla heterozigotluğun Golpayani (% 57.89) ırkında gözlendiğini bildirmişlerdir.

Kulig ve ark. (2009), Polonya Jersey sığırlarında A59V polimorfizmi bakımından genotip frekanslarını CC = 0.52, CT = 0.40, TT = 0.08, allel frekanslarını C = 0.72, T = 0.28, olarak bildirmişlerdir.

Yazdani ve ark. (2009), İran'da yetiştirilen Holstein sığırlarda leptin genotip frekanslarını AA = 0.588, AB = 0.388 ve BB = 0.024, allel frekanslarını C = 0.782, T = 0.218, olarak bildirmişlerdir.

Jawasreh ve ark.(2009), Ürdün'de yetiştirilmekte olan Holstein ve bölgenin yerli sığır ırkında leptin polimorfizmi bakımından bildirdikleri genotip ve allel frekansları Çizelge 2.10'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.10. Ürdün'de yetiştirilen Friesian ve yerli sığır ırkında leptin allel frekansları

Populasyon	Genotip Frekansları			Allel frekansları		Heterozigotluk	
	n	AA	AB	BB	A		B
Friesian	45	0.619	0.309	0.071	0.774	0.226	0.346
Yerli	36	0.629	0.296	0.074	0.777	0.223	0.3464
Toplam	81	0.623	0.303	0.07	0.775	0.225	0.348

Araştırmacılar her iki populasyonda da heterozigotluk ve genetik değişkenliğin düşük olduğunu ifade etmişlerdir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmanın moleküler analizleri, KSÜ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan temel kimyasallar, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Fermentas (USA), Promega (UK) ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir.

3.1.2. Kontrol Gruplarından Alınan Kan Örnekleri

Çalışmada 38 DAK, 16 Esmer İsviçre ve 45 Yerli Kara ırkı sığırdan olmak üzere toplam 99 sağlıklı hayvandan, genetik analizlerin yapılması amacıyla, kan alınmıştır. Ancak DAK ırkına ait kan örnekleri bir başka proje kapsamında değerlendirildi için bu çalışmada kullanılmamıştır. Alınan bu venöz kanlar, pıhtılaşmanın önlenmesi amacıyla antikoagülant bir madde olan etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içersine konulmuş ve laboratuvar ortamına buz kalıpları içerisinde taşınmıştır.

3.1.3. Leptin Gen Bölgesi Sekansı

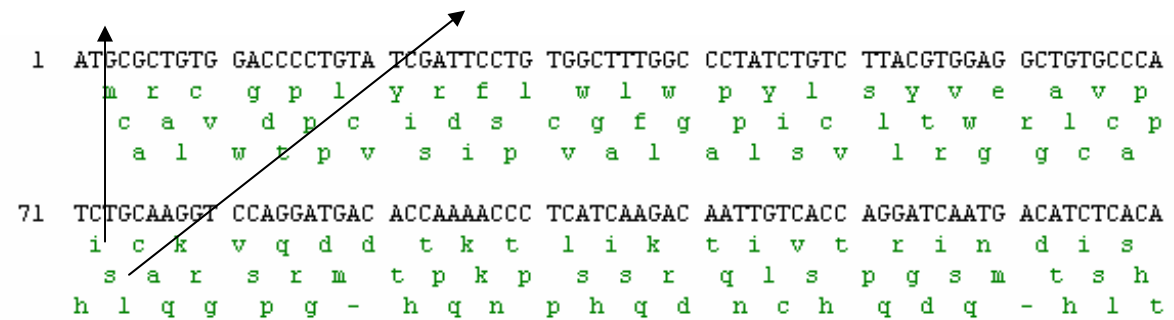
Primerlerin tasarlanması sırasında spesifik bölgelerden primer seçimini sağlamak amacıyla leptin gen bölgesi sekansı kullanılmıştır. Bu gen bölgesinin şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir.

73.Pozition C



73. C to T

Arg25Cys



Şekil 3.1. Sekansı yapılmış leptin gen bölgesinin (U50365) dizi analizi. 73. nükleotid Cve T olması durumunda kodlanan Arjinin ve Sistein aminoasitlerinin gösterilmesi.

3.2. Metot

3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu

200'er µl olarak bölünmüş olan venöz kandan, Sigma Gen EluteTMBlood Genomic DNA Kit kullanılarak ve üretici firmanın tavsiyeleri takip edilerek, genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Effendorf tüpleri numaralandırılmış ve her birine 20 µl Proteinaz K(20mg/l) eklenmiş ve üzerine 200 µl kan örneği ilave edilmiştir. Bunun da üzerine 200 µl Lysis C solüsyonu eklenmiş ve tüpler 15 sn kadar vortekslenmiştir. Daha sonra 10 dk 55 °C'de inkübe edilmiştir. Bu 10 dk'lık bekleme esnasında kolon tüpleri numaralandırılmış ve bu tüplerin içerisine 500 µl Column Preparation Solüsyonu eklenmiş ve 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. 10 dk'lık bekleme süresinin sonunda örneklerin üzerine 200 µl etanol (%95-100) eklenmiştir. Örnekler kolon tüplerine transfer edilmiş ve tüpler 6.500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alt sıvı dökülmüş ve hala sıvı kalmış olması ihtimaline karşı bir kez daha santrifüj edilmiştir. Kolon tüplerine 500 µl Prewash Solüsyonu eklenerek, 6.500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı dökülmüştür. Daha sonra kolon tüplerine Wash Solüsyonu eklenerek 12.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı dökülmüştür. Kolon tüplerinin filtrelili kısımları temiz olan ve numaralandırılmış yeni effendorf tüplerine transfer edilerek, filtrenin tam merkezine 150 µl Elution Solüsyonu eklenmiştir. 10-12 dk oda sıcaklığında bekletilerek 6.500 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Böylece DNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır.

