

Eskişehir İlinde Yetiştirilen Bazı Koyun Irklarının CAST ve DGAT1 Genotiplerinin
Belirlenmesi

Göknur Bayrak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zootekni Anabilim Dalı

Eylül 2023

The Determination of CAST and DGAT1 Genotypes of Some Sheep Breeds Raised in
Eskişehir Province

Göknur Bayrak

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Animal Science

September 2023

Eskişehir İlinde Yetiştirilen Bazı Koyun Irklarının CAST ve DGAT1 Genotiplerinin
Belirlenmesi

Göknur Bayrak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği

Zootekni Anabilim Dalı

Biyometri ve Genetik Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi Tarafından BAP “2021-230A5” nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Eylül 2023

ONAY

Zootekni Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Göknur Bayrak'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Eskişehir İlinde Yetiştirilen Bazı Koyun Irklarının CAST ve DGAT1 Genotiplerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK

Üye: Prof. Dr. İsmail AKYOL

Üye: Doç. Dr. Taki KARSLI

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma TÜMSEK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK danışmanlığında hazırlamış olduğum “Eskişehir İlinde Yetiştirilen Bazı Koyun Irklarının CAST ve DGAT1 Genotiplerinin Belirlenmesi” başlıklı yüksek lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 09/10/2020 tarih ve 809 karar numarası ile izin aldığımı beyan ederim.
29/09/2023.

Göknur BAYRAK

İmza

ÖZET

Bu tez çalışmasında, Eskişehir İlinde halk elinde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında Calpastatin (CAST) ve Diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) gen polimorfizmi bakımından tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışmada toplam 176 koyundan (Orta Anadolu Merinosu (137), Pırlak (8), Romanov (10) ve Suffolk (21)) rastgele alınan kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. CAST ve DGAT1 genotiplerinin belirlenmesi için PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Çalışılan örneklerden DNA izolasyonu, DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. Uygun primerler kullanılarak çoğaltılan PCR ürünleri sırasıyla *MspI* ve *AluI* restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. %2'lik agaroz jellerinde elektroforez işleminden sonra elde edilen bant modellerinden yararlanılarak CAST ve DGAT1 genotipleri belirlenmiştir. CAST geni bakımından M ve N olmak üzere iki farklı allel üzerinde çalışılmış olup, Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında M ve N allel frekansları sırasıyla 0.67-0.33, 0.75-0.25, 0.75-0.25 ve 0.76-0.24 olarak hesaplanmıştır. CAST geni bakımından Pırlak koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu, Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı bulunmuştur ($P<0.05$). DGAT1 geni bakımından C ve T olmak üzere iki farklı allel üzerinde çalışılmış olup, Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında C ve T allel frekansları sırasıyla 0.60-0.40, 0.25-0.75, 0.80-0.20 ve 0.31-0.69 olarak hesaplanmıştır. DGAT1 geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu, Pırlak koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı bulunmuştur ($P<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Koyun, CAST, DGAT1, PCR-RFLP, Polimorfizm

SUMMARY

In this thesis study, it was aimed to identify Calpastatin (CAST) and Diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) gene polymorphisms in Central Anatolian Merino, Pırlak, Romanov and Suffolk sheep breeds raised in Eskişehir Province. Blood samples taken randomly from a total of 176 sheep (Central Anatolian Merino (137), Pırlak (8), Romanov (10) and Suffolk (21)) were used as material in the study. PCR-RFLP method was used to determine CAST and DGAT1 genotypes. DNA isolation from the studied samples was performed using a DNA isolation kit. PCR products amplified using appropriate primers were treated with *MspI* and *AluI* restriction enzymes, respectively. CAST and DGAT1 genotypes were determined using the band patterns obtained after electrophoresis in 2% agarose gels. In terms of CAST gene, two different alleles, M and N, were studied and the frequencies of M and N alleles were calculated as 0.67-0.33, 0.75-0.25, 0.75-0.25 and 0.76-0.24 in Central Anatolian Merino, Pırlak, Romanov and Suffolk sheep breeds, respectively. In terms of CAST gene, it was found that Pırlak sheep breed was in Hardy-Weinberg genetic equilibrium, while Central Anatolian Merino, Romanov and Suffolk sheep breeds were not in Hardy-Weinberg genetic equilibrium ($P < 0.05$). Two different alleles, C and T, were studied for DGAT1 gene and the frequencies of C and T alleles were calculated as 0.60-0.40, 0.25-0.75, 0.80-0.20 and 0.31-0.69 in Central Anatolian Merino, Pırlak, Romanov and Suffolk sheep breeds, respectively. In terms of DGAT1 gene, it was found that Central Anatolian Merino, Romanov and Suffolk sheep breeds were in Hardy-Weinberg genetic equilibrium, while Pırlak sheep breed was not in Hardy-Weinberg genetic equilibrium ($P < 0.05$).

Keywords: Sheep, CAST, DGAT1, PCR-RFLP, Polymorphism

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimde bilgi birikiminden yararlandığım; bu çalışma sırasında her türlü desteği sağlayan, laboratuvar aşamasında ve verilerin toplanmasında bilgi ve deneyiminden yararlandığım kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez yazım aşamasında maddi ve manevi desteği ile güç veren kıymetli hocalarım Prof. Dr. İsmail AKYOL, Doç. Dr. Taki KARSLI ve Doç. Dr. Yasin ALTAY teşekkürlerimi sunarım.

Hayvan materyallerinin alımında yardımcı olan Veteriner Hekim Abbas BİLGİÇ, Veteriner Hekim Halil İbrahim GÖRGÜN, Laborant Sefer ÇELİK, Laborant Mustafa Ölmez ve Laborant Hüsnü TUNCER'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında, iyi günde, kötü günde yanımda olan, desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, iyi kalpli sevgili arkadaşım, dostum Zekiye ACAR ÇELENK'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan, her zaman maddi ve manevi desteğini veren, başarılarımla gurur duyan, bana hep yol gösteren çok değerli eşim Gökhan BAYRAK'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu'na çalışmaya sağladığı finansal destekten dolayı teşekkür ederim.

Göknur BAYRAK

Yüksek Lisans tezimi sonsuz özlem ve sevgiyle dolu olduğum, canımın bir parçası, hayatımın anlamı, ışığı ve mucizem oğlum Barkın BAYRAK' a ithaf ediyorum.

Sevgili Oğlum Barkın BAYRAK anısına...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Koyun Yetiştiriciliği Önemi ve Türkiye’de Koyun Varlığı	4
2.2. Calpastatin (CAST) Geni	7
2.3. Diacylglycerol Acyltransferase1 (DGAT1) Geni	9
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)	11
2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)	14
2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	15
2.7. Araştırmada Kullanılan Yerli Koyun Irkları	15
2.7.1. Orta anadolu merinosu koyunu	15
2.7.2. Pırlak koyunu	16
2.7.3. Romanov koyunu	17
2.7.3. Suffolk koyunu	19
2.8. CAST Geni Polimorfizmi Yapılan Çalışmalar	20
2.9. DGAT1 Geni Polimorfizmi Yapılan Çalışmalar.....	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Hayvan Materyali	30
3.2. Kan Örneklerinin Alınması	30
3.3. Genomik DNA İzolasyonu	31
3.4. DNA’ların Miktar, Saflık ve Bütünlük Kontrolü	32

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
3.5. CAST Geninin PCR ile Çoğaltılması	33
3.6. DGAT1 Geninin PCR ile Çoğaltılması	35
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi Hazırlanması	38
3.8. CAST Geni PCR Ürünlerinin <i>MspI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	39
3.9. DGAT1 Geni PCR Ürünlerinin <i>AluI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	40
3.10. Agaroz Jellerdeki CAST ve DGAT1 Genotiplerinin Bilgisayara Aktarılması ...	42
3.11. CAST Genotiplerinin Belirlenmesi	42
3.12. DGAT1 Genotiplerinin Belirlenmesi	42
3.13. İstatiksel Analizler	43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	45
4.1. Bulgular	45
4.1.1. CAST geninin PCR ile çoğaltılması	45
4.1.2. DGAT1 geninin PCR ile çoğaltılması	45
4.1.3. CAST geni PCR ürünlerinin <i>MspI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmesi	45
4.1.4. DGAT1 geni PCR ürünlerinin <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmesi	46
4.1.5. CAST gen ve genotip frekansları	47
4.1.6. DGAT1 gen ve genotip frekansları	49
4.2. Tartışma	50
4.2.1. CAST geni polimorfizmi.....	50
4.2.2. DGAT1 geni polimorfizmi	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR DİZİNİ	60
EK AÇIKLAMALAR	68
Ek Açıklama-A: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu İzin Belgesi	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bereketli Hilal'deki evcil hayvan türlerinin kökeni	4
2.2. Türkiye'de kırmızı et üretimi	6
2.3. PCR reaksiyonu basamakları	13
2.4. Orta Anadolu Merinosu koyun ırkı	16
2.5. Pırlak koyun ırkı	17
2.6. Romanov koyun ırkı	18
2.7. Suffolk koyun ırkı	19
3.1. Koyun CAST geni nükleotid dizisi üzerinde kullanılan forward ve reverse primerlerin gösterilmesi	34
3.2. Koyun DGAT1 geni nükleotid dizisi üzerinde kullanılan forward ve reverse primerlerin gösterilmesi	36
3.3. CAST geni nükleotid dizisinde <i>MspI</i> kesim enziminin tanıma bölgesi	39
3.4. DGAT1 geni nükleotid dizisinde <i>AluI</i> kesim enziminin tanıma bölgesi	41
4.1. CAST/ <i>MspI</i> polimorfizminin %2'lik agaroz jel görüntüsü	46
4.2. DGAT1/ <i>AluI</i> polimorfizminin %2'lik agaroz jel görüntüsü	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Türkiye’de yıllara göre koyun varlığı	6
3.1. Kan örneklerinin alındığı ilçeler, ırklar ve örnek genişlikleri	30
3.2. CAST geni PCR karışımı	34
3.3. CAST geni PCR programı	35
3.4. DGAT1 geni PCR karışımı	37
3.5. DGAT1 geni PCR programı	37
3.6. <i>MspI</i> enzim kesim reaksiyonu	40
3.7. <i>AluI</i> enzim kesim reaksiyonu	41
3.8. CAST genotiplerinin belirlenmesi	42
3.9. DGAT1 genotiplerinin belirlenmesi	43
4.1. Eskişehir’de halk elinde yetiştirilen bazı koyun ırklarında CAST geninin allel ve genotip frekansları	48
4.2. CAST geninin gözlenen ve beklenen genotip frekansları ve ki-kare testi	48
4.3. Eskişehir’de halk elinde yetiştirilen bazı koyun ırklarında DGAT1 geninin genotip ve allel frekansları	49
4.4. DGAT1 geninin gözlenen ve beklenen genotip frekansları ve ki-kare testi	50
4.5. CAST geni PCR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmalarda tespit edilen M ve N allel frekansları	52
4.6. DGAT1 geni PCR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmalarda tespit edilen C ve T allel frekansları	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

Rpm	Rotor Per Minute (Bir Dakikadaki Rotor Devir Sayısı)
%	Yüzde
Nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
Cm	Santimetre
Kg	Kilogram
G	Gram
Sn	Saniye
Dk	Dakika
N	Örnek sayısı
bç	Baz çifti
>	Büyüktür
<	Küçüktür
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

Açıklama

CAST	Calpastatin
DGAT1	Diacylglycerol acyltransferase 1
PCR	Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
gDNA	Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
SNP	Single Nucleotide polymorphism-Tek Nükleotit Polimorfizmi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAPN	Kalpain
MAS	Marker Assisted Selection-Marker Destekli Seleksiyon
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (Etilendiamin Tetra Asetik Asit)
HW	Hardy-Weinberg
EtBr	Ethidium bromide
GN	Gümüş nitrat
dNTPs	Deoksiribonükleozid trifosfat
ddH ₂ O	Double-Distilled water
MgCl ₂	Magnezyum klorür
Mg ⁺²	Magnezyum
Ca ⁺²	Kalsiyum
M	Marker
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
UV	Ultraviyole
V	Volt
χ^2	Ki-kare
NBCI	National Library of Medicine
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TİGEM	Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü
TAGEM	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
HAYGEM	Hayvancılık Genel Müdürlüğü
M.Ö.	Milattan önce

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Her yıl ortalama 97 milyon artan dünya nüfusu Kasım 2022’de 8 milyarı geçmiştir. Dünyada insan popülasyonunun 1 milyar rakamına ulaşması, 200.000 yıldan fazla zaman alırken, 8 milyar rakamına ulaşması ise yaklaşık 200 yılda olmuştur (Wikipedia, 2023). Dünya nüfusunun artması ile beraber gıda maddelerine olan talep her geçen gün artmaktadır. Gıda maddelerine olan talebin karşılanması için hayvansal ve bitkisel üretim miktarlarının artırılması ve sürdürülebilirliği oldukça önemlidir. İnsanların sağlıklı ve dengeli beslenmesi için günlük diyetlerinin yaklaşık %42’lik kısmının hayvansal kaynaklı proteinlerden oluşması gerekmektedir (TİGEM, 2022). Hayvansal kökenli besinlerde bulunan proteinler içerdikleri esansiyel aminoasitlerden dolayı insan diyeti için hayati öneme sahiptir. Sağlıklı ve dengeli bir beslenme için insanlar her gün, vücudun temel ihtiyacı olan protein, yağ, karbonhidrat, mineral, vitamin ve su gibi besin maddelerini belirli oranlarda almak zorundadır. Yetişkin bir insanın, her bir kilogram canlı ağırlık için her gün 1 gram protein tüketmesi gerekmektedir. Gün içinde alınması gereken proteinin %40-42’si hayvansal kökenli olmalıdır. Hayvansal proteinler insanların gelişmesi, büyümesi ve yaşamlarını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmesi için vücutlarında sentezlenemeyen sekiz temel aminoasidi içermektedir. Hayvansal kaynaklı besinlerde bulunan protein miktarları ette %15-20, balıkta %19-24, peynirde %15-25 yumurtada %12 ve sütte %3-4 oranındadır. Kırmızı et hayvansal proteinler içerisinde protein oranı ve esansiyel amino asit içeriği bakımından ön plana çıkmaktadır. Türkiye’de kırmızı et ihtiyacı genellikle sığır, keçi, koyun ve manda yetiştiriciliğinden karşılanmaktadır (TİGEM, 2022).