3.2.2. Leptin Genini Belirleyen Primerlerin Tasarlanması

Leptin (U50365) geninin polimorfizmini tespit etmek amacıyla bu nükleotid mutasyonunu açığa çıkaracak primerler tasarlanmıştır. Primerin tasarlanması için leptin gen bölgesinin dizilimi Clone Manager ile analiz edilmiş ve mutasyon bölgesini tanıyabilecek primerler ve kesme enzimi bu analizler ile belirlenmiştir.

Clone Manager'daki gen analizi sonucunda, ileri primeri mutasyon bölgesini içerecek şekilde seçilerek hesaplamaları internet tabanlı bir program olan DNA Calculation kullanılarak primerlerin yapışma sıcaklıkları ve ikincil yapı oluşturma potansiyeli hesaplanmıştır. Sonuçta ileri primer CBF 5'TATCTGTCTTACGTGGAGGCT-GTGCGGATC3' ve CBR 5'TACCGTGTGTGAGATGTCATTGAT3' olarak tasarlanıp Iontek (İstanbul) firmasında sentezlenmiştir. Primerler, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metoduyla 106 bp uzunluğunda bir fragment oluşturmaktadır.

3.2.3. Moleküler Teknikler

3.2.3.1. PCR Şartları

Öncelikle, gen bölgesi amplifikasyonu sırasında kullanılacak olan primerlerin kullanma konsantrasyonu araştırılmıştır. PCR reaksiyonu öncelikle 5, 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 pmol'lük son primer konsantrasyonu ile başlatılmış (forward ve reverse primerler) ve en iyi sonucun 20 pmol'de olduğu gözlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yolu ile genin amplifikasyonu, 400 ng/ml genomik DNA, 1 µl F ve R primer (20 pmol/µl), 5 U DNA polimeraz (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, %

50 gliserol ve % 1 Triton X-100 içerisinde), 1 µl dNTP (250 µM), 4 µl PCR buffer (10x) ve 32 µl d h²O içeren toplam 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirilmiştir.

PCR şartları, ilk denaturasyon için 95 C'de 5 dk.; bunu takiben amplifikasyonun 35 döngü süresince 95 C'de 1 dk. (denaturasyon), 61 C'de 1 dk. (yapışma), 72C'de 1 dk. (uzama) olarak belirlenmiştir. 35 devirlik süre sonunda, kalan dNTP'lerin eliminasyonu için 72 C'de 7 dk. (uzama) eklenmiştir.

3.2.3.2. PCR Sonrası Jel Analizi

PCR ürünlerinin analizini yapmak amacıyla, % 1'lik agaroz jel Tris-Brote-EDTA Tamponu (TBE) (1 x) ile 90 ml olarak hazırlanmış ve mikrodalga fırında homojen bir şekilde çözdürülerek, elektroforez aparatlarından olan jel tablasının içerisine dökülmüştür. Jel dökülmeden önce, jel tablasının içerisine uygun bir şekilde taraklar yerleştirilmiş ve böylece jel içerisinde yükleme kuyucukları oluşturulmuştur. Daha sonra, elde edilen jel elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir.

Ürünlerin jele yüklenmesi aşamasında, 5 µl PCR ürünü ile 1 µl yükleme boyası karıştırılmış ve kuyucuklara yüklenmiştir. Daha sonra jele yüklenen PCR ürünleri 100 W ve 45 Amper'de 75 dk elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez işleminde, koşturma tamponu olarak Tris-Brote-EDTA (TBE) tamponu (1 x) kullanılmıştır. Elektroforeze tabi tutulan jel, bantların görünmesini kolaylaştırmak amacıyla ethidium bromid (0.5 µg/ml) ile boyanmıştır. Boyanma sonrası jel, UV ışığı altında incelenmiştir.

3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz ile Kesilmesi ve Jel Analizi

106 bp'lik PCR ürünleri, bir restriksiyon endonükleaz olan *Bam*HI ile 37 °C'de 3 saat süreyle (üretici tavsiyelerine uyularak) kesilmiştir. Kesme reaksiyonu, 1,5 µl buffer, 1,5 µl BSA, 2µl BamHI, 10 µl PCR product enzimi içerecek şekilde toplam 15 µl'lik hacim içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Kesme sonrası ürünlerin analizi için %2'lik agaroz jel hazırlanmış ve örneklerin tamamı jele yüklenmiştir.

3.2.4. Veri Analizi

3.2.4.1. Gen Frekanslarının Hesaplanması

Leptin polimorfizmi bakımından populasyonların genetik potansiyeli, bir gen yerinde açılım gösteren ve otozomlarla taşınan kodominant eşgenlerin kombinasyonuna dayanmaktadır. Bu genotiplerin dağılımları ve populasyonda bulunma ihtimalleri Hardy-Weinberg teoremine uymaktadır. Buna göre, panmiksia şartları altındaki bir populasyonda; C ve T gibi bir gen yerinde yerleşmiş olan erkek ve dişi üreme hücrelerinde sırasıyla p ve q oranında bulunan leptin eşgenlerinin serbestce birleşmesiyle, meydana gelen CC, CT ve TT genotiplerinin frekansları, sırasıyla p², 2pq ve q² kadardır ve toplamları bire eşittir.

Leptin genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg genetik dengesine uyumu k = genotip, r = eşgen sayısını göstermek üzere k-r serbestlik dereceli ki-kare analizi ile test edildi. Bu

analizde, beklenen değerler genotip frekansları ile populasyonu oluşturan toplam fert sayısının (N) çarpımından, yani p^2N , $2pqN$ ve q^2N şeklinde tahmin edilmiştir.

Gen frekanslarının tahmini, leptin genotip sayılarından elde edilmiştir.

Buna göre;

leptin C geninin frekansı;

$$P(C) = p = \frac{2CC + CT}{2N},$$

leptin T geninin frekansı;

$$P(T) = q = \frac{2TT + CT}{2N}, \text{ formülleri ile bulunmuştur.}$$

Gen frekanslarının standart ayrılışlarının hesaplanmasında ise;

$$\sigma_q = \sqrt{\frac{q(1-q)}{2N}}$$

formülü kullanılmıştır. Burada, q verilen eşgenin frekansını, N incelenen toplam hayvan sayısını göstermektedir (Vanlı ve ark. 2009).

3.2.4.2. Normalize Eşdeğerlik ve Standart Genetik Mesafe Hesabı

Populasyonlar arasındaki genetik uzaklıkların tahmini için Nei (1972)'nin Original Genetik Distance (D) yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca Nei (1972)'nin genetik uzaklık değerleri kullanılarak yapılan kümeleme analizinde, dendogramlar için UPGMA (unweigthed pair-group method) metodu uygulanmıştır. Analizlerin yapılmasında TEPGA bilgisayar paket programından yararlanılmıştır (Miller, 1997).

$$\text{Normalize eşdeğerlik : } I_{XY} = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X * J_Y}}$$

$$\text{Standart genetik mesafe : } D_{XY} = - \ln (I_{XY})$$

formülü ile hesaplanmıştır. Bu formüllerde yer alan terimlerden;

J_X : populasyonunda ortalama homozigotluk

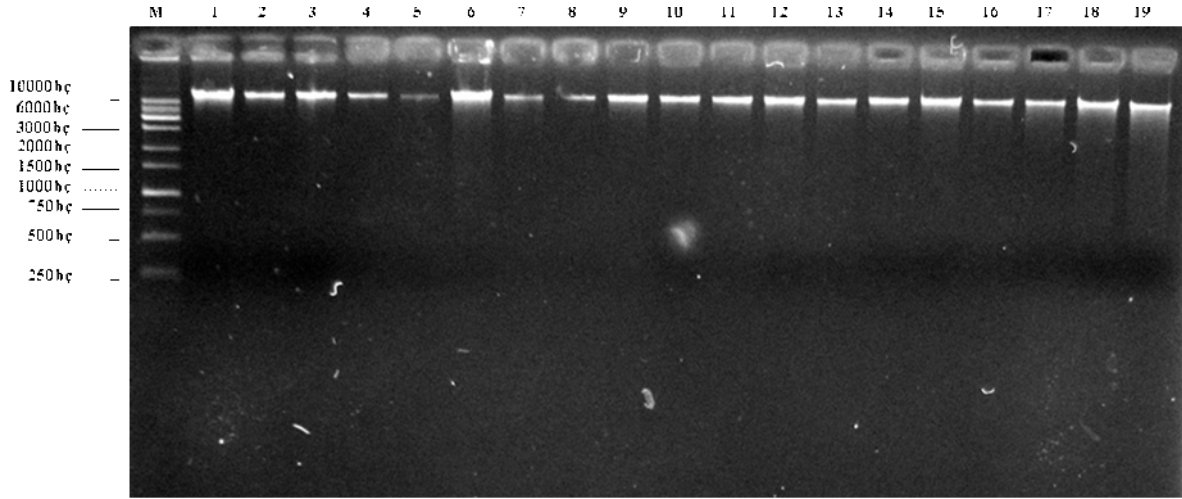
J_Y : y populasyonunda ortalama homozigotluk

J_{XY} : populasyonlar arasında ortalama homozigotluğu ifade etmektedir (Vanlı ve ark. 2009).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kan Örneklerinin Genomik DNA İzolasyonu

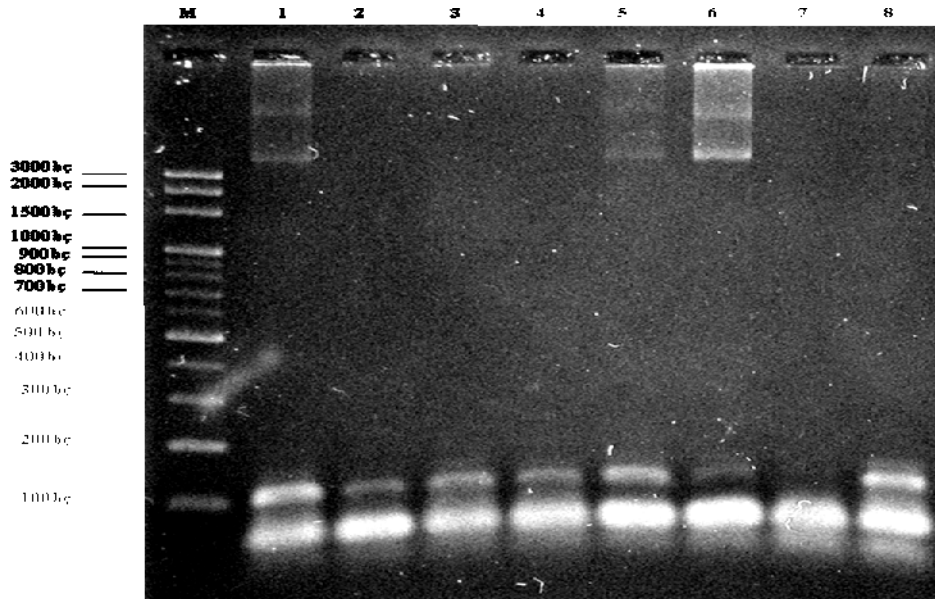
Araştırmada karışık sürülerde bulunan 38 DAK, 16 Esmer İsviçre ve 45 Yerli Kara ırkı sığırdan kan örneği alınmıştır. Ancak DAK ırkına ait kan örnekleri bir başka proje kapsamında değerlendirildi için bu çalışmada kullanılmamıştır. Alınan kan örneklerinden izole edilen DNA örneklerinden 19 tanesi verilmiştir. (Şekil 4.1) Diğer örnekler jelde görüntülenmiş ancak burada verilmemiştir.