Türkiye’de bir yıl içinde kişi başı tüketilen kırmızı et miktarı, ABD’ye ve Avrupa Topluluğu ülkelerine göre oldukça düşüktür. Türkiye’de artan nüfusun kırmızı et talebinin karşılanması aynı zamanda et açığının kapatılmasında koyun yetiştiriciliği önemli potansiyel barındırmaktadır. Artan nüfusumuza paralel olarak ortaya çıkan et açığının kapatılması için mevcut koyun ırklarımızın ıslah edilmesi, koyun eti üretimi amacı ile farklı bölge şartlarına uyum sağlayacak yeni genotiplerin ırkların geliştirilmesi önemlidir.

Çiftlik hayvanlarında genotip ve çevre (bakım, beslenme gibi) hayvanın verimini belirler. Çiftlik hayvanlarında ekonomik önemi olan çoğu özellik poligenik kalıtım izler. Bu nedenle hayvanın verimi çok sayıda genin etkisi ve çevre faktörleri ile şekillenir. Hayvandan elde edilen et veriminin artırılabilmesi için hayvan ıslahı çalışmalarının yapılması ve başarılı seleksiyon programlarının uygulanması gerekmektedir. Nüfusa bağlı olarak artan hayvansal kaynaklı protein taleplerinin karşılanması amacıyla klasik ıslah yöntemlerinin kullanılması tek başına yeterli olmamaktadır. Çiftlik hayvanlarında verim özelliklerini belirleyen gen bölgelerinin (aday genlerin) tanımlanması ve bu aday genlerin Marker Destekli Seleksiyon (MAS-Marker Assisted Selection) çalışmalarında kullanılabilmesi üzerine çalışmalar son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Balcıoğlu vd., 2014).

1934 yılında Watson ve Crick tarafından DNA'nın moleküler yapısının açıklanmasının ardından, özellikle 1983 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) teknolojisinin keşfi moleküler genetik alanında hızlı ilerlemeler yaşanmasını sağlamıştır. PCR yönteminin keşfi sonrası Mendel genetiği temelinde yapılan çalışmalar moleküler düzeye inmiş ve diğer marker yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Moleküler genetik biliminde yaşanan hızlı gelişmeler diğer alanlarda olduğu gibi çiftlik hayvanları ıslahında da yeni fırsatlar sunmuştur. Günümüzde çiftlik hayvanı ırk ya da tiplerinde çeşitli verim özelliklerinin miktar ve kalitesi ile ilgili aday genlerin belirlenmesine yönelik yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Calpastatin (CAST) genindeki polimorfizmi belirlemek için sığırlarda (Casas vd., 2006; Schenkel vd., 2006; Li vd., 2013; Sevane vd., 2014; Tait vd., 2014), koyunlarda (Palmer vd., 1998; Khan vd., 2012; Sunilkumar vd., 2014; Balcıoğlu vd., 2014) keçilerde (Khan vd., 2012) ve domuzlarda (Choi vd., 2006), Diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) genindeki polimorfizmi belirlemek için sığırlarda (Gill vd., 2009; Anton vd., 2011; Curi vd., 2011), koyunlarda (Xu vd., 2008; Yang vd., 2011; Noshahr ve Rafat, 2014) yapılan çok sayıda araştırma vardır.

Çiftlik hayvanlarında ekonomik verim özellikleri ile ilişkili olduğu belirlenen çok sayıda aday gen tespit edilmiştir. Bu genlerin çoğunun moleküler temelinde Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) olduğu anlaşılmıştır. SNP, bireyler arasında genom dizilerinde meydana gelen tek baz değişimidir ve en sık görülen polimorfizm türüdür (Wang vd., 1998). Günümüzde gelişen moleküler marker teknikler sayesinde SNP'ler kolaylıkla belirlenmektedir. SNP'ler PCR-RFLP (PCR-Restriksiyon

Uzunluk Parça Polimorfizmi) (Vicente ve Fulton, 2004), AS-PCR (Allel Spesifik-PCR) (Ghanem vd., 2008) ya da ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System) (Medrano ve Oliveira, 2014) gibi PCR tabanlı moleküler tekniklerle belirlenebilir.

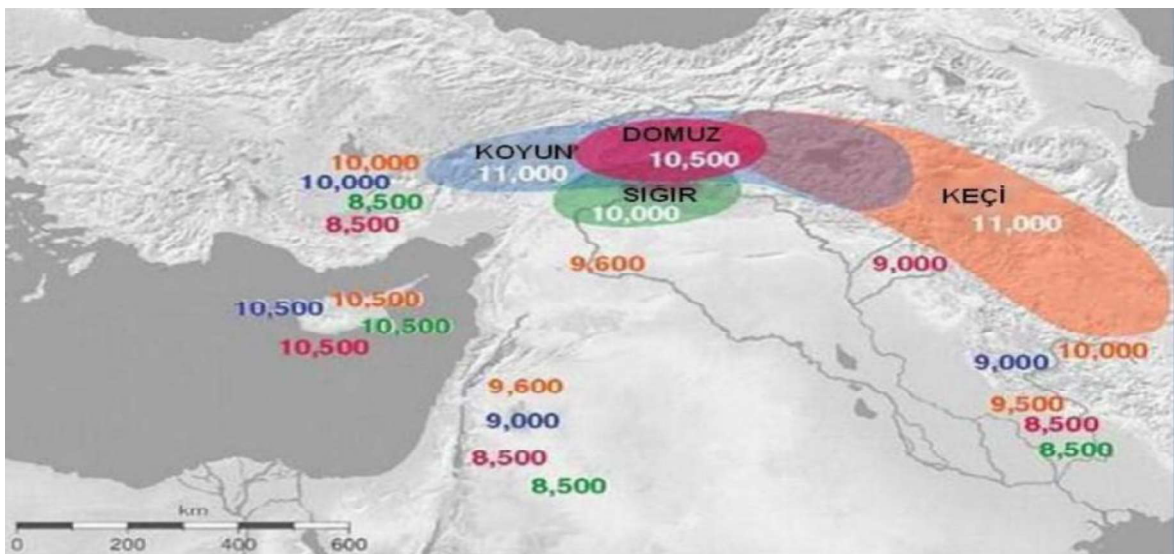
Son yıllarda koyunlarda et verimi ve kalitesi ile ilgili çalışılan çok sayıda aday gen vardır. Bu genlerden iki tanesi de CAST ve DGAT1 genleridir. CAST geni kas gelişiminde ve kesim sonrası etin yumuşamasında önemli bir rol oynar. DGAT1 geni yağ ve enerji metabolizmasındaki görevi sebebiyle karkas özellikleri ve koyunlarda et kalite özellikleri üzerine etkilidir.

Bu çalışmada Eskişehir İlinde halk elinde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında CAST ve DGAT1 gen bölgelerindeki polimorfizmin belirlenmesi, bu gen bölgelerinin ileride et verimi ve kalitesi ile ilgili yapılacak Marker Destekli Seleksiyon çalışmalarında kullanım olanaklarının tartışılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Koyun Yetiştiriciliği Önemi ve Türkiye’de Koyun Varlığı

Dünyada çiftlik hayvanları arasında ilk evcilleştirilen tür keçi daha sonra koyun olmuştur. Koyunun evcilleştirildiği bölge Akdeniz’in kuzey doğusunu ve Yakın Doğu’yu kapsayan Bereketli Hilal (Fertile Crescent) olarak adlandırılan coğrafyada olmuştur ve M.Ö. 10000’li yıllara kadar uzanmaktadır. Koyun hayvansal üretim olarak da insanlık tarihinde ilk yetiştirilen hayvan olarak gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda koyunların, Güneydoğu Anadolu ve Kuzeydoğu Irak bölgelerinde insan eli altında yetiştirilmeye başlandığı sonucu ortaya çıkmıştır. Evcilleştirme de çitler ile çevrilmiş alanlarda tutulan dişi hayvanlar ile yabani koçların çiftleştirilmesi sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Neolitik dönemde ise koyunlar yabani formlardan izole edilip yetiştirilmeye başlanmıştır. Bronz çağında Ortadoğu ülkelerinde et, süt ve yapağı verimlerine öncelik verilerek farklı koyun ırkları ortaya çıkmıştır. Dünyanın farklı bölgelerinde 200’den fazla koyun ırkı mevcut olup yetiştiriciliği yapılmaktadır (Zeder, 2008; Meadows, 2014). Dünyada koyun yetiştiriciliği Avrupa ve Asya’da kuzey enlemleri arasında, Güney Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda’da ise güney enlemleri arasında yer almaktadır (Morris, 2017).



Şekil 2.1. Bereketli Hilal’deki evcil hayvan türlerinin kökeni (Gedik, 2017)

Diğer hayvancılık kollarına nazaran koyun yetiştiriciliği; beslemesi, bakımı kolay olan, satın alması ve masrafları az, ürünleri daha değerli ve satışı da kolay olduğu için tercih edilmektedir. İnsanlığın ilk geçim kaynaklarının başında koyun yetiştiriciliği gelmektedir. İnsanların günlük ihtiyaçlarını karşılamak için yapağı, et, süt ve gübresinden faydalanılan koyun dünya genelinde yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. Geçmişten bugüne kadar koyun yetiştiriciliği her zaman cazip olmuş, bunun sonucu olarak da her zaman milyonlarca yetiştiriciye iş olanağı sağlayarak ekonomiye de önemli düzeyde destek olmuştur.

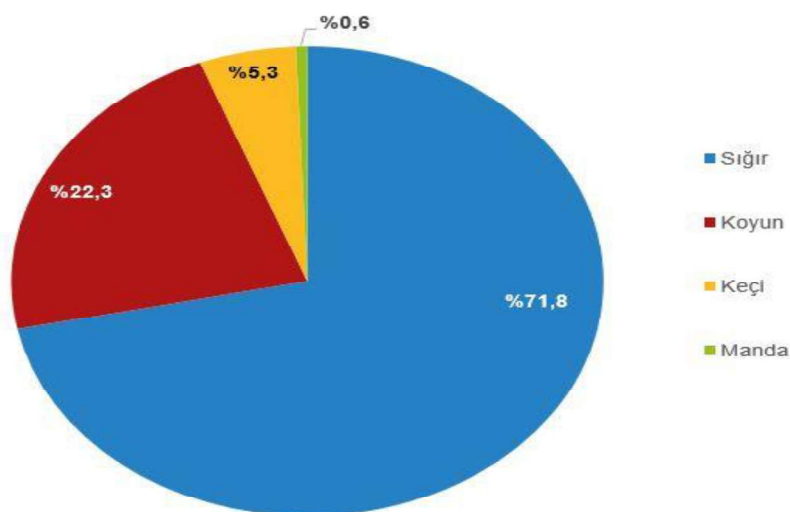
Türkiye’de koyunculuk hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahiptir ve genellikle küçük ölçekli aile işletmeleri tarafından yetiştirilir. Türkiye’de birçok farklı koyun ırkı mevcuttur ve bunların birçoğu yerli ırklardır. Türkiye’nin iklim koşulları ve coğrafi özellikleri, çayır ve mera alanları koyun yetiştiriciliği için elverişlidir. (Çelikeloğlu, 2012). Koyun eti, Türkiye’nin et üretiminin önemli bir bölümünü oluşturur ve Türk mutfağının vazgeçilmez lezzetlerinden biridir. Türkiye ekonomisi içerisinde ve insanların beslenmesinde koyun yetiştiriciliğinin önemi büyüktür.

Türkiye 46 milyonluk koyun varlığı ile Dünya sıralamasında üçüncü olduğu 1980’li yıllardan sonra, koyun varlığı gitgide azalarak 2010 yılında koyun varlığı 21,8 milyona gerilemiştir (Günaydın, 2009). Tarım ve Orman Bakanlığının başlattığı çalışmada, koyunları kimliklendirip küpe takılmasıyla bireysel kayıt tutulabilmesi sağlanmış, kayıtlar sayesinde hayvan ıslahının da başlamasıyla beraber koyun sayısında artış gerçekleşmiştir. 2005 yılında Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından başlatılan Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı Projesiyle koyunlarda yapılan ıslah çalışmaları hız kazanmış ve hayvan başına yetiştiricilere teşvik ödemeleri ile birlikte 2023 yılında Türkiye koyun varlığı 42.565.444 milyona yükselmiştir (Çelikeloğlu, 2012; TUIK, 2023).

Çizelge 2.1. Türkiye’de yıllara göre koyun sayısı (TUİK, 2023)

YIL	KOYUN (Baş)	YIL	KOYUN (Baş)
2002	25.173.706	2013	29.284.247
2003	25.431.539	2014	31.140.244
2004	25.201.155	2015	31.507.934
2005	25.304.325	2016	30.983.933
2006	25.616.912	2017	33.677.636
2007	25.475.293	2018	35.194.972
2008	23.974.591	2019	37.276.050
2009	21.749.508	2020	42.126.781
2010	23.089.691	2021	45.177.690
2011	25.031.565	2022	44.687.888
2012	27.425.233	2023	42.565.444

Türkiye’de toplam et üretiminin %60’ını kanatlı eti oluştururken kalan %40’lık kısmın %60’ı sığırlardan, %25’i koyunlardan, geriye kalan kısmı ise keçilerden ve mandalardan elde edilmektedir. Türkiye’de 2022 yılında kırmızı et üretimi 2 milyon 191 bin 65 ton’dur. Kırmızı et üretiminin %71.8’ini sığır etinden, %22.3’ünü koyun etinden, %5.3’ünü keçi etinden ve %0.6’sını manda etinden sağlanmaktadır (TUİK, 2022).

**Şekil 2.2.** Türkiye’de kırmızı et üretimi (HAYGEM, 2022)

Koyun eti insan beslenmesi için büyük bir öneme sahiptir. Koyun yetiştiriciliğinde en büyük gelir et üretiminden elde edilmektedir. Ancak hayvan başına düşen verimler azdır. Koyunculukta hayvan sayısını arttırmak yerine, kaliteyi ve hayvan başına düşen verim seviyesini arttırmak daha önemlidir. Hayvancılıkta verimi arttırmak için çok uzun yıllardır seleksiyon ve klasik ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Seleksiyon ve ıslah çalışmalarının amacı hayvancılıkta verimin artırılması için yapılan önemli uygulamalardır. Klasik ıslah çalışmalarında elde edilen genetik ilerleme sınırlı olmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde et verimi ve kalitesi, süt verimi, doğum gibi ekonomik özelliklere etki eden genetik karakterlerin çoğu etkisi küçük olan çok sayıda gen tarafından kontrol edilen ve çevre şartlarından çok fazla etkilenen kantitatif karakterlerdir. Kantitatif özellikleri kontrol eden genlerin araştırılması ve bu genlerin sahip oldukları çeşitliliklerin belirlenmesi moleküler genetik alanındaki gelişmeler sayesinde olmuştur. Moleküler genetikteki gelişmeler sayesinde kantitatif karakterlerde gözlenen varyasyonda etkisi olan genler belirlenebilmektedir. Hayvan yetiştiriciliğinde yapılan ıslah çalışmalarında hayvanlardan elde edilen fenotipik ve genotipik verilerin birlikte değerlendirilip kullanılmasıyla et verimleri artırılarak üreticiye daha karlı yetiştiricilik yapma fırsatı sunacaktır. Bu bilgiler ışığında et üretimi ve et kalitesi önemi ile ilgili araştırmalar yoğunluk kazanarak ilerlemektedir (Ata, 2012).

2.2. Calpastatin (CAST) Geni

CAST, ilk kez Kalpain (CAPN) aktivitesine sahip kas ekstraktlarında m-kalpainin saflaştırılması çalışmalarında keşfedilmiştir (Reville vd., 1976). İsmi ilk kez 1979 yılında Takashi Murachi tarafından bulunan CAST, sitozolde ve membranlarda bulunmaktadır (Murachi, 1989). Kalpain sistemi üç molekülden oluşmaktadır ve protein yıkımının düzenlenmesi, iskelet kas gelişimi, miyoblast göçü ve büyüme gibi farklı fizyolojik olaylarda önemli rol oynar. Kalpain sistemindeki üç molekülden iki tanesi kas hücrelerinden tespit edilmiş olup hücre içi kalsiyum iyonlarına (Ca^{+2}) bağımlı proteolitik enzimlerden μ - ve m-kalpaindir, üçüncüsü ise kalpain etkisini önleyici özellikte endojen bir protein olan kalpastatindir (Koohmaraie vd., 1988). Kalsiyum iyonlarının varlığı halinde aktif bir kalpain-kalpastatin kompleksini oluşturarak, hücresel fonksiyon üstünde önem arz eden bir

etkiye sahiptir. Kas proteinlerinin metabolizması, hücre farklılaşması, sinaptik iletişim, salgılama gibi önem arz eden yaşam süreçlerinin düzenlenmesini de sağlamaktadır. Kalpain aktivitesinin düşmesine CAST seviyesindeki artış sebep olur. Bu artış kas protein parçalanmasını artırıp kasların büyüme oranını azaltıp ya da kesim sonrası etin yumuşamasını hızlandırmaktadır (Goll vd., 1998). Ölüm sonrası (postmortem) geçen zamanda CAST geni kalpain aktivitesinin düşmeye başlamasıyla et gevrekliğini yani yumuşamasını düzenlemektedir (Kawasaki ve Kawashima, 1996). Kesim sonrası etin yumuşaklığı hayvanın genetik yapısına, kas proteinlerine, hayvanın kesim öncesi metabolik durumuna ve çevresel faktörlere önemli şekilde bağlıdır. Kesim sonrası etin yumuşamasında görev alan önemli sebeplerden birisi de ölüm sonrası kas proteinlerindeki proteolizin oranıdır (Goll vd., 1998; Ciobanu vd., 2004).

Kesim sonrası etin yumuşamasında ve kas gelişiminde önemli rol oynayan CAST geni sığırlarda 7. kromozom, koyunlarda 5. kromozom üzerinde bulunur. CAST geni 29 ekzondan oluşur, toplam boyu 89.576 bp'dir. Palmer vd. (1998) CAST geninin ekzon 1C ve 1D arasındaki ilk intronda yer alan polimorfizmi, *MspI* restriksiyon (kesim) endonükleaz enziminden faydalanarak PCR-RFLP yöntemiyle araştırmışlardır. CAST geni PCR-RFLP yöntemiyle *MspI* kesim enzimi ile kestikten sonra üç genotip belirlemişlerdir. MM genotipine sahip hayvanlarda 336 ve 286 bp'lik iki bant, MN genotipine sahip hayvanlarda 622, 336 ve 286 bp'lik üç bant ve NN genotipine sahip hayvanlarda 622 bp'lik tek bant olduğunu belirlemişler. Koyun CAST geninde M ve N olarak iki allel tespit edilmiş ve baskın olan allel M alleli olduğunu bildirmişlerdir (Palmer vd., 1998; NBCI, 2023a). CAST gen bölgesinde meydana gelen değişiklik Arginin (Arg) amino asidinin sentezinden sorumlu olan CGG kodonunun yerine Glutamin (Gln) amino asidinin sentezinden sorumlu olan CAG kodonu bulunmaktadır. Arginin (Arg) amino asidinin sentezinden sorumlu CGG kodonunda $G \rightarrow A$ (CGG \rightarrow CAG) şeklinde tek nokta mutasyonu meydana gelmekte ve Glutamin (Gln) amino asidinin sentezinden sorumlu olan CAG kodonuna sahip olan M alleli meydana gelmektedir. Bu tek nokta mutasyonu sonucu oluşan M alleleline sahip DNA'da *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma ($5'-C^+CGG-3'$) ve bir kesim noktası meydana gelmektedir (Gregula-Kania, 2011).

Khan vd. (2012) Balkhi ve Kajli koyun ırkları üzerinde yaptığı çalışmada CAST gen polimorfizminin canlı ağırlık artışındaki değişimlerini incelemişlerdir. MN genotipine sahip

koyun ırklarında günlük canlı ağırlık artışındaki değişimleri diğer genotiplere oranla daha fazla canlı ağırlık artışı gösterdiğini gözlemlemişlerdir. MN genotipinin günlük canlı ağırlık artışı üzerindeki etkisinin Balkhi koyununda doğumla sekiz ay arası, Kajli koyununda ise doğumdan dört aylık olana kadar önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bayraktar ve Shoshin (2022) İvesi koyun ırkında yaptıkları çalışmada MN genotipine sahip hayvanlarda en yüksek vücut uzunluğu, göğüs derinliğine sahip olduğunu ve MM genotipine sahip hayvanlarda en yüksek vücut ağırlığına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yılmaz vd. (2014b) Kıvırcık ırkı kuzularında yaptıkları çalışmada MM genotipine sahip hayvanların günlük canlı ağırlık artışı ile olumlu bir ilişki olduğunu bildirilmişlerdir. NN genotipine sahip hayvanların diğer genotipleri taşıyan hayvanlara göre daha yağsız karkasa sahip olduğunu bildirmişlerdir.

CAST geninde PCR-RFLP yöntemi haricinde, PCR-SSCP yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda mevcuttur. Sığırlarda yapılan çalışmada A, B, C olarak üç allel belirlenmiş ve et kalite özellikleriyle C alleli arasında bir ilişki olduğunu bildirilmiştir (Schenkel vd., 2006). Farklı koyun ırklarındaki CAST/*MspI* polimorfizmi çalışmalarda koyun canlı ağırlık ve büyüme özellikleri arasında istatistiksel yönden anlamlı bir ilişki olduğunu çalışmalarında bildirmişlerdir (Khan vd., 2012, Sunilkumar vd., 2014). Literatürde sığırlar için de yapılan araştırmalarda, CAST genindeki varyasyon ile karkas ve et kalite özellikleri arasında olduğunu bildirmişlerdir (Casas vd., 2006; Schenkel vd., 2006).

2.3. Diacylglycerol Acyltransferase1 (DGAT1) Geni

DGAT1 geni, DGAT enzim aktivitesine sahip bir proteini kodlayan ilk tanınan genidir (Cases vd., 2001). DGAT1 geninin hayvanlarda DGAT1 ve DGAT1K2 olarak iki çeşidi vardır. Bu enzimlerden Lizin amino asidini taşıyan, yüksek trigliserit (yağ) içeriği, düşük verimli süt ile ilişkilendirilmiştir. Alanin aminoasidini taşıyan varyant ise yüksek süt verimi, düşük trigliserit içeriği ile bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Giannoulia vd., 2000). DGAT1, yağ hücrelerinde (adiposit) trigliseritlerin sentezinde görev yapan bir enzimdir (Mayorek vd., 1989). Memeli trigliserit sentezinde bulunan son adımı katalize ettiği bilinen iki DGAT enziminden biri DGAT1'dir. DGAT1 hücrel trigliseritlerin metabolizmasında merkezi görev alır ve beraberinde hayvan ırklarının yağ birikiminde kilit bir görev görür. Enerji depolanması ve trigliserit sentezindeki rolüne ek olarak, DGAT1 ayriyeten bağırsak yağ emiliminde, lipoprotein düzenlenmesinde ve plazma triasilgliserol konsantrasyonlarının

düzene konulmasında, kaslarda enerji metabolizmasında, adipositlerde yağ depolanmasında ve memeli oositleriyle beraber süt üretiminde rol oynar (Cases vd., 1998). DGAT enzimini kodlayan DGAT1 geni birden fazla dokuda bulunmakla beraber en çok yağ dokusu ve ince bağırsakta bulunmaktadır (Buhman vd., 2002).

Literatürdeki araştırmalar, sığır ve koyun karkaslarında yağ birikimi ve DGAT1 geni arasında bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir. Koyunlarda bulunan sütteki yağ içeriğini artırmak için etkili olan genin DGAT1 olduğu gösterilmiştir (Curi vd., 2011; Mohammadi vd., 2013). DGAT1 geninin süt verimi üzerine etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, farelerde bulunan DGAT1 ve DGAT1K2 genlerini çıkarttıklarında laktasyonun gerçekleşmediğini gözlemlemişlerdir. Neden olarak meme bezinde gerçekleşen trigliserid sentez yetmezliğinden ya da sentez reaksiyonunun bozulması kaynaklı olabileceğini bildirilmiştir. Bu çalışmada DGAT1 geninin memeli canlılar için süt verimi ile ilgili özellikleri açısından aday gen olabileceğini belirtmişlerdir (Winter vd., 2002).

DGAT1 geni koyunlarda 9. kromozom üzerinde yer alır, 17 ekzondan oluşur ve toplam gen uzunluğu 8.704 bp'dir (Barillet vd., 2005; Xu vd., 2008; Yang vd., 2011; NCBI, 2023b). Yang vd. (2011) yaptıkları çalışmada DGAT1 geninin 17. ekzonundaki polimorfizmini *AluI* restriksiyon endonükleaz enziminden faydalanılarak PCR-RFLP yöntemiyle araştırmışlar. Koyun DGAT1 geni PCR-RFLP yöntemiyle *AluI* kesim enzimi ile kesildikten sonra üç genotip belirlemişlerdir. TT genotipine sahip hayvanlarda 272 ve 37 bp'lik iki bant, CT genotipine sahip hayvanlarda 309, 272 ve 37 bp'lik üç bant ve CC genotipine sahip hayvanlarda 309 bp'lik tek bant olduğunu belirlemişler. DGAT1 geninde C ve T iki allel tespit etmişler ve C allelinin baskın olduğunu bildirmişlerdir. DGAT1 gen bölgesinde meydana gelen değişiklik Alanin (Ala) amino asidinin sentezinden sorumlu olan GCC kodonunun yerine yine Alanin (Ala) sentezinden sorumlu olan GCT kodonu bulunmaktadır. Alanin (Ala) amino asidinin sentezinden sorumlu GCC kodonunda C→T (GCC→GCT) şeklinde tek nokta mutasyonu meydana gelmekte ve Alanin (Ala) sentezinden sorumlu olan GCT kodonuna sahip olan T alleli meydana gelmektedir. Bu tek nokta mutasyonu sonucu oluşan T alleleline sahip DNA'da *AluI* restriksiyon endonükleaz enzimi için bir tanıma (5'-AG⁺CC-3') ve bir kesim noktası meydana gelmektedir (Yang vd., 2011).

Xu vd. (2008) Tan, İç Moğolistan ve küçük kuyruklu Han koyun ırklarında yaptıkları çalışmada DGAT1 geninin TT genotipine sahip hayvanlarda kas mermerleşme yapısına, daha yüksek kas içi yağ içeriğine sahip olduğunu, daha düşük kesme kuvvetine ve daha düşük sızma kaybı oranı olduğunu bildirmişlerdir. Noshahr ve Rafat (2014) Moghani koyun ırkında yaptıkları çalışmada CC genotipine sahip koyunlarda daha yüksek karkas verimi ve karkas ağırlığına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Mohammadi vd. (2013) Zel ve Lori-Bakhtiari koyun ırklarında yaptıkları çalışmada ve Meena vd. (2016) Malpura koyun ırkında yaptıkları çalışmada CC genotipine sahip hayvanlarda daha fazla sırt yağı kalınlığı, daha fazla kuyruk yağı ağırlığına eriştiklerini ve karkas ağırlığını artırma eğilimi olduğunu bildirmişlerdir. Mahrous vd. (2014) Barki, Rahmani ve Osseimi koyun ırklarında yaptıkları çalışmada ve Altwaty vd. (2020) Barki koyun ırklarında yaptıkları çalışmada CT genotipine sahip hayvanların orta derecede kas mermerleşme yağ yapısı ve kas içi yağ içeriğine olumlu yönde etki ettiğini bildirmişlerdir. Bayram vd. (2018) Akkaraman koyun ırkında yaptıkları çalışmada CT genotipine sahip hayvanların doğum ağırlığı üstüne olumlu bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

DGAT1 yağ ve enerji metabolizmasındaki görevi sebebiyle, sütçü keçi ve koyunlarda sütteki yağ oranı, karkas özellikleri ve koyunlarda et kalite özelliklerini geliştirmeye aday bir gendir (Yang vd., 2011). Etçi sığır ırklarında yapılan çalışmalarda ise DGAT1 geninin subkutan ve intramusküler kas birikimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gill vd., 2009; Anton vd., 2011). Et gevrekliği, et üretim kısmında çok önemli bir konu olmakla beraber tüketicilerin memnuniyeti üstünde de önemli bir etkiye sahiptir. Kas içi yağ içeriği ve karkasın deri altı yağ içeriği etin gevrekliği ile alakalıdır. Bu yüzden, yağ asidi metabolizmasında yer alan genler, et hassasiyeti açısından aday genler olarak kabul edilmişlerdir. DGAT1 geni yağ dokusunda ve meme bezinde bulunduğu gibi aynı şekilde iskelet kası dokusunda da bulunduğu tespit edilmiştir (Xu vd., 2008).

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) üstünde yer alan, dizisinin bilindiği iki bölüm arasındaki özgün olan bir bölgeyi DNA Polimeraz enzimi kullanarak çoğaltmak için laboratuvar koşullarında yapılan DNA sentez yöntemidir. Bu

yöntem ile DNA molekülünün istenildiği kadar kopyasını yapmak mümkündür (Mullis, 1990).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, doğal DNA kopyalama (replikasyon) işleminin ana bileşen ve basamaklarından yararlanılarak herhangi bir canlıya ait olan DNA'da bulunan istenilen bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan kolay ve çok başarılı olan bir in vitro DNA sentez metodudur. Kolay ve basit enzimatik tepkimeyle çok kısa sürelerde bir kalıp DNA molekülünün istenildiği kadar miktarda kopyasının yapılmasını sağlayan yöntemdir. PCR yöntemi 1985'de Cetus biyoteknoloji şirketinde çalışmakta olan Dr. Kary Banks Mullis tarafından bulunmuştur. 1993 yılında ise PCR buluşu sayesinde Mullis'e Kimya alanında Nobel ödülü kazandırmıştır (Gedik, 2017).

Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA replikasyonunun temel bileşenlerini kullanarak nükleotitler için en uygun koşullarda tüpte çoğaltılmasını sağlamayan yöntemdir. PCR yöntemi ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için karışımda; çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki nükleotid dizilerini tamamlayarak sentez yapan bir çift sentetik oligonükleotitler (primer), bu primerlere bağlanıp 3' ucundaki nükleotitleri ekleyerek sentezleyecek DNA Taq polimeraz enzimi, DNA Taq polimeraz enziminin çalışması için gerekli olan magnezyum (Mg^{+2}), sentezde ve tampon çözeltide kullanılacak deoksiribonükleozit trifosfatlar (dNTP's) gereklidir (Saiki vd., 1985; Gedik, 2017).

Polimeraz zincir reaksiyonu içerisinde üç ana basamak vardır ve çoğaltılmak istenen ürünün miktarı, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır. Polimeraz zincir reaksiyonu basamakları denatürasyon, primer bağlanması, uzamadır.

Denatürasyon: DNA'nın çift sarmal yapısını 94-98 °C kadar bir sıcaklık altında, baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarının kırılmasıyla birbirinden ayrılarak tek zincir hale getiren ilk adımdır. Ortamdaki tüm DNA çift sarmal yapıları tek zincir haline geçtiğinde reaksiyon tamamlanır. Denatürasyon (eksenlerin ayrılması) PCR'in ilk aşamasıdır.

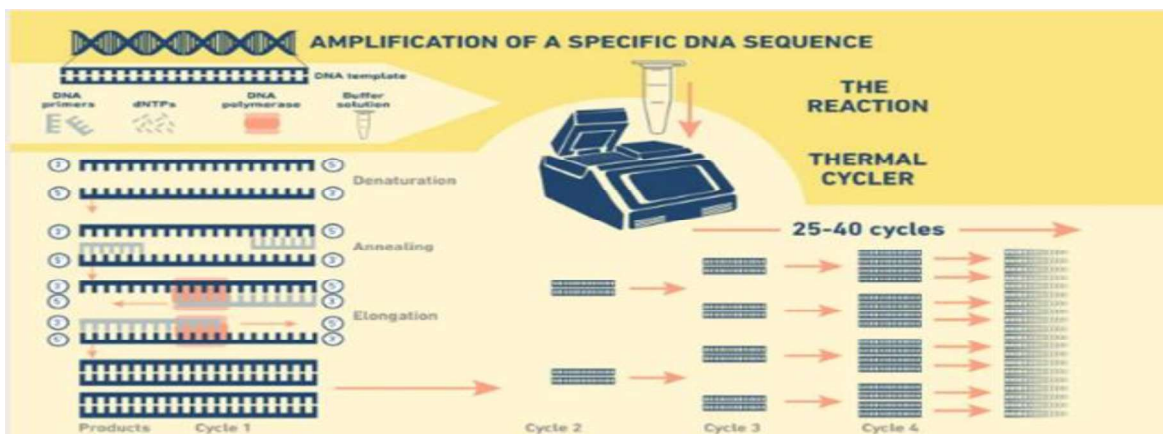
Primer bağlanması (annealing, hibridizasyon): Sıcaklığın 40-72 °C'ye kadar düşürülerek (optimum 55°C) ilk adımda tek zincir hale gelmiş olan DNA'lara sentetik oligonükleotid primerlerin bağlanması aşamasıdır. Sıcaklık düştükçe tek zincirli DNA

iplikçikleri primerle bağlanır. Bazlık tek sarmal yapıya sahip DNA dizilerine primer denir. Primerlerin üstünde olan bazlara göre bağlanma sıcaklıkları farklılaşır. Primer bağlanması (annealing) derecesi primerin baz uzunluğuna ve içeriğine göre değişken değer alır. Her primer için ayrı ayrı hesaplanması gerekmektedir.

Uzama (extension, polimerizasyon): 72 °C'da Mg^{+2} iyonlarıyla beraber Taq DNA polimeraz enzimi, primerlerin 3' OH uçlarına deoksिनुकleosid trifosfat (dNTP) ekleme yaparak yeni DNA iplikçigini uzatır ve böylece yeni DNA zincirleri sentezlenir. DNA'nın sentezlendiği son aşama uzamadır. Bu aşamada kullanılan DNA Taq polimeraz enzimi yüksek sıcaklığa dayanıklı olmalıdır. Bir döngü sonunda her DNA çift sarmal yapısına sahip olur yani DNA tekrar iki katına çıkmış olur (McPherson ve Moller, 2001).

PCR metodunun gelişmesindeki en önemli sebep Taq Polimeraz enziminin bulunmasıdır. Çünkü yüksek sıcaklıklara dayanabilen tek enzim Taq Polimeraz enzimidir. Taq Polimeraz enzimi ilk olarak Yellowstone milli parkı içerisinde bir kaplıca içinde bulunan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilerek kullanılmıştır.

Bu PCR döngüsünün tekrar tekrar yapılmasıyla istenilen miktarda DNA bölgesi çoğaltılmış olur. Her PCR döngüsü sonucunda DNA miktarı, çoğaltılması istenen bölgenin iki katına çıkmasıyla sonuçlanmış olur. PCR metodu, "thermo cycler (ısı döngüleyici)" cihazlarda, sıcaklıkları ve döngü sayılarının önceden belirlenmesiyle otomatik olarak yapılmaktadır.



Şekil 2.3. PCR reaksiyonu basamakları (WordPress.com, 2023)

PCR metoduyla elde edilen DNA parçaları agaroz ya da poliakrilamid jellerde belirlenen programlarla yürütülüp daha sonrasında, ethidium bromide (EtBr) ya da gümüş nitrat (GN) ile boyanarak görüntülenmektedir.

2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)

Moleküler biyolojide yaşanan önemli bir gelişmede DNA molekülünü belirlenmiş nükleotidlerden kesmeye yarayan bakteriyel kökenli restriksiyon enzimlerinin keşfedilmesi ile olmuştur. DNA'larda araştırılan genlerin polimorfizmlerini belirlemek için araştırmalarda oldukça tercih edilen bir yöntemdir (Özdil, 2007). PCR ile çoğaltılmış hedef DNA bölgesi üzerinde belirli bölgelerden tanıyıp kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerle belli sıcaklık ve sürelerde inkübasyona bırakılarak kesilmesi işlemidir. PCR ürünlerinin, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilip elektroforez işleminden sonra oluşan bantların UV ışığı altında renk veren boyalar ile boyanarak, kesim sayısına bağlı karşılaştırma ve baz uzunluklarına göre sıralanması hususuna dayanan genotipleme işlemine "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), "Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi" denir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri belirlenen tanıma bölgesinden DNA çift zincirini kesmektedir. Restriksiyon enzimleri için farklı kesim bölgelerini, DNA parçasında bir bölgenin delesyonu veya insersiyonu sonucu oluşan nükleotid dizilimlerindeki değişimler ya da DNA parçalarındaki tek nükleotid değişimleri belirlemektedir. Restriksiyon kesim enzimi ile kesilmiş DNA parçaları, molekül ağırlıklarına göre agaroz jel elektroforezinde yürütülerek ayrılmaktadırlar. DNA parçalarındaki SNP'lerin sebep olduğu gen belirlenirken, canlının fenotipindeki değişimlere sebep olan ve farklı proteinler sentezleyen bölgeleri belirlenen özel enzimlerle keserek kolay ve hızlı genotipleme yapılmaktadır (Pandey vd., 2012). Kullanıldığı alanlar geniştir, popülasyona ait polimorfizmlerinin, restriksiyon haritasının, rekombinat DNA'nın belirlenmesi ve genetik hastalıkların belirlenmesinde kullanılan yöntemdir (Kolören vd., 2017).

2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi ile çoğaltılan DNA parçalarının molekül büyüklüklerine istinaden ayrılmasını sağlayan yöntemdir. Agaroz jel elektroforezi elektrik akımı altında olan negatif yüklü DNA moleküllerinin pozitif yüklü uca doğru hareket etmesi DNA moleküllerinin ayırt edilebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu ayırım yöntemi, molekül ağırlığı büyük olan parçaların, molekül ağırlığı küçük olan parçalara göre daha yavaş hareket etmesi ilkesine göre çalışmaktadır. Agaroz jel elektroforeziyle DNA'ların izole edildikleri ve restriksiyon enzimi yöntemi uygulanan durumlarda molekül miktarlarına ve molekül ağırlıklarına göre elektriksel akımla eksiden artıya gidecek şekilde belirli oranlarda ilerleyip birbirlerinden ayrılmasıyla genotipleme işlemleri yapılabilir.

2.7. Araştırmada Kullanılan Yerli Koyun Irkları

Araştırmada Eskişehir İli Çifteler ilçesinde halk elinde özel işletmelerde yetiştirilen sürülerden Orta Anadolu Merinosu, Suffolk, Romanov, Pırlak koyun ırkları kullanılmıştır. Bu koyun ırklarının özellikleri aşağıda verilmiştir.

2.7.1. Orta anadolu merinosu koyunu

Orta Anadolu Merinosu koyun ırkı Konya Harasında 1952 yılında Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı tarafından başlatılan Alman Et Merinosu koçları x Akkaraman koyun melezlemesi çalışmalarından elde edilmiş ve halk arasında Konya Merinosu olarak da bilinen bir koyun ırkıdır. Melezleme çalışmaları sonrasında bu ırk %80 Alman Et Merinosu %20 Akkaraman genotipini taşımaktadır. Büyük çoğunlukla Konya, Ankara, Eskişehir illerinde yetiştirilmektedir. Alman Et Merinosu ırkından et verimini ve yüksek yapağı kabiliyetini almıştır. Yerli ırklardan sonra Orta Anadolu'nun kurak mera şartlarından en iyi şekilde yararlanabilen koyun ırkıdır. Akkaraman koyun ırkından yaşama gücü yüksek, Orta Anadolu'nun sert iklim şartlarına çok iyi uyum sağlamış ve hastalıklara karşı dayanıklılık özelliğini almıştır. Farklı çevre koşullarına uyum sağlama yeteneğinin iyi olması sebebiyle farklı coğrafi ve iklim koşullarında rahatlıkla yetiştirilebilen koyun ırkıdır. Mevsimlere ve meraların durumuna bakarak ek beslemeler yapılması gerekebilir.

Görünüm özellikleri olarak vücutları iri ve geniş, baş genişliği ve uzunluğu ortadır. Başın yüz kısmı ile bacakların alt kısımları çıplaktır. Bacaklar kuvvetli ve uzun, butlar etli ve dolgun, boyun kalın ve kısa, dudaklar kalın, kulaklar yatay ve geniştir. Vücut beyaz renkli yapağı ile örtülüdür. Yapağı ince ve bir örnek elyaftan oluşmaktadır. Akkaraman ırkından büyüme, canlı ağırlık, döl verimi ve yapağı kalitesi bakımından daha üstün bir ırktır. Dişilerin ve erkeklerin genellikle boynuzu yoktur. Kuyrukları yağsız, uzun ve incedir.

Verim özellikleri canlı ağırlıkları erkeklerde 85-90 kg, dişilerde ise 55-60 kg aralığındadır. Bir batında kuzu sayısı 1.4'tür. Kuzu doğum ağırlığı 4.5-5 kg arasındadır. Laktasyon süt verimi 40-50 kg arasında değişirken laktasyon süresi 150 gündür. Kirli yapağı verimi 3.6-3.8 kg, lüle uzunluğu 7.5-8 cm arasında, sortimanı ise 60-64S ölçülmektedir. Temiz yapağı oranı %54-58 arasındadır (TAGEM, 2009).



Şekil 2.4. Orta Anadolu Merinosu koyun ırkı (TAGEM, 2009)

2.7.2. Pırlak koyunu

Pırlak koyunu, yetiştirici elinde Kıvırcık ve Dağlıç yerli koyun ırklarının melezlenmesiyle ortaya çıkan, halk arasında Pırıt veya Pırık isimleriyle de bilinen yerli bir koyun ırkıdır. Olumsuz çevre koşulları, zayıf mera, kötü bakım ve besleme gibi koşullara zorlanmadan uyum sağlayarak, hastalıklara karşı oldukça dayanıklı olması sebebiyle yetiştiricilerin tercih sebebi olmuştur (Çelikeloğlu, 2012). Kütahya, Afyon, Uşak, Manisa, Burdur ve Isparta illerinde daha çok yetiştirilmektedir. Ağılları çoğunlukla tepe kısımlarına

yakın yerlere yapılmaktadır. Burdur ve Isparta illerinde dağların eteklerindeki kovuklara rüzgârdan korunaklı şekilde ağılları yapılmaktadır. Pırlak koyun ırkının beslenmesi kış aylarının dışında meralarda yapılmaktadır (Kaymakçı ve Sönmez, 1996).

Görünüm özellikleri olarak Pırlak koyun ırkı kombine şekilde verime sahiptir. Eti oldukça lezzetlidir. Vücutları beyaz renkte olup orta büyüklüktedir. Kulak uçlarında, ağız ve göz çevresinde ve ayaklarında siyah lekeler bulunmaktadır. Kulaklar ileriye doğru dönebilen, yere paralel veya yarı eğik yapıdadır. Dişiler boynuzsuzdur, erkekler spiral şeklinde boynuzlara sahiptir. Burun düzdür. Kuyruk ince ve az yağlıdır.

Verim özellikleri ise dişilerde canlı ağırlık 45-50 kg, koçlarda 50-60 kg arasındadır. Bir batında kuzu sayısı 1.2-1.5'dir. Laktasyon süt verimi 75-80 kg'dır. Laktasyon süresi 120 gündür. Yapağı verimi 2-2.5 kg'dır (TAGEM, 2009).