Şekil 4.1. İzole edilen kromozomal DNA örnekleri jel görüntüsü M: 1kb'lik markör

4.2. Leptin Geninin PCR Analizi

Leptin gen bölgesine uygulanan PCR ürünlerinin jel analizi yapılmış ve sonuçta 100 bp'lik markör seviyesinde 106 bp uzunluğunda bantlar meydana geldiği gözlenmiştir ve 8 adet örnek şekil 4.2'de gösterilmiştir.



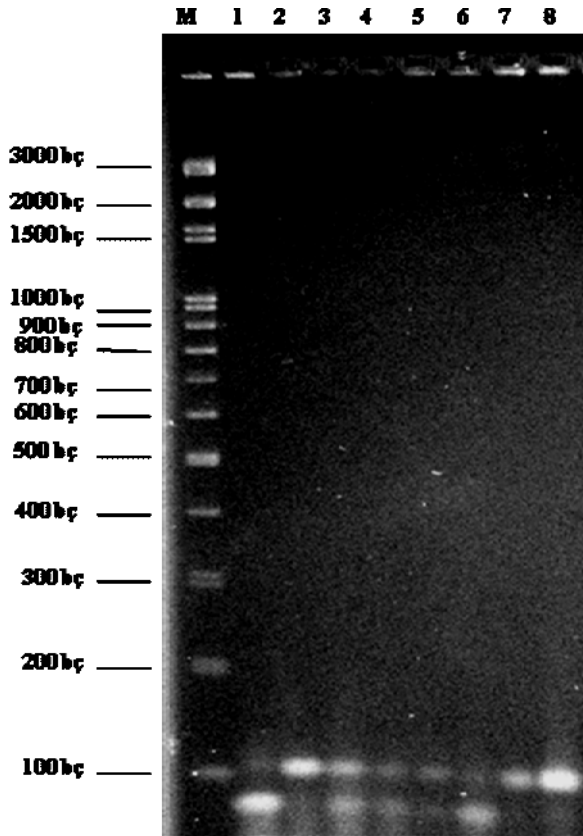
Şekil 4.2. PCR analizi yapılan leptin geninin, 106 bp uzunluğundaki gen bölgesi.

4.3. PCR Ürünlerinin Kesilmesi

PCR ürünlerinin restriksiyon *Bam*HI enzimi (GGATCC) ile kesilmesi ve kesme sonrası jel analizi, Şekil 4.3'te anlatıldığı üzere yapılmıştır..

Kesme sonrası jel fotoğraflarında üç farklı sonuç gözlenmiştir.

- 1- Kesme işleminin gerçekleşmediği dolayısı ile genotipin TT (2) durum.
- 2- Kesme işlemi sonucunda 106 ve 73 bp uzunlukta iki bantın görüldüğü CT genotipi(3).
- 3- Kesme işlemi sonucunda sadece 73 bp uzunlukta bantın olduğu CC genotipi(6).



Şekil 4.3. Kesme reaksiyonu sonrası jel analizi, M: 100 bp'lik markör

4.4. DNA Örneklerinin Genotiplendirilmesi

45 adet Yerli Kara ırkına ait DNA örneklerinin genotiplendirilmesi, kesme sonrası jel analizi sonuçları baz alınarak yapılmıştır. Şekil 4.2.'de anlatıldığı üzere iki farklı sonuç elde edilmiştir. Bunlardan, kesme işleminin gerçekleştiği 106 ve 73 bp uzunluğunda bant veren örnekler bulunmuştur.

4.4.1. Allel ve Genotip Frekanslarının Hesaplanması

Programaya girilen veriler sonrasında Yerli Kara sığır ırkına ait allel ve genotip frekans değerleri için hesaplanan sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yerli Kara ırkına ait 45 adet DNA örneğinin gözlenen genotipleri

Genotipler				Gen Frekansları	
CC	CT	TT	Toplam	p (C)	q (T)
11	25	9	45	0.52	0.48

Leptin T alleli için bulunan $q=0.48$ frekansı, Canadienne, Dashtiyari, Golpayani*Brown Swiss, Sistani, Manzadrani, Angus, Sarabi, Jersey, Hereford, Brown Swiss, Holstein ve Taleshi ırkları için (Buchanan ve ark.2003, Javanmard ve ark.2005, Buchanan ve ark. 2002, Javanmard ve ark. 2008, Choudhary ve ark. 2005, Buchanan ve ark. 2002, Javanmard ve ark.2005) bildirilmiş olan 0.06-0.48 değer aralığından yüksek, Jersey, Holstein, Taleshi, Brown Swiss ırkları için bildirilen (Buchanan ve ark., 2003, Komisarek ve Dorynek 2005, Nassiry ve ark. 2007, Nassiry ve ark., 2008, Szyda ve Komisarek 2007) 0.44-0.47 değerlerine benzer bulunmuştur

Diğer taraftan bu araştırmada leptin T alleli için bulunan frekans değeri, Ayrshire, Charolais, Golpayani, Hariana melezi, Holstein Friesian, Jersey, Sarabi, Shabestar, Simental, Sistani ırkları için bildirilmiş (Buchanan ve ark. 2002; Buchanan ve ark., 2003; Choudhary ve ark.2005; Javanmard ve ark.2005; Javanmard ve ark., 2008; Jawasreh ve ark.2009; Kulig ve ark. 2009; Nassiry ve ark.2007; Nassiry ve ark., 2008; Yazdani ve ark.2009) olan 0.18-0.40 değerlerinden yüksek bulunmuştur.