Şekil 2.5. Pırlak koyun ırkı (TAGEM, 2009)

2.7.3. Romanov koyunu

Romanov koyunlarının anavatanı Rusya'dır. Moskova'nın kuzeydoğusundaki yukarı Volga bölgesinden dünyaya yayılmıştır. Romanov kasabasından çıkan bu koyun ırkı kasabanın adını almıştır. Romanov koyunları ilk olarak 18. yüzyılda Rusya dışında fark edilmesiyle, Almanya'ya ve daha sonra Fransa'ya ithal edilmiştir. 1980 yılında ABD'ye götürülmüştür (Ricordeau vd., 1990). Günümüzde Romanov koyunu veya Romanov x yerli

ırk melezi dişiler, ağırlıklı olarak et üretiminde ana hat olarak yetiştirilmektedir. Vücut yağı bütün vücuda yayıldığından dolayı et lezzetini arttırmaktadır. Çevre şartlarına adaptasyonu çok iyidir, çünkü sıcaklığa ve soğuğa dayanıklı bir ırktır. Çevre şartlarına çok iyi adaptasyon gösterme özelliği; Romanov ırkında çift katlı yapağı örtüsü bulunması ve yapağın arasında yerleşik kılçık kılları mevsime göre değişik özellikler göstererek, mükemmel bir ısı izolasyonu sağlamasından kaynaklanmaktadır. Eşsiz deri kalitesi ve yapağı özelliğinden dolayı İngiltere ve Fransa’da düzenlenen dericilik fuarlarında ödüller almıştır. Romanov ırkının en önemli özelliği yüksek döl verimidir. 60 saat kızgınlık süresi göstermesinden dolayı diğer koyun ırklarından daha uzun süre kızgınlık gösterirler. Mevsim dışı kızgınlık göstermeleri özelliği sebebiyle her mevsimde çiftleştirilebilirler. İyi besleme ve bakımla beraber dördüz beşiz hatta altı kuzulama yapabilirler. Bu özelliği sebebiyle dünyanın çoğu ülkesinde melezleme çalışmalarında kullanılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Romanov koyunu Finn koyunu ile birlikte dünyada “kuzu makinesi” (Lamb Machine) olarak tanımlanmaktadır.

Görünüm özellikleri olarak kısa kuyruklu ve değişik tonlarda gri renkli görünüme sahiptir. Koyunlar ilk olarak siyah renkte doğarlar büyüdükçe gri rengini alırlar. Beyaz birincil kıllar, siyah ikincil kıllardan uzun olduğundan post mavimsi yeşil bir renk gösterir. Dişileri boynuzsuzdur. Uzun bacaklı olmalarına rağmen küçük yapılıdır.

Verim özellikleri olarak dişilerde canlı ağırlık 40-50 kg, erkeklerde 55-80 kg arasındadır. 3-4 ayda kızgınlık gösterirler. Bir batında kuzu verimi 2.4-2.5’dir. Yün verimi 4.5 kg’dır (Veteriner.CC, 2023).



Şekil 2.6. Romanov koyun ırkı (Veteriner.CC)

2.7.4. Suffolk koyunu

Suffolk koyun ırkının anavatanı İngiltere'dir. Soutdown koç X Nurfolk boynuzlu dişi melezlemesi sonucunda elde edilmiştir. Suffolk koyun ırkı dünyanın çoğu yerinde uzun yıllardır yetiştirilen, döl verimi yüksek, çok hızlı büyüyen, dayanıklı ve eti lezzetli bir ırktır. Günümüzde hızlı kuzu gelişimi özelliğinden dolayı koyun eti elde etmek için yetiştirilir. Suffolk koyunu sinek sokmaları, iç parazitlere, ayak ve meme hastalıklarına karşı dirençlidir. Geniş kalça yapıları sayesinde doğumları son derece kolaydır. Çok hızlı kuzu gelişimine sahiptirler.

Görünüm özellikleri olarak yüzü uzun ve siyah; ayaklar siyah, vücudu beyazdır. İyi kas yapılı ve uzun ömürlüdürler. Dişiler ve erkekler boynuzsuzdur. Çevre ve yetiştirilme şartlarına çok iyi adaptasyon göstermesinden dolayı bakımı kolaydır. Kaliteli yünü vardır. Yüksek döl verimine sahiptirler. Sulu ve yağsız et kalitesine sahiptir.

Verim özellikleri olarak canlı ağırlık erkeklerde 110-160 kg, dişilerde 80-110 kg arasındadır. Bir batında kuzu sayısı 1.7-2.2 arasındadır. Karkas verimliği yüksek %65'dir. Yün verimi: 2.2-3.6 kg'dır. Yün inceliği: 25.5-33 mikrondur. Yün kalitesi: 48-58 S'dir (Safkanmerinos, 2023).



Şekil 2.7. Suffolk koyun ırkı (Safkanmerinos, 2023)

2.8. CAST Gen Polimorfizmi Yapılan Çalışmalar

Palmer vd. (1998), yaptıkları çalışmada koyun geninin nükleotit dizilimi çıkartarak *NcoI* ve *MspI* restriksiyonu ile kesilecek bölgeleri belirleyip, kalpastatin genotiplerini PCR-RFLP yöntemi ile belirleyen literatürde geçen ilk çalışmadır. Altı adet Dorset koyundan alınan DNA örneklerinden etin sertliği üzerine etkili olan kalpastatin genine ait M ve N allellerini ortaya çıkarmışlardır.

Shahroudi vd. (2006), 100 adet saf olarak yetiştirilmiş Karagül koyun ırkından aldıkları kanlardan elde ettikleri DNA örneklerini PCR-RFLP metodunu kullanarak araştırmışlardır. *MspI* restriksiyonu ile muamele sonucu M ve N allel frekanslarını 0.79 ve 0.21 olarak bulmuşlardır. MM, MN ve NN genotip frekanslarını 0.61, 0.36 ve 0.03 diye bildirmişlerdir.

Gabor vd. (2009), Slovakya'da 96 adet Tsigai, Lacaune x Tsigai melezi koyun ırklarından aldıkları kanlardan elde ettikleri DNA örneklerinden CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanılarak araştırmışlardır. *MspI* restriksiyon enzimi sonucunda buldukları M ve N allel frekansları Tsigai 0.91-0.09 ve Lacaune x Tsigai 0.90-0.10 olarak bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Gregula-Kania (2011), 164 adet kuzulardan aldıkları kanlardan elde ettikleri DNA örneklerini CAST gen polimorfizmini araştırmak için PCR-RFLP yöntemiyle *MspI* kesim enzimi ile kesmişlerdir. CAST gen bölgesinde meydana gelen değişiklik 5'-C⁺CGG-3' tanıma bölgesine sahip *MspI* kesim enzimiyle kesilerek Arginin (Arg) aminoasidinin sentezinden sorumlu CGG kodonunda guanin bazının karşılığı sitozin bazının gelmesi gereken yerde oluşan bir bazlık değişimin guanin karşılığında adenine G→A (CGG→CAG) dönüşmesi şeklinde olan tek nokta mutasyonu oluşmakta ve Arginin (Arg) aminoasidi (CGG) oluşması gereken yerde Glutamin (Gln) aminoasidi (CAG) meydana gelmekte ve M alleli oluştuğunu bildirmişlerdir.

Szkudlarek-Kowalczyk vd. (2011), 82 adet Polonya Merinosu, 41 adet Berrichon du Cher ve 30 adet Ile de France koyunundan aldıkları kan örneklerinden elde ettikleri DNA örneklerini CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmışlardır. *MspI* restriksiyon enzimi sonucunda M ve N allel frekansları Polonya Merinosu 0.74-0.26, Berrichon du Cher 0.93-0.07 ve Ile de France 0.835 ve 0.165 bulunmuştur. Bu üç ırkın Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Khederzadeh (2011), yaptığı çalışmada İran'ın Gholistan bölgesinden 120 adet Dalagh koyun ırkından aldığı kan örneklerinden CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmıştır. *MspI* restriksiyon enzimi sonucunda M ve N allel frekanslarını 0.80 ve 0.20 ve MM, MN ve NN genotip frekanslarını 0.66, 0.29 ve 0.05 belirlemiştir. Ki-kare testinde populasyonun Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmiştir.

Suleman vd. (2012), yapmış oldukları çalışmada Pakistan'ın 100 adet Thalli, 100 adet Lohi ve 100 adet Kajli koyun ırklarından aldıkları kan örneklerinden CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmışlardır. Thalli, Lohi ve Kajli *MspI* restriksiyon enzimi ile muamele sonucu elde ettikleri M ve N allel frekanslarını Thalli 0.90-0.10, Lohi 0.82-0.18, Kajli 0.81-0.19 olarak bulmuşlardır. MM, MN ve NN genotiplerinin sırasıyla; Kajli koyunlarında 0.68, 0.26 ve 0.06 olarak, Lohi koyunlarında 0.77, 0.20 ve 0.03 olarak, Thalli koyunlarında ise 0.80, 0.20 ve 0 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçları önceki çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırdığında MM genotipini ve M allelini dominant olduğunu belirlemişlerdir. Ki-kare testi sonucuna bakarak Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Azari vd. (2012), 110 adet Dalagh koyunundan almış oldukları kan örneklerinden izole edilen genomik DNA'ları kullanarak CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmışlardır. CAST geninde MM, MN ve NN için genotip frekanslarını 0.36, 0.38 ve 0.26 olarak bulmuşlardır. Belirlenen polimorfizmler et üretimi ve yumuşaklığı ile genetik varyasyonunun Dalagh koyunlarının etkili genotiplerini bulmaya yardımcı olabileceği sonucunu ortaya koymuşlardır.

Gharahveysi vd. (2012), İran'ın 100 adet Zel koyun ırkından aldıkları kan örneklerinden izole edilen genomik DNA'ları kullanarak CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmışlardır. *MspI* restriksiyon enzimi sonucunda M ve N allel frekansını 0.75 ve 0.25 olarak bulmuşlardır. MM, MN ve NN genotip frekansları 0.62, 0.26 ve 0.12 olarak bildirmişlerdir.

Khan vd. (2012), Pakistan'ın İslamabat bölgesinde bulunan 300 adet Balkhi ve 300 adet Kajli koyundan alınan kan örneklerinden izole edilen genomik DNA'ları kullanarak CAST gen polimorfizminin canlı ağırlık artışındaki değişimlerini PCR-RFLP yöntemi ile incelemiştir. M ve N allel frekansları Balkhi 0.88-0.12 ve Kajli 0.86-0.14 olarak bulmuşlardır. MM, MN ve NN genotip frekanslarını Balkhi koyunlarında 0.76, 0.24 ve 0, Kajli koyunlarında ise 0.74, 0.24 ve 0.02 olarak bulmuşlardır. MN genotipli koyun ırklarında günlük canlı ağırlık artışındaki değişimleri diğer genotiplere oranla daha fazla canlı ağırlık artışı gösterdiğini gözlemlemişlerdir. MN genotipinin günlük canlı ağırlık artışı üzerindeki etkisinin Balkhi koyununda doğumla sekiz ay arası, Kajli koyununda ise doğumdan dört aylık olana kadar önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Balcıoğlu vd. (2014), Türkiye'de yetiştirilen 34 adet Morkaraman, 33 adet Karayaka, 31 adet Kangal, 26 adet İvesi, 23 adet Güney Karaman, 22 adet Karakaş ve 21 adet Akkaraman yerli koyun ırklarından aldıkları kan örneklerinden elde ettikleri DNA'larından CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanılarak araştırmışlardır. M ve N allel frekansları; Kangal 0.92-0.08, İvesi 0.59-0.41, Güney Karaman 0.67-0.33, Akkaraman 0.69-0.31, Morkaraman 0.87-0.13, Karayaka 0.86-0.14 ve Karakaş 0.89-0.11 olarak belirlemişlerdir. Ki-kare testi ile CAST geni açısından Karayaka, İvesi ve Morkaraman popülasyonlarının Hardy-Weinberg genetik dengesinden önem arz eden düzeyde saptığını ($P<0.05$), Karagül, Güney Karaman, Karakaş ve Akkaraman popülasyonların ise Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Yılmaz vd. (2014a), Türkiye'de yetiştirilen 336 adet Kıvırcık, 248 adet Karacabey Merinosu, 87 adet Sakız ve 49 adet Gökçeada yerli koyun ırklarından aldıkları kan örneklerinden elde ettikleri DNA'larından CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanılarak araştırmışlardır. CAST geninin M ve N allel frekansları; Kıvırcık 0.85-0.15, Karacabey Merinosu 0.80-0.20, Sakız 0.34-0.66 ve Gökçeada 0.99-0.01 olarak

belirlemişlerdir. Kıvırcık, Sakız ve Gökçeada koyun ırklarının Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu ve Karacabey Merinosu koyun ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığını bildirmişlerdir.

Yılmaz vd. (2014b), 203 adet Kıvırcık ırkı kuzularından aldıkları kan örneklerinden karkas kalite özelliklerinin CAST geni ile olan ilişkisini araştırmışlardır. M allelinin CAST geninde en yaygın allel olduğunu bulmuşlardır. M allel frekansı 0.84 ve N allel frekansını 0.16 olarak bulmuşlardır. Kıvırcık koyunlarında MM, MN ve NN genotip frekanslarını sırasıyla 0.73, 0.23 ve 0.04 olarak bulmuşlardır. Tek nokta mutasyonunun deri yağ kalınlığı ve bel gözü kasına ait yağ kalınlığının günlük canlı ağırlık artışı ile olumlu yönde ilişkili olduğunu bildirilmişlerdir. CAST geninde oluşan SNP'nin günlük canlı ağırlık artışı, deri yağ kalınlığı ve bel gözü kasına ait yağ kalınlığı ile arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Canlı ağırlık, ortalama günlük canlı ağırlık artışı, deri yağ kalınlığı ve bel gözü kasına ait yağ kalınlığı ortalamaları NN genotipine sahip hayvanlarda daha düşük bulmuşlardır. Deri yağ kalınlığı ve bel gözü kasına ait olan yağ kalınlığı özelliği üzerinde CAST geninin etkili olduğunu ve NN genotipi taşıyan hayvanların diğer genotipleri taşıyan hayvanlara göre daha yağsız karkasa sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Avanus (2015), Karayaka, Kıvırcık, İmroz, Morkaraman, Hemşin ve Karagül yerli koyun ırklarında CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırmıştır. M allel frekansı 0.96 ile en yüksek İmroz ırkında, Kıvırcık ırkında ise en yüksek N allel frekansı 0.30 olarak bulmuşlardır. MN genotip frekansı en yüksek Kıvırcık 0.60, MM genotipi en yüksek İmroz 0.93 ve NN genotipi en yüksek Morkaraman 0.70 ırklarında belirlenmiştir. Karagül, Karayaka, İmroz ve Kıvırcık koyun ırklarında NN genotipi bulunamamıştır. Kıvırcık ve Hemşin hariç tüm ırklar Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu bildirilmiştir.

Bayram vd. (2018), 400 adet Akkaraman koyun ırkından alınan kan örneklerinden CAST polimorfizmi PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırmışlardır. Akkaraman ırkı kuzulardan kuzu doğum ağırlığı, 30. gün, 60. gün ve 90. günlerde tartım yapılan 374 koyunda canlı ağırlık artışına bakmışlardır. *MspI* restriksiyon enzimi sonucunda M ve N allel frekanslarını 0.90 ve 0.10 ve MM, MN ve NN genotip frekanslarını 0.81, 0.18 ve 0.01 olarak

bulmuşlardır. CAST polimorfizminin canlı ağırlık üzerinde bir ilişkisi olmadığını ve Akkaraman ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Khaleel vd. (2019), 31 adet İvesi kuzusundan aldıkları kan örneklerinden CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. MN ve NN genotip frekanslarını sırasıyla 0.65 ve 0.35; M ve N allellerin frekansları 0.49 ve 0.51 olarak bulmuşlardır. CAST geni bakımından heterozigot bireylerin homozigot bireylerden daha sağlıklı olduğunu ve büyüme performanslarının da daha yüksek olduğunu da bildirmişlerdir.

Bozhilova-Sakova vd. (2020), 32 adet Kuzeydoğu Bulgar Merinos koyun ırkından aldıkları kan örneklerinden izole edilen genomik DNA'ları kullanarak CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanarak araştırmışlardır. *MspI* restriksiyon enzimi sonucunda M ve N allel frekansını 0.73 ve 0.27 olarak bulmuşlardır. MM, MN ve NN genotip frekansları 0.47, 0.53 ve 0 olarak bildirmişlerdir.

Kırıkçı vd. (2021), Karadeniz bölgesindeki Samsun, Ordu, Giresun, Tokat şehirlerinden toplam 150 adet Karayaka koynundan aldığı kanlardan elde ettiği genomik DNA'ları kullanarak yaptığı çalışmada CAST gen polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile bildirmiştir. *MspI* restriksiyon enzimi sonucuna istinaden MM, MN ve NN genotip frekansları 0.84, 0.16 ve 0 olarak bulmuşlardır. MN genotipi sadece Ordu popülasyonunda bulunmamış, NN genotipi çalışılan hiçbir alt popülasyonda bulunmamıştır. Bu araştırma genetik yapının farklı coğrafi konumlarda azda olsa değişebileceğini bildirmişlerdir.

Bayraktar ve Shoshin (2022), 129 adet bir yaşındaki İvesi koyunundan alınan kan örneklerinden izole ettikleri DNA'ları kullanarak yaptığı CAST polimorfizminin PCR-RFLP metodu kullanarak belirlemişlerdir. *MspI* enzim kesim sonucu M ve N allel görülme sıklıkları 0.78 ve 0.22; MM, MN ve NN genotip frekanslarını ise 0.70, 0.16 ve 0.14 olarak belirlemişlerdir. Gen frekanslarının Hardy-Weinberg genetik dengesinde ($p < 0.05$) olduğunu belirlemişlerdir. MM genotipinin en yüksek vücut ağırlığına sahip olduğunu, MN genotipinin diğer genotiplere göre en yüksek vücut uzunluğu, göğüs derinliği ve kalp çevresine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

2.9. DGAT1 Gen Polimorfizmi Yapılan Çalışmalar

Xu vd. (2008), DGAT1'in koyun eti kalite özelliklerini araştırmak için 286 adet üç Çin yerli koyun ırkı olan Tan, İç Moğolistan ve küçük kuyruklu Han koyunlarından alınan kanlardan izole edilen DNA örneklerini DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini PCR-RFLP metodu kullanılarak araştırılmıştır. CC, CT ve TT genotipleri görülme sıklıkları Tan koyunlarında 0.36, 0.11 ve 0.53; İç Moğolistan koyunlarında 0.25, 0.02 ve 0.73 ve küçük kuyruklu Han koyunlarında 0.34, 0.09 ve 0.57 olarak bulmuşlardır. C ve T allel görülme sıklıkları Tan koyunlarında 0.41 ve 0.59; İç Moğolistan koyunlarında 0.26 ve 0.74; küçük kuyruklu Han koyunlarında 0.38 ve 0.62 olarak bulmuşlardır. DGAT1 geninin TT genotipinin kas mermerleşme yapısına ve daha yüksek kas içi yağ içeriğine sahip olduğu ve daha düşük kesme kuvvetine ve daha düşük sızma kaybı oranı olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak, farklı genotiplerin kas içi yağ içeriği, kas mermerleşmesi ve et hassasiyeti ile anlamlı ilişkisi, DGAT1'in T allelinin koyun eti kalite özellikleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır ve TT genotipinin koyunlarda üstün et kalitesi özellikleri için moleküler belirteç olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir.

Yang vd. (2011), 58 adet Tan, 39 adet Oula, 36 adet Ganjia ve 34 adet Qiaoke Çin yerli koyun ırklarında DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi kullanarak araştırmışlardır. *AluI* restriksiyon enzimi ile ekzon 17 bölgesinde belirlenen C→T (GCC (Ala) → GCT (Ala)) şeklinde tek nokta mutasyonu tanımlanmıştır. PCR-RFLP analizinin sonucunda dört koyun ırkında CC, CT ve TT olmak üzere üç genotipe sahip olduğunu ve T ve C olarak iki allele sahip olduğu ve burada baskın genotipin CC, C allelinin baskın olduğunu bulmuşlardır. CC genotip frekansları Tan, Oula, Ganjia ve Qiaoke koyunlarında 0.586, 0.513, 0.583 ve 0.500 bulunmuş; C allelinin görülme sıklıkları sırasıyla 0.776, 0.654, 0.694 ve 0.18 olarak bulmuşlardır. Yapılan Ki-kare testi ile Tan ve Oula koyunlarında Hardy-Weinberg genetik dengesinde oldukları, Ganjia ve Qiaoke koyunlarında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadıkları tespit edilmiştir. Çin yerli koyun ırklarının orta derecede polimorfizm olduğunu göstermiş ve DGAT1 geninin ekzon 17'sindeki tek nükleotid polimorfizminin, süt ve et kalitesini etkileyebilecek DGAT1'in moleküler bir marker olabileceğini bildirmişlerdir.

Mohammadi vd. (2013), İran'da yetiştirilen 157 baş Zel ve 152 baş Lori-Bakhtiari koyun ırklarından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'ları, DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki tek nükleotit polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. CC, CT ve TT genotipleri görülme sıklıkları sırasıyla Zel koyunlarında 0.07, 0.24 ve 0.69; Lori-Bakhtiari koyunlarında 0.16, 0.19 ve 0.65 olarak bulmuşlardır. Zel ve Lori-Bakhtiari koyun ırklarında sırasıyla C alleli frekansı 0.19 ve 0.254; T allel frekansı 0.81 ve 0.746 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Zel ve Lori-Bakhtiari koyun popülasyonlarının Ki-kare testi ile Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığını tespit etmişlerdir. Zel ve Lori-Bakhtiari koyun ırklarında T allelinin ve TT genotipinin baskın olduğunu bildirmişlerdir. DGAT1 geninde, CC genotipine sahip koyun ırklarının daha fazla sırt yağı kalınlığı ve kuyruk yağı ağırlığına eriştiklerini bildirmişlerdir.

Noshahr ve Rafat (2014), İran'ın 150 adet Moghani koyun ırkından aldıkları kan örneklerinden izole ettikleri DNA'lardan, DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Koyunların kesilmesinden ve karın tüm içeriğinin boşaltılmasından sonra, sıcak karkas ağırlıklarını kaydetmişlerdir. *AluI* restriksiyon enzimi ile belirlenen C ve T allel frekansları sırasıyla 0.171 ve 0.829 bulunmuş; CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla 0.689, 0.262 ve 0.04 olarak bulmuşlardır. DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizminin karkas ağırlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. CC genotipine sahip koyunların ortalama karkas verimi ve karkas ağırlığının TT genotipine sahip koyunlardan daha yüksek olduğunu ve DGAT1 geninin Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığını bildirmişlerdir.

Mahrous vd. (2015), Mısır'da yetiştirilen Barki, Rahmani ve Osseimi koyun ırklarından aldıkları kan örneklerinden izole ettikleri DNA'lardan DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP metodunu kullanarak araştırmışlardır. CC ve CT genotip frekansı Rahmani koyunlarında 0.60 ve 0.40; Osseimi koyunlarında 0.50 ve 0.50; Barki koyunlarında 0.75 ve 0.25 olarak belirlemişler ve üç koyun ırkında da TT genotip frekansının 0 olduğunu bildirmişlerdir. C ve T allel frekansı sırasıyla Rahmani koyunlarında 0.80 ve 0.20; Osseimi koyunlarında 0.75 ve 0.25; Barki koyunlarında 0.88 ve 0.12 olarak bulmuşlardır. Rahmani, Osseimi ve Barki koyun ırklarında CT genotipinin orta derecede kas mermerleşme yağ yapısı ve kas içi yağ içeriğine olumlu yönde etki ettiğini bildirmişlerdir.

Bu üç koyun ırkında Ki-kare analiziyle Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Meena vd. (2016), 164 adet Malpura koyun ırkından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek için PCR-RFLP metodunu kullanmışlardır. Malpura koyun ırkında C ve T alleli 0.92 ve 0.08 olarak bulmuşlardır. CC, CT ve TT genotip frekanslarını 0.86, 0.02 ve 0.12 olarak tespit etmişler ve CC genotipinin baskın olduğunu bildirmişlerdir. C allelinin daha fazla kuyruk yağı ağırlığı, daha fazla sırt yağ kalınlığı ile ilişkili olduğunu ve karkas ağırlığını artırma eğilimi olduğunu bildirmişlerdir. C allelinin karkas ağırlığını artırma özelliğini daha detaylı şekilde araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Özmen ve Kul (2016), 150 adet Sakız, 150 adet Akkaraman ve 150 adet İvesi koyun ırklarından alınan kanlardan elde edilen DNA örneklerinden sütçü koyun ırklarında DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmini PCR-RFLP metodunu kullanarak araştırmışlardır. CC genotipinin baskın genotip olduğu, İvesi ve Akkaraman koyun ırklarında sırasıyla 0.80 ve 0.76 bulmuşlardır. İvesi ve Akkaraman koyun ırklarında sırasıyla C allel frekansları 0.89 ve 0.87; T allel frekanslarını 0.11 ve 0.13 olarak hesaplamışlardır. Sakız koyun ırkında DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesinde monomorfik olduğunu; TT ve CT genotip frekanslarının görülmediğini bildirmişlerdir. Sakız, İvesi ve Akkaraman koyun ırklarının Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

Kumar vd. (2016), 342 adet sekiz yerli Hint koyun ırklarından (Ganjam, Nali, Magra, Jaisalmeri, Deccani, Nellore, Muzaffarnagri ve Mandya) alınan kanlardan izole ettikleri genomik DNA örneklerinden DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi kullanarak araştırmışlardır. *AluI* restriksiyon enzimi CC, CT ve TT genotipleri belirlemişler, Ganjam, Mandya ve Deccani koyun ırklarında TT genotip frekansı gözlenmemiştir. Sekiz yerli Hint koyun ırklarında CC genotipinin baskın olduğunu ve sekiz popülasyonun tamamının Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir. DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmin koyun eti ve karkas ağırlığı üzerinde önemli bir etkisi olduğu sonucuna vardıklarını bildirmişlerdir.

Nanekarani vd. (2016), İran'da yetiştirilen 118 adet Lori koyun ırkından alınan kanlardan elde edilen DNA örneklerinden DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlemişlerdir. *AluI* ile restriksiyon enzimi ile DGAT1 geninin C ve T allel frekansları sırasıyla 0.562 ve 0.438; CC, CT ve TT genotiplerinin frekansları 0.433, 0.258 ve 0.309 olarak hesaplamışlardır. Populasyonun DGAT1'in ekzon 17 bölgesindeki tek nükleotit polimorfizminin C→T sessiz mutasyonu sonucu bu populasyondaki tek nükleotit polimorfizminin Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı bildirmişlerdir ($p < 0.01$).

Bayram vd. (2018), 374 adet Akkaraman koyun ırkından alınan kanlardan elde edilen DNA örneklerinden DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırmışlardır. Akkaraman ırkı kuzulardan kuzu doğum ağırlığı, 30. gün, 60. gün ve 90. günlerde tartım yapılan 374 koyunda canlı ağırlık artışına bakmışlardır. *AluI* restriksiyon enzimi sonucunda C ve T allel frekanslarını 0.96 ve 0.04 bulmuşlar ve CC, CT ve TT genotip frekanslarını 0.91, 0.09 ve 0 olarak bulmuşlardır. Akkaraman koyun ırkında C allelinin baskın allel olduğunu ve Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu bildirmişlerdir. CT genotipine sahip Akkaraman koyun ırklarında doğum ağırlığı üstüne olumlu bir etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Altwaty vd. (2020), yaptıkları çalışmada Harri, Najdi ve Barki koyun ırklarından alınan kanlardan izole edilen DNA'lardan DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Harri, Najdi ve Barki koyun ırklarında CC genotip frekansı 0.50, 0.65 ve 0.75; CT genotip frekansı 0.50, 0.35 ve 0.22 olduğunu ve TT genotipinin hiç gözlenmediğini bildirmişlerdir. Harri, Najdi ve Barki koyun ırklarında sırasıyla C allel frekansı 0.75, 0.83 ve 0.89 ve T allel frekansı 0.25, 0.17 ve 0.11 olarak belirlemişlerdir. Barki koyun ırkında CT genotipli bireylerin kas mermerleşme yapısı ve orta derecede kas içi yağ içeriğini arttırdığını ve üstün performans gösterdiği bildirmişlerdir.