Genel olarak yapılan değerlendirme sonuçlarına göre bu araştırmada leptin T alleli için tespit edilen frekans değeri çoğu yerli ırk populasyonlarından daha yüksek, kültür ırkı populasyonlarında tespit edilen değere ise yakın bulunmuştur.

4.4.2. Hardy-Weinberg Denge Testi'nin Uygulanması

İki allelli diploid bir populasyonda, Hardy- Weinberg dengesini kontrol etmek için, öncelikle *CC*, *CT* ve *TT* genotipindeki bireylerin populasyondaki gözlenen sayıları (N_{CC} , N_{CT} ve N_{TT}) bulunmuş ve daha sonra gözlenen toplam birey sayısı ile ilgili genotiplerin frekans değerleri çarpılarak her bir genotip için beklenen değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Yerli Kara sığır irki için χ^2 testi

	Genotipler				Toplam	
	CC	CT	TT	Homozigot		Heterozigot
Gözlenen	11	25	9	20	25	45
Beklenen	12.15	22.5	10.35	22.5	22.5	45

$$\chi^2 = 0.56$$

Elde edilen sonuçlara göre, χ^2 hesap değeri, 0.56 'dir. Bu değer $\alpha=0.05$ önem düzeyinde ve $sd = 1$ serbestlik derecesindeki cetvel değerinden ($\chi = 3.84$) düşük olup yani $0.56 < 3.84$ olduğundan populasyon ilgili gen bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir.

Çizelge 4.3. Yerlikara sığır ırkına ait allel frekansı ile heterozigotluk-homozigotluk oranları

Homozigot			Heterozigot			Önemlilik	
Gözlenen(G)	Beklenen(B)	G/B	(G)	(B)	G/B	X	P
20	22.5	0.89	25	22.5	1.11	0.56	ö.s

Çizelgede verilen değerlere göre homozigotların gözlenen sayıları beklenen sayılarından % 11 daha az, heterozigotların gözlenen sayıları beklenen sayılarından % 11 fazladır. Bu durumda homozigotların heterozigotlara nisbi fazlalığı % 22 kadardır.

4.4.3. Normalize Eşdeğerlik ve Standart Genetik Mesafe Hesabı

Bu çalışmada normalize eşdeğerlik ve standart genetik mesafe hesabı için ayrıca 16 baş Esmer İsviçre ineğinden de kan örnekleri alınmıştır. Esmer İsviçre popülasyonunda gen frekansları ise $p(C) = 0.47$ ve $q(T) = 0.53$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Esmer sığır popülasyonuna ait genotip sayıları ile allel frekansları

	Genotipler					Toplam	Gen frekansları	
	CC	CT	TT	Homozigot	Heterozigot		p (C)	q (T)
Gözlenen	3	9	4	7	9	16	0.47	0.53
Beklenen	3.5	8	4.5	8	8	16		

Alt indis 1 ve 2 ler 1. ve 2. popülasyonu göstermek üzere

$$J_{11} = \sum p_i^2 = p_1^2 + p_2^2 = (0.52)^2 + (0.48)^2 = 0.5008$$

$$J_{22} = \sum q_i^2 = q_1^2 + q_2^2 = (0.47)^2 + (0.53)^2 = 0.5018$$

$$J_{12} = \sum p_i q_i = (p_1 q_1) + (p_2 q_2) = (0.52)(0.47) + (0.48)(0.53) = 0.4988$$

Buradan normalize eşdeğerlik;

$$I = \frac{J_{12}}{\sqrt{J_{11} J_{22}}} = \frac{0.4988}{\sqrt{(0.5008)(0.5018)}} = 0.995$$

Standart genetik mesafe;

$$D = -\log_e I = -\log_e(0.995) = 0.005$$

Bu sonuçlara dayanarak Yerli Kara sığır ırkı ile Esmer İsviçre sığır ırkı 0.995 oranında birbirine benzerlik gösterirken 0.005 oranında farkla birbirlerinden ayrılmaktadırlar (Şekil 4.4). Söz konusu bölgede uzun yıllardan beri kültür ırkı boğaların, özellikle yerli ırkları çevirme melezlemesi yolu ile ıslah edilmesi amacıyla kontrollü veya kontrolsüz olarak kullanılması sebebiyle Yerli Kara sürüsüne gen karışması olmuştur. Bu nedenle canlı ağırlık üzerine olumlu etkileri bulunan leptin T allel frekansı kültür ırklarında tesbit edilen değere daha yakın bulunmuştur. Aynı zamanda bölgedeki Yerli kara sürüsüne gen karışması olması sebebiyle de heterozigotluk değeri beklenenden daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.4. Genetik uzaklık değerlerine ilişkin matristen yararlanılarak çizilen UPGMA dendogramı

4.5. Leptin Polimorfizminin Vücut Ölçüleri ile İlişkisi

Araştırma kapsamında 34 Yerli Kara sığırdan göğüs çevresine ait ölçüler (cm) alınarak leptin polimorfizmi ile ilişkileri incelenmiştir. Genotiplere göre ortalamalar ve standart hataları ile önemlilik testi sonuçları Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Genotiplere ait göğüs çevresi ölçüleri

	N	X±Sx
Genel	34	138.000±18.855
Genotip		*
CC	8	133.125±5.975 ^b
CT	20	137.450±4.384 ^b
TT	6	153.000±7.831 ^a

*; önemli (P<0.05) a,b : aynı sütünde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P<0.05)

Leptin polimorfizminin göğüs çevresine etkisi önemli bulunmuştur (P<0.05). TT genotipli hayvanların göğüs çevresine ait değerler diğer genotiplere (CC ve CT) göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durumda TT genotipleri yönünde seleksiyon yapılması vücut ağırlığının artmasına katkıda bulunacaktır. Bu sonuçlar, Kulig ve ark., (2007), Kulig ve Kmiec (2008) tarafından Limuzin ırkında bildirilen sonuçlarla paralel niteliktedir. Ancak eldeki veri sayısının az olması yine de sağlıklı bir değerlendirme yapmayı güçleştirmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde sığırların % 26'sını oluşturan Yerli sığır ırkları kötü çevre koşullarında yaşayabilme ve düşük de olsa verimliliklerini sürdürebilme özelliğine sahiptirler. Gelecekte ıslah çalışmalarına temel oluşturacak genotipik varyasyonun elde tutulması, ancak gen kaynaklarının korunması ile mümkün olabilir. Gen kaynaklarının korunması heterozisin (gen çeşitliliği) korunması anlamına gelir. Gelecekte iklim, barınak, yem ve hijyen koşullarındaki olası değişiklikler göz önünde bulundurularak mevcut varyasyonun korunması, hatta artırılması gereklidir. Yerli ırklarımız üzerinde gelecek nesillerin de hakları vardır. Bu nedenle mevcut gen koleksiyonunu bozmaya veya ihmal etmeye hakkımız yoktur. Bu sebeple, hayvansal genetik kaynakların belirlenmesi ve bu bilgilerin uluslararası bir bilgi bankasında sağlıklı ve sürekli olarak biriktirilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla, ilk Uluslararası Hayvansal Genetik Bilgi Bankası, 1988'de Hannover Üniversitesi'nde kurulmuştur. FAO ve Avrupa Hayvansal Üretim Derneği (EAAP), bilgi bankasının kapasite-sinin genişletilmesi için katkıda bulunmuşlardır. Aynı yıl Afrika'da (Etiyopya ve Senegal), Asya'da (Çin ve Hindistan), Amerika'da da (Arjantin, Brezilya ve Meksika) örnek olarak kurulmuş ve çalışmalarına devam etmektedirler. Bölge ülkeleri tehlike altındaki ırkların spermalarını toplamak, saklamak ve merkeze ulaştırmakla sorumludurlar. Hayvan ırkını tanımlayan uzmanlar, bölgesel bankaya giren her ırkı tanımlayarak, gelecekte kullanılmak üzere bir genetik kodun bulunmasını sağlamaktadırlar. Gen haritalarının oluşturulması için geçiş ırklarına ait dokümanlara ihtiyaç vardır. Bir ırkın korunması ancak o ırka ait özelliklerin tam olarak tesbit edilmesi ile mümkündür. Bu sebeple ırkı tanımlayıcı morfolojik, fizyolojik ve genetik özelliklere ait bilgilerin elde edilmesi için çalışmalara bir an önce başlanmıştır.

Bu çalışmada, Türkiye'de en yaygın Yerli ırk olan Yerli Kara sığır ırkının leptin geni yönünden göstermiş oldukları genetik polimorfizmler, polimorfizmler yönünden sahip oldukları genetik yapı ve allel frekansları belirlenmiştir. Buna göre TT genotipli hayvanların, CC ve CT genotipli hayvanlara göre vücut ölçülerindeki gözlenen değişimler önemli seviyede bulunmuştur. Elde edilen veriler Türkiye'de yetiştirilen Yerli Kara sığır ırklarının genetik olarak tanımlanmasında ve genetik yönden sınıflandırılmasında kullanılacaktır.

Kullanılan örnek sayısının sınırlı olması sağlıklı bir değerlendirme yapmayı güçleştirmiştir. Ancak farklı bölgelerden alınacak yeni örneklerle çalışmaların devam ettirilmesi ırkın genetik yapısının sınıflandırılmasına yardım edecektir.