Bayraktar ve Shoshin (2021), 150 adet Irak İvesi koyun ırkından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'ların DGAT1 geninin ekzon 17 bölgesindeki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. DGAT1 geninde C ve T allel frekansları 0.58 ve 0.42; genotip frekansları ise CC, CT ve TT sırasıyla 0.47, 0.23 ve 0.30 olarak

hesapladıklarını bildirmişlerdir. İvesi koyun ırkında DGAT1 geninin Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğunu bildirmişlerdir. DGAT1 gen polimorfizmi ile kuyruk uzunluğunun arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Araştırmada Eskişehir İli Çifteler ilçesinde halk elinde özel işletmelerde yetiştirilen sürülerden Orta Anadolu Merinosu, Suffolk, Romanov, Pırlak olmak üzere 176 adet koyun ırklarından rastgele alınan kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır ve detayları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kan örneklerinin alındığı ilçeler, ırklar ve örnek genişlikleri

İl	İlçe	İrk	Örnek Genişliği
Eskişehir	Çifteler	Orta Anadolu Merinosu	32
		Pırlak	8
		Romanov	10
		Suffolk	21
	Sivrihisar	Orta Anadolu Merinosu	64
	Mahmudiye	Orta Anadolu Merinosu	41
Toplam			176

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Araştırmada kullanılacak kan örnekleri, 9 ml’lik EDTA’lı tüplere, steril ve tek kullanımlık iğneler ile hayvanların boyun toplar damarından (vena jugularis) alınmıştır. Hayvanlardan alınan kanlar soğuk zincirle laboratuvara getirilerek, genomik DNA izolasyon işlemi yapılana kadar Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalında yer alan Moleküler Genetik Laboratuvarı’nda -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.3. Genomik DNA İzolasyonu

Farklı koyun ırklarından rastgele alınan kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) molekülünün izolasyonu için “BLIRT DNA Isolation Kit” (Katalog No: EM13-250) kullanılmıştır. DNA izolasyon kitinin protokolü için aşağıda verilen işlemler uygulanmıştır.

- -20 °C’de muhafaza edilen kan örnekleri dışarı çıkartılıp çözülene kadar oda sıcaklığında (24-25 °C) bekletilmiştir.
- Her bir kan örneğinden 200 µl alınarak üzerlerine 200 µl “RBC Lisis Tampon Çözeltisi” konularak 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Homojen karışım elde etmek için kısa süre vorteksle karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler, 8.600 rpm’de dört dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırarak dipte kalan hücre peleti 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Peletlerin üzerine 375 µl “GL Tampon Çözeltisi” eklenmiş ve yirmi saniye boyunca vorteksle karıştırılmıştır.
- Daha sonra peletlerin üzerine 10 µl “Proteinaz K” eklenerek kısa bir süre vorteksle karıştırılmış ve karışım tamamen sindirilene kadar 55 °C’de on dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon bittikten sonra çıkarılan örneklerin üzerine 400 µl “GB Tampon Çözeltisi” eklenerek on saniye boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler 15.000 rpm’de iki dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine konmuştur.
- Kolondan geçen sıvı, atıldıktan sonra 15.000 rpm’de bir dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra kolon steril bir 2 ml steril toplama tüpüne aktarılmıştır.
- Örneklerin üzerine 600 µl “GW1 Tampon Çözeltisi” eklenmiş ve 15.000 rpm’de otuz saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Santrifüj sonrası örneklerin üzerine 500 µl “GW2 Tampon Çözeltisi” eklenmiş ve 15.000 rpm’de otuz saniye santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Kalan kısım 15.000 rpm’de iki dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj işleminden sonra kolon steril bir 1.5 ml steril ependorf tüpüne aktarılmıştır.
- Peletlerin üzerine 200 µl “Elüsyon Tampon Çözeltisi” eklenerek oda sıcaklığında iki dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübe işleminden sonra 15.000 rpm’de bir dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj edildikten sonra elde edilen DNA örnekleri analiz yapılana kadar -20 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

3.4. DNA’ların Miktar, Saflık ve Bütünlük Kontrolü

Koyunlardan alınan kan örneklerinden elde edilen genomik DNA’ların miktarları ve saflık kontrollerinin yapılması için ND 1000 NanoDrop Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. DNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda maksimum emilim vermektedir. DNA’nın saflığı işlemi hesaplanırken A260/280 oranı dikkate alınmaktadır. DNA’nın saflığını belirleyebilmek için 260 ve 280 nm’deki emilim oranı kullanılmaktadır. DNA için yaklaşık 1.8 oranı genel olarak “saf” olarak kabul edilir. Bu oran yaklaşık 1.8 değerinden düşükse, 280 nm’de veya yakın bir değerde güçlü bir biçimde emilen protein, fenol veya diğer kontaminantların varlığını gösterir (Gedik, 2017). Genomik DNA’ların NanoDrop Spektrofotometre ile ölçümü yapılarak saf olmadığına karar verilen örneklerin DNA izolasyon işlemi tekrar yapılmıştır.

Elde edilen genomik DNA moleküllerinin parçalanıp parçalanmadığına bakmak için %1’lik agaroz jel hazırlanıp elektroforezde bakılmıştır. Bu jeli hazırlamak için 250 ml’lik erlen mayerin içine hassas terazide tarttığımız 1 gram agaroz koyup üzerine 100 ml 1 X TBE (Tris, Borik asit, EDTA) Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi eklenerek, agarozun homojen haline gelmesi için karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan jel tampon çözeltisi mikro dalga fırında 2-5 dakika arasında kaynatılmıştır. Agaroz tamamen çözüldüğünde mikro dalga fırınından çıkartılıp 50-60 °C sıcaklığa gelene kadar soğutulması sağlanmıştır. İstenilen sıcaklığa geldikten sonra agarozun üzerine, 5 µl ethidium bromide çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan agaroz jel karışımı hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek 22 kuyucuklu tarak bulunan yatay elektroforez küvetine dökülerek soğuması için oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. Katılaşmış agaroz jelinden taraklar çok dikkat edilerek kuyucukları bozmayacak şekilde çıkartılmıştır. Yatay elektroforez tankına jel yerleştirildikten sonra önceden hazırlanan 1 X TBE Elektroforez/Jel Tampon Çözeltisi ilave edilmiştir. 0.2 µl’lik

PCR tüplerine 5 µl genomik DNA örneklerinden koyulup üstüne DNA Yükleme Tampon Çözültisi 3 µl olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan DNA örnekleri çıkartılan taraklar sayesinde oluşan kuyucuklara mikropipet yardımıyla çok dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Yüklenen örnekler elektroforez işlemi için cihazının güç kaynağı ile anot-anot, katot-katot bağlantıları yapıldıktan sonra 100 V'da 30 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforez işlemi bittikten sonra agaroz jeller Jel Görüntüleme Analiz Sisteminde (Kodak Gel Logic 200) UV ışığı altında görüntülenip fotoğrafları çekilmiş ve DNA örneklerinin parçalanıp parçalanmadığı kontrol edilmiştir. Spektrofotometre ölçümlerinde saflık ve miktar olarak istenilen değerlerde bulunan ve tek parça olduğu belirlenen DNA'ları PCR işlemi yapılabilmek için +4 °C'da saklanmıştır.

3.5. CAST Geninin PCR ile Çoğaltılması

Araştırmada incelenecek örneklerde genomik DNA izolasyon aşaması tamamlandıktan sonra CAST gen bölgesinin çoğaltılması PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları Biorad marka model termal cycler cihazı kullanılarak yapılmıştır. CAST geninin PCR ile çoğaltılma işlemi için aşağıda verilen Palmer vd. (1998) tarafından bildirilen ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Primerler Şekil 3.1'de de yer alan gen sekansı üzerinde gösterilmiştir.

İleri (forward) primer: 5'-TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG-3'

Geri (reverse) primer: 5'-GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC-3'

```

54121 ttataaatctg ttctggcact tgaatgattc ccatgtgtga cccgtcatgc tgcctgtttc
54181 tttagaaacc cctggggcc aatgacgcca tcgatgcctt gtcacagac ttcacctgca
54241 gttcccctac agctgatgca aagaaaactg agaaagaggt attgttttta atgcactcag
54301 ggaaacttgt tagaaactac ctcccacttt aagacaacaa ctttttttta aactttattt
54361 ttgacttcgc tgggtcttca ttgctgtgtt caggctttct ctagtggggg caagcgagggg
54421 ctattctcta gttgcgatgt gcagccttct gcaggtggct tctcttggtg cagagccggg
54481 gctctgggtg cacaggcttc agttggtgtg acttgagagc tctagagcac aggctcagtg
54541 gtcgtggctc acaggcttac tccacggcat gtgggatctt ccctggccag ggagcgaacc
54601 cgtgtcccct gcggtgcaag gcggcctctt aaccgctggc caccagggaa gcccgaagat
54661 gccaaggctt tttacttctg gttcttaccg tctgggtaat acatttcctt catctgccag
54721 tcaaaccttc ttttgtattt cttttttcag aaatctacag aagaggcttt aaaagctcag
54781 tcagctgggg tgatcagaag tgctgctcca cccaaagaga aaagaagaaa agtggaagag
54841 gtatcaataa ttacttcttt gaacttcagc acggtcgctt ggatagcagt ttgctttcct
54901 gcggtctgatc cagctgactt gggggagaatc gtagtagtgc attgtaccgg tagacctcct

```

Şekil 3.1. Koyun CAST geni (GenBank: NC_056058.1) nükleotid dizisi üzerinde kullanılan forward ve reverse primerlerin gösterilmesi (NBCI, 2023a)

CAST gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasını sağlamak için genomik DNA dışındaki PCR reaksiyon karışımı her seferde incelenecek örnek sayısı ile aynı olacak şekilde steril 1,5 ml'lik ependorf tüpü içinde hazırlanmıştır. 1 µl örneklere ait genomik DNA'lar 0,2 ml'lik PCR tüplerine konulduktan sonra PCR karışımından her bir örnek için 24 µl alınarak 0,2 ml'lik PCR tüplerine dağıtılarak hazırlanmıştır. PCR tüplerinde her örnek için ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerler, 10X Taq buffer, MgCl₂, dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), DNA Taq polimeraz enzimi, genomik DNA ve steril deiyonize su eklenmiştir. Çizelge 3.2'de her bir örnek için PCR karışımı verilmiştir.

Çizelge 3.2. CAST geni PCR karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
Koyun F primer	1 µl
Koyun R primer	1 µl
DNA	1 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPs	4 µl
Taq Polimeraz	0.5 µl
Taq Buffer	5 µl
ddH ₂ O	9.5 µl
Toplam Hacim	25 µl

PCR işlemi için, hazırlanan PCR karışımı PCR tüplerine konulduktan sonra mikrosantrifüjde 3-5 saniye kadar 3.500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra PCR tüpleri termal cyclus cihazına yerleştirilip DNA çoğaltımı yapılmıştır. CAST geninin çoğaltılmasında Palmer vd. (1998) tarafından belirlenen PCR programı ve Çizelge 3.3’de verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. CAST geni PCR programı (Palmer vd., 1998)

Sıcaklık	Süre	PCR Basamakları
95 °C	3 dakika	Ön denatürasyon (DNA eksenlerinin ayrılması)
95 °C	1 dakika	35 döngü Denatürasyon (DNA eksenlerinin ayrılması) Primerlerin Bağlanması (Annealing) Extension (DNA bölgesinin sentezi)
62 °C	1 dakika	
72 °C	2 dakika	
72 °C	10 dakika	Son Extension (DNA bölgesinin son sentezi)

PCR programının son basamağından sonra sıcaklık +4 °C’ye düşürülüp PCR işlemi tamamlanmıştır. Yapılan PCR işlemi sonucunda beklenen 622 bp’lik PCR ürünlerinin çoğaltılıp çoğaltılmadığını görmek için %2’lik agaroz jel elektroforezde kontrol edilmiştir. PCR işlemi sonucunda elde edilen PCR ürünlerine, 3-4 µl DNA Yükleme Tampon çözeltisi eklenerek elektroforez işlemi yapılmıştır. CAST geninin PCR işlemi sonunda çoğaltılan PCR ürünleri *MspI* restriksiyon enzimiyle kesim işlemine kadar +4 °C’da saklanmıştır.

3.6. DGAT1 Geninin PCR ile Çoğaltılması

Araştırmada incelenecek örneklerde genomik DNA izolasyon aşaması tamamlandıktan sonra CAST gen bölgesinin çoğaltılması PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. DGAT1 geninin PCR ile çoğaltılma işlemi için aşağıda verilen Yang vd. (2011) tarafından bildirilen ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Primerler Şekil 3.2’de yer alan gen sekansı üzerinde gösterilmiştir.

İleri (forward) primer: 5'-GCATGTTCCGCCCTCTGG-3'
 Geri (reverse) primer: 5'-GGAGTCCAACACCCCTGA-3'

```

8101 ccggcggggc agcagcaagt gggcagctag gacgggggtg ttcctggcct ctgccttctt
8161 ccatgaggtc agtgcaactga ggggtgcgcc tgcccctggg ggtgggggtg ggtggggcgg
8221 ggcaggggct tggctaacgc ccctctccc cccagtacct ggtgagcatc cccctgcgca
8281 tggtccgcct ctgggccttc accggcatga tggcacaggt gagcagccct ggacccccac
8341 ctgcgagccc acccctggg cgagaggct cactcccgtc ccatgtccc agatcccgt
8401 ggcctggata gtcggccgct tcttccgtgg caactatggc aacgcggctg tgtggctgtc
8461 actcatcatt gggcagccag tggccgtcct gatgtacgtc cacgactact acgtgctcaa
8521 ccgagaggcc ccaacagccg gcacctgagc ccctccaggc tggttccctc aggggtgttg
8581 gactcctttg cctcaccact tgctgctgta ctggagcctg cccccaacct gggcgtaggg
8641 gaggggcctg gctggtgaaa gctgcctcct ggcccc
  
```

Şekil 3.2. Koyun DGAT1 geni (GenBank: EU178818.1) nükleotid dizisi üzerinde kullanılan forward ve reverse primerlerin gösterilmesi (NBCI, 2023b)

DGAT1 gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasını sağlamak için genomik DNA dışındaki PCR reaksiyon karışımı her seferde incelenecek örnek sayısı ile aynı olacak şekilde steril 1,5 ml'lik ependorf tüpü içinde hazırlanmıştır. 1 µl örneklere ait genomik DNA'lar 0,2 ml'lik PCR tüplerine konulduktan sonra PCR karışımından her bir örnek için 24 µl alınarak 0,2 ml'lik PCR tüplerine dağıtılarak hazırlanmıştır. PCR tüplerinde her örnek için ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerler, 10X Taq buffer, MgCl₂, dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), DNA Taq polimeraz enzimi, genomik DNA ve steril deiyonize su eklenmiştir. Çizelge 3.4'de her bir örnek için PCR karışımı verilmiştir.

Çizelge 3.4. DGAT1 geni PCR karışımı

Bileşenler	Hacim (µl)
Koyun 1 F primer	1 µl
Koyun 1 R primer	1 µl
DNA	1 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPs	4 µl
Taq Polimeraz	0.5 µl
Taq Buffer	5 µl
ddH ₂ O	2 µl
Toplam Hacim	25 µl

PCR işlemi için, hazırlanan PCR karışımı PCR tüplerine konulduktan sonra mikrosantrifüjde 3-5 saniye kadar 3.500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra PCR tüpleri termal cyclus cihazına yerleştirilip DNA çoğaltımı yapılmıştır. DGAT1 geninin çoğaltılmasında Yang vd. (2011) tarafından belirlenen PCR programı uygulanmış ve Çizelge 3.5’de verilen PCR programı uygulanmıştır.