KAYNAKLAR

- ANONİM, 2004. Büyükbaş ve Küçükbaş Hayvan Gen Kaynakları Desteği (http://www.tugem.gov.tr/tugemweb/Gen_Kaynaklari_Destek.Html).
- ANONİM, 2006a. Igenity Testing Service. Erişim: (<http://www.igenity.com/>). Erişim tarihi: 15.09.2006.
- ANONİM, 2006b. INRA Biotechnology Laboratories Bovmap Database. Erişim: (<http://locus.jouy.inra.fr/cgibin/lgbc/mapping/common/summary.operl?BASE=cattle>). Erişim tarihi: 22.03.2006.
- BLACHE, D., TELLAM, R.L., CHAGAS, L.M., BLACKBERRY, M.A., VERCOE, P.E., MARTİN, G.B., 2000. Level of Nutrition Affects Leptin Concentrations in Plasma and Cerebrospinal Fluid in Sheep, *J. Endocrinol.* 165:625-637.
- BLOCK, S.S., BUTLER, W.R., EHRHARDT, R.A., BELL AW, VAN AMBURGH M.E. BOISCLAIR, Y.R., 2003. Decreased Concentration of Plasma Leptin in Periparturient Dairy Cows is Caused by Negative Energy Balance. *J. Endocrinol.* 171:339-348.
- BUCHANAN, F.C., FITZSIMMONS, C.J., VAN KESSEL, A.G., THUE, T.D., WINKELMAN-SIM D.C. AND SCHMUTZ, S.M. 2002. Association of a Missense Mutation in the Bovine Leptin Gene with Carcass Fat Content and Leptin mRNA Levels. *Genet. Sel. Evol.* 34:105-116.
- BUCHANAN, F.C., VAN KESSEL, A.G., WALDNER, C., CHRISTENSEN, D.A., LAARVELD, B. SCHMUTZ, S.M. 2003. An Association Between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and Milk and Protein Yield. *J. Dairy Sci.* 86:3164-3166.
- CHELIKANI, PK., AMBROSE, J.D., KEISLER, D.H., KENNELLY, J.J., 2004. Effect of Short Term Fasting on Plasma Concentrations of Leptin and Other Hormones and Metabolites in Dairy Cattle. *Domestic Anim. Endocrinol.* 26:33-48.
- CHOUDHARY, V., KUMAR, P., BHATTACHARYA, T.K., BHUSHAN, B., SHARMA, A., 2005. DNA Polymorphisms of Leptin Gene in *Bos indicus* and *Bostaurus* Cattle. *Genetics and Molecular Biology.* 28(4): 740-742.
- DELAVAUD, C., BOCQUIER, F., CHILLIARD Y., KEISLER, D.H., GERTLER, A., KANN G. 2000. Plasma Leptin Determination in Ruminants: Effect of Nutritional Status and Body Fatness on Plasma Leptin Concentration Assessed by a Specific RIA in Sheep, *J. Endocrinol.* 165:519-526.
- DELAVAUD, C., CHILLIARD, Y., LENDE, T. VAN DER (2006). Polymorphism in the Bovine Leptin Gene and their Associations with Physiological Characteristics in: *Proceedings of the International Genetics Conference. Animal Genetics.* 35:138-141.

- EHRHARDT, R.A., SLEPETIS, R.M., SIEGAL-WILLOTT, J., VAN AMBURGH ME, BELL AW, BOISCLAIR, Y.R., 2000. Development of a Specific Radioimmunoas say to Measure Physiological Changes of Circulating Leptin in Cattle and Sheep, *J. Endocrinol.* 166:519-528.
- FARNIR F., GRISART, B., COPPIETERS, W., MNI M., SIMON P., WAGENAAR D., 2002. Simultaneous Mining of Linkage and LD to fine Map QTL in Outbred half-sib Pedigriess: Revisitingthe Location of a QTL with Major Effect on Milk Productuon on Bowine Chorosome 14. *Genetics*, 161:275-287.
- FRIEDMAN M., JI.H. 2003. Fasting Plasma Triglyceride Levels and Fat Oxidation Predict Dietary Obesity in Rats. *Physiol Behav* ,. 78:767-772.
- GEARY, T.W., MCFADIN, E.L., MACNEIL, M.D. 2003. Leptin as a Predictor of Carcass Compozition in Beef Cattle. *Journal of Animal Science.* 81:1-8.
- HALE, C.S., HERRING, W.O., JOHNSON G.S., SHIBUYA H., LUBAHN, D.B., KEISLER, D.H.. 1998. Evaluation of the Leptin Gene as a Possible Marker of Carcass Traits in Angus Cattle. University of Missouri Beef and Dairy Research Report. pp 25-27
- ITOSSNER K.L. 1998. Celluar, Molecular and Physiological Aspects of Leptin: Potential Application in Animal Productuon. *Can J Anim. Sci.* 26:463-480.
- JAVANMARD, A., ASADZADEH, N., HOSSEIN BANABAZI M. AND JAVOD TAVAKOLIAN. 2005. The Allele and Genotype Frequencies of Bovine Pitvitary-Specific Transcription Factor and Leptin Gene in İranian Cattle and buffalo Populations using PCR-RFLP. *Iranian Journal of Biotechnology.* 25: 3-2.
- JAVANMARD A., MOHHAMMADABADI, M.R., ZARRIGABAYI, G.E. GHARAHEDAGHI, A.A., NASSIRY, M.R., JAVADMANSH A., ASADZADEH, N. 1998. Polimorphism within the Intron Region of the Bovine Leptin Gene in Iranian Sarabi Cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 44: 495-497.
- KHALEEL, I.Z., JAWASREH, F., AWAWDED, I. RAWASHDED, F. HEJAZEEN. 2009. The Allele and Genotype Frequencies of Bowine Pitvitary Specific Transcription Factor and Leptin Genes in Jordanian Cattle Population by using PCR-RFLP. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3): 1601-1606.
- KULIG, 2005a. Association Between Leptin Combined Genotypes and Milk Performance Traits of Polish Black-and-White Cows. *Arch Tierzucht* 48 (6) : 7-554.
- KULIG, 2005b. Associations Between Leptin Gene Polymorphism and Some Milk Performance Traits of Cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences* 14 (2): 235-243.
- KULIG, H., KMIEC M. 2008. Association Between Leptin Gene Polimorphisms and Growth in Limousin Cattle. *Russian Journal of Genetics*, 45: 738-741.

- KULIG H., KMIĘC M., INGA KOWALEWSKA- LUCZAK, GABRIĘLA ADZICK. 2009. Effect of Leptin Gene Polimorphisms on Milk Productuon Traits of Jersey Cows. Turk .J. Vet. Anim. Sci.; 33(2) :143-146.
- KOMISAREK, J., DORYNEK, Z. 2005. Polimorphisms of Leptin and Leptin Receptor Genes in the Polisch Population of Holstein- Friesian Bulls. Annals of Animal Science 5 (2) : 253-260
- KOMISAREK, J., SZYDA, J., MICHALAK, A., DORYNEK, Z., 2005. Impact of Leptin Gene Polimorphisms on Breeding Value form Milk Prodituon Traits in Cattle. Journal of Animal and Feed Scienses 14 (3) :491-500.
- KONFORTOV, B.A., LICENCE, MILLER JR., 1999. Re-sequencing of DNA from a Diverse Panel of Cattle Reveals a High Level of Polymorphism in Both Intron and Exon. Mamm Genome; 10(12):1142–5.
- LIEFERS, S.C., TE PAS M.F.W., VEERKAMP, R.F., VAN DER LENDE T. 2002. Associations Between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. J. Dairy Sci. 85:1633–1638
- LIEFERS, S.C., VEERKAMP, R.F., TE PAS MF, DELAVAUD, C., CHILLIARD, Y., PLATJE, M., VAN DER LENDE T. 2005. Leptin Promoter Mutations Affect Leptin Levels and Performance Traits in Dairy Cows. Anim Genet. 36(2):111-8
- LUSK, J.L. 2006. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in the Leptin Gene with Body Weight and Backfat Growth Curve Parameters for Beef Cattle. J. Anim. Sci. 85:1865-1872.
- MADEJA, Z., ADAMOWICZ, T., CHMURZYNSKA, A., JANKOWSKI, T., MELONEK, J., SWITONSKI, M., STRABEL, T., 2004. Short Communication: Effect of Leptin Gene Polymorphisms on Breeding Value for Milk Production Traits. J. Dairy Sci. 87:3925-3927
- MILLER, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for The Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data.
- NASSIRY, M.R., MOUSSAVI, A.H., ALASHAWKANY, A.R., GHOVATI, S., 2007. Leptin gene polymorphism in Iranian native Golpayegani and Taleshi cows. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 (20) :3738-3741.
- NASSIRY, M.R., SHAHROUDI, F.E., TAHMOORESPUR, M., JAVADMANESH, A., 2008. Genetic Variability and Population Structure in Beta-Lactoglobulin, Calpastain and Calpain Loci in Iranian Kurdi Sheep. Pak. J. Biol. Sci. 10: 1062-1067.
- NEI, M. 1972: Genetic Distance Between Populations. American Naturalist. 106:283-292.

- OPRZADEK, J., FLISIKOWSKI, K., ZWIERZCHOWSKI, L., DYMNIKI, E. 2003. Polimorphisms at Loci of Leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their Association with Growth, Feed Conversion and Carcas Quality in Black-and White bulls. *Animal Science Paper and Reports*. 21 (3):135-145.
- PINTO S, ROSEBERRY A.G., LIU H, et al. Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feding Circuits by Leptin. *Science* 2004; 304:110-115.
- POMP D, ZOU T, CLUTTER AC. AND BARENDSE W., 1997. Mapping of Leptin to Bovine Chromosome 4 by Linkage Analysis of a PCR-Based Polymorphism. *J. Anim. Sci.* 75:1427 (27)
- SADEGHI, M., MORADI SHAHR BABAK M., RAHIMI, G. AND NEJATI A. JAWAREMI. 2008. Effect of Leptin Gene Polimorphisms on the Breeding Volve of Milk Prodiotion Traits in Iranian Holstein. *Animal*, 2:7, 999-1002.
- SANTOS-ALVAREZ J, GOBERNA R. AND SA'NCHEZ-MARGALET V., 1999. Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes. *Cell. Immunol.* 194:6-11.
- SCHWERIN, M., BROCKMANN, G., VANSELOW, J., SEYFERT, H.M., 1995. Perspectives of Molecular Genome Analysis in Livestock Improvement. *Arch Tierz Dummerstorf.* 38: 21-31.
- SELLIER, P., 1994. The Future Role of Molecular Genetics in the Control of Meat Science 36:29-44.
- SZYDA, J., KOMISAREK, J. 2007. Statistical Modeling of Candidate Gene Effects on Milk Prodiotion Traits in Dairy Cattle. *J. Dairy. Sci.* 90:2971-2979.
- VANLI, Y., 1987. Atatürk Üniversitesi Koyun Sürülerinde Beta-Globulin Polimorfizminin Genetiği ve Kantitatif Karakterlerle Bağlantısı. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Zootečni Böl. (Profesörlük Takdim Tezi).
- VANLI, Y., KAYGISIZ, A., ORHAN H., 2009. Hayvan Islahı ve Genetiği. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No : 4, Yardımcı Ders Kitabı No : 4.
- WILKINS, R.J., DAVEY, H.W. 1997. A Polymorphisms Microsatellite in the Bovine Leptin Gene. *Anim. Genet.* 28:376-376.
- YAZDANI, H., RAHMANI, H.R., EDRIS M.A., DIRANDEH, E. 2009. Leptin Gene Polimorphisms Had No Effects on Open Days and Caluing İnterval. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.* 18:528-531.
- ZWIERZCHOWSKI, L., KRZYEWSKI, J., STRZALKOWSKA, N., SIADKOWSKA, E., RYNIEWICZ, Z. 2001. Effects of Polymorphism of Growth Hormone, Pit-1 and Leptin Genes, Cow's Age, Lactation Stage and Somatic Cell Count on Milk Yield

and Composition of Polish Black and White Cows. Animal Science Papers and Reports.20(4) : 213-227.

ZHANG, Y., SCARPACE, P.J., 2006. The Role of Leptin in Leptin Resistancence and Obesity. Physiol Behav. 88:249-256

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Kütahya’da doğdu. Lise Eğitimi 1996-1999 yılları arasında Kütahya Atatürk Lisesinde tamamladı. 2001 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvansal Üretim Programını kazandı ve 2005 yılında Zootekni bölümünden başarı ile mezun oldu. 2006 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalında başladığı Yüksek Lisans eğitimini Şubat - 2010 döneminde tamamladı.

Çiğdem BENGİ**2010**