Çizelge 3.5. DGAT1 geni PCR programı (Yang vd., 2011)

Sıcaklık	Süre	PCR Basamakları
95 °C	5 dakika	Ön denatürasyon (DNA eksenlerinin ayrılması)
95 °C	30 saniye	35 döngü Denatürasyon (DNA eksenlerinin ayrılması) Primerlerin Bağlanması (Annealing) Extension (DNA bölgesinin sentezi)
60 °C	30 saniye	
72 °C	30 saniye	
72 °C	10 dakika	Son Extension (DNA bölgesinin son sentezi)

PCR ile DNA çoğaltma işleminden sonra PCR sıcaklığı +4 °C’ye düşürülüp tamamlanmıştır. Yapılan PCR işlemi sonucunda DGAT1 geninde beklenen 309 bp’lik PCR ürünlerinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı %2’lik agaroz jel elektroforezde kontrol edilmiştir. PCR işlemi sonucunda elde edilen PCR ürünlerine, 3-4 µl DNA Yükleme Tampon çözeltisi

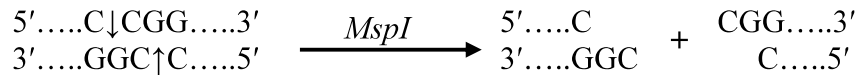
eklenerek elektroforez işlemi yapılmıştır. DAGT1 geninin PCR işlemi sonunda çoğaltılan PCR ürünleri *AluI* restriksiyon enzimiyle kesim işlemine kadar +4 °C'da muhafaza edilmiştir.

3.7. Agaroz Jel Elektroforezi Hazırlanması

Çoğaltılan DNA parçalarının baz uzunluklarına göre belirlenmesi ve kesim enzimleri ürünlerinin analizlerinde %2 olarak hazırladığımız agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jelini hazırlamak için 250 ml'lik erlen mayerin içine hassas terazide tarttığımız 2 gram agaroz koyup üzerine 100 ml 1XTBE Elektroforez/Jel Tampon çözeltisi eklenerek, agarozun homojen haline gelmesi için karıştırılmış ve 2-5 dakika kadar süreyle mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Agaroz tamamen çözünüp homojen bir karışım olduğunda mikro dalgadan alınıp 50-60 °C sıcaklığa ulaşana kadar soğutulmuş ve sonrasında içine, boyama yapabilmek için 5 µl ethidium bromide çözeltisi ilave edilip homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan agaroz jel karışımı hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek 22 kuyucuklu tarak bulunan elektroforez jel tepsisine döküldükten sonra soğuması için oda sıcaklığında bırakılıp katılaşması beklenmiştir. Katılaşmış agaroz jelinden taraklar çok dikkat edilerek kuyucukları bozmayacak şekilde çıkartılmıştır. Süre sonunda jel elektroforez tankına alınmış ve tarak jelden uzaklaştırılmıştır. Yatay elektroforez tankına, jelin hemen üzerine çıkacak kadar 1X TBE tamponu ilave edilmiştir. 0.2 µl'lik PCR tüplerine 15 µl PCR örneklerinden koyulup üzerine 5 µl DNA Yükleme Tampon Çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan PCR örnekleri çıkartılan taraklar sayesinde oluşan kuyucuklara mikropipet yardımıyla çok dikkat edilerek yükleme yapılmıştır. Elektroforez işlemi bittikten sonra örneklerimizin bantlarının büyüklüklerini belirleyebilmek adına en başta bulunan kuyucuğa 100 bç'lik (Himedia marka DNA ladder katalog no: MBT049) DNA markeri yüklenmiştir. Jel kuyucuklarına dikkatli bir şekilde yüklenen PCR ürünlerini birbirinden ayırmak için elektrik akımı olan yatay elektroforez cihazında yürütülmüştür. Elektroforez cihazının güç kaynağı ile anot-anot, katot-katot bağlantıları yapıldıktan sonra 100 V'da 40 dakika yürütülmüştür. Süre sonunda, jel elektroforez tankından alınmış ve UV ışığın altında görüntüler elde edilip bilgisayar sistemine yüklenmiştir.

3.8. CAST Geni PCR Ürünlerinin *MspI* Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Yapılan elektroforez sonunda 622 bç'lik bantların elde edildiği PCR ürünleri 10 U/ µl konsantrasyonunda *MspI* (Fermentas® ER0541) restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. *MspI* restriksiyon enzimi aşağıda verilen nükleotid sıralarını tanıyarak bu bölgelerden yapışkan uçlu (sticky, cohesive) kesim yapmaktadır.



CAST geni nükleotid dizisinde *MspI* kesim enziminin tanıma bölgesi Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

```

54061 cattaagtat ctcctttggt agtcaaagaa ctgcaggagt gcattcacca tttgctgggt
54121 ttataatctg ttctggcact tgaatgattc ccatgtgtga cccgtcatgc tgcctgtttc
54181 ttagaaacc cctggggccc aatgacgcca tcgatgcctt gtcacagac ttcacctgca
54241 gttcccctac agctgatgca aagaaaactg agaaagaggt attgttttta atgcactcag
54301 ggaaacttgt tagaaactac ctcccacttt aagacaacaa ctttttttta aactttattt
54361 ttgacttcgc tgggtcttca ttgctgtgtt caggctttct ctagtggggg caagcgaggg
54421 ctattctcta gttgcatgtt gcagccttct gcagggtggct tctcttggtg cagagcggg
54481 gctctgggtg cacaggcttc agttgttggt acttgagagc tctagagcac aggctcagtg
54541 gtcgtggctc acaggcttac tccacggcat gtgggatctt ccctggccag ggagcgaacc
54601 cgtgtcccct gcgttgcaag gcggcctctt aaccgctggc caccagggaa gccccaagat
54661 gccaaaggctt tttacttctg gttcttaccg tctggttaat acatttcctt catctgccag
54721 tcaaaccttc ttttgatttt catttttcag aaatctacag aagaggcttt aaaagctcag
54781 tcagctgggg tgatcagaag tgctgctcca cccaaagaga aaagaagaaa agtgggaagag
54841 gtatcaataa ttacttcttt gaacttcagc acggtccgct ggatagcagt ttgctttcct

```

Şekil 3.3. CAST geni nükleotid dizisinde *MspI* kesim enziminin tanıma bölgesi (NBCI, 2023a)

622 bç'lik PCR ürünlerinin *MspI* restriksiyon endonükleaz ile kesim işlemi her bir örnek için toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. İçeriği Çizelge 3.6'da verilen bu 10 µl *MspI* kesim çözeltisi 15 µl PCR ürünlerinin üzerine eklenmiştir.

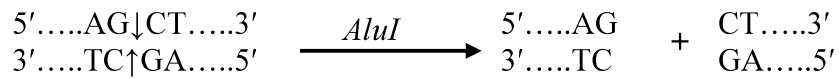
Çizelge 3.6. *MspI* enzim kesim reaksiyonu

Bileşenler	Hacim (µl)
<i>MspI</i> enzimi (10U/ µl)	1 µl
10x Tango tampon çözeltisi	2 µl
ddH ₂ O	7 µl
Toplam	10 µl

MspI kesim çözeltisi bir seferde incelenecek olan örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde steril 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde hazırlanmış ve her bir PCR ürününün bulunduğu tüplere 10'ar µl olacak biçimde eklenmiştir. Üzerine *MspI* kesim çözeltisi eklenmiş olan PCR ürünleri Biorad-My Cycler marka model gradient thermal cycler cihazında inkübasyon işlemi için 37 °C'de 4 saat bırakılarak kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon işlemi bittikten sonra sıcaklık +4°C'ye düşürülüp reaksiyon tamamlanmıştır. Daha sonra kesim ürünlerinde genotiplerin belirlenmesi için % 2'lik agaroz jellerinde elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.9. DGAT1 Geni PCR Ürünlerinin *AluI* Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

Yapılan elektroforez sonunda 309 bp'lik bantların elde edildiği PCR ürünleri 10 U/ µl konsantrasyonunda *AluI* (Fermentas® ER0012) restriksiyon endonükleaz ile kesilmiştir. *AluI* restriksiyon enzimi aşağıda verilen nükleotid sıralarını tanıyarak bu bölgelerden yapışkan uçlu (sticky, cohesive) kesim yapmaktadır.



DGAT1 geni nükleotid dizisinde *AluI* kesim enziminin tanıma bölgesi Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

```

8101 ccggcggggc agcagcaagt gggcagctag gacgggggtg ttctggcct ctgccttctt
8161 ccatgaggtc agtgactga gggcgcgcc tgcccctggg ggtgggggtg ggtggggcgg
8221 ggcaggggct tggctaacgc ccctctccc cccagtacct ggtgagcatc cccctgcgca
8281 tgttccgcct ctgggccttc accggcatga tggcacaggt gagcagccct ggacccccac
8341 ctgagagccc accccgtggg cgcagaggct cactcccgtc ccatgtcccc agatcccgtc
8401 ggcctggata gtcggccgct tcttccgtgg caactatggc aacgcggctg tgtggctgtc
8461 actcatcatt gggcagccag tggccgtcct gatgtacgtc cagcactact acgtgctcaa
8521 ccgagaggcc ccaacagccg gcacctgagc ccctccaggc tggttccctc aggggtgttg
8581 gactcctttg cctcaccact tgctgctgta ctggagcctg cccccaacct gggcgtaggg
8641 gaggggcctg gctggtgaaa gctgcctcct ggcccc

```

Şekil 3.4. DGAT1 geni nükleotid dizisinde *AluI* kesim enziminin tanıma bölgesi (NBCI, 2023b)

309 bç'lik PCR ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz ile kesim işlemi her bir örnek için toplam hacim 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. İçeriği Çizelge 3.7'de verilen bu 10 µl *AluI* kesim çözeltisi 15 µl PCR ürünlerinin üzerine eklenmiştir.

Çizelge 3.7. *AluI* enzim kesim reaksiyonu

Bileşenler	Hacim (µl)
<i>AluI</i> enzimi (10U/ µl)	1 µl
10x Tango tampon çözeltisi	2 µl
ddH ₂ O	7 µl
Toplam	10 µl

AluI kesim çözeltisi bir seferde incelenecek olan örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde steril 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde hazırlanmış ve her bir PCR ürününün bulunduğu tüplere 10'ar µl olacak biçimde eklenmiştir. Üzerine *AluI* kesim çözeltisi eklenmiş olan PCR ürünleri Biorad-My Cycler marka model gradient thermal cycler cihazında inkübasyon işlemi için 37 °C'de 4 saat bırakılarak kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon işlemi bittikten sonra sıcaklık +4°C'ye düşürülüp reaksiyon tamamlanmıştır. Daha sonra kesim ürünlerinde genotiplerin belirlenmesi için % 2'lik agaroz jellerinde elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.10. Agaroz Jellerdeki CAST ve DGAT1 Genotiplerinin Bilgisayara Aktarılması

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme yapılacak jel üzerindeki PCR-RFLP modelleri Jel Görüntüleme Analiz (Kodak Gel Logic 200) cihazında UV ışığı altında bilgisayara aktarılmıştır. İşlem sonunda bantlar görünür hale getirilip genotipler belirlenmiştir.

3.11. CAST Genotiplerinin Belirlenmesi

CAST geni PCR ürünlerinde uygulanan *MspI* restriksiyon enzimi ile muamele sonucu genotiplerin belirlenmesi için %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Ethidium bromide ile boyanarak jel görüntüleme cihazında UV ışığı altında görüntüleme yapılmıştır. Enzim kesim sonucunda beklenen bant modelleri Çizelge 3.8'de verilmiştir. Koyun CAST geninde enzim kesim işleminden sonra 3 genotip belirlenmiştir. MM genotipine sahip bireylerde 336 ve 286 bç'lik iki bant, MN genotipine sahip bireylerde 622, 336 ve 286 bç'lik üç bant NN genotipine sahip bireylerde 622 bç'lik tek bant olduğu belirlenmiştir. Çizelge 3.8'de verildiği gibi tüm genotiplerde 336 ve 286 bç'lik bantlar MM genotipini ayırırken, 622 bç'lik bant NN genotipinin ayırımını yapmaktadır.

Çizelge 3.8. CAST genotiplerinin belirlenmesi

PCR ürünü	<i>MspI</i>		
	MM	MN	NN
622 bç		622 bç	622 bç
	336 bç	336 bç	
	286 bç	286 bç	

3.12. DGAT1 Genotiplerinin Belirlenmesi

DGAT1 geni PCR ürünlerinde uygulanan *AhaI* restriksiyon enzimi ile muamele sonucu genotiplerin belirlenmesi için %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Ethidium bromide ile boyanarak jel görüntüleme cihazında UV ışığı altında görüntüleme yapılmıştır. Enzim kesim sonucunda beklenen bant modelleri Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Koyun DGAT1 geninde enzim kesim işleminden sonra 3 genotip belirlenmiştir. TT genotipine sahip bireylerde 272 ve 37 bç'lik iki bant, CT genotipine sahip bireylerde 309, 272 ve 37 bç'lik üç bant, CC genotipine sahip bireylerde 309 bç'lik tek bant olduğu belirlenmiştir. Çizelge 3.9'da verildiği gibi tüm genotiplerde 272 ve 37 bç'lik bantlar TT genotipini ayırırken, 309 bç'lik bant CC genotipinin ayırımı yapmaktadır.

Çizelge 3.9. DGAT1 genotiplerinin belirlenmesi

PCR ürünü	AluI		
	TT	CT	CC
309 bç		309 bç	309 bç
	272 bç	272 bç	
	37 bç	37 bç	

3.13. İstatiksel Analizler

Araştırma sonunda elde edilen jel fotoğraflarından Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarının her bireye ait genotipleri belirlendikten sonra CAST ve DGAT1 genlerinin gen ve genotip frekansları direkt sayım metoduyla hesaplanmıştır. Araştırmada kullanılan dört koyun ırkının gen ve genotip frekansları hepsi için hesaplanarak, populasyonun tamamı için de hesaplanmış ve aşağıda verilen eşitliklerden hesaplanmıştır. Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkı populasyonlarının CAST ve DGAT1 gen bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinde olup olmadıkları ki-kare (χ^2) testi ile hesaplanmıştır (Hartl ve Clark, 1989).

$$P_i = \frac{(2f_1 + f_2)}{2N}$$

$$S_{P_i} = \sqrt{\frac{P_i(1-P_i)}{2N}}$$

P_i : i'inci allel frekansı

f_i : 1'inci allel bakımından homozigot genotipine sahip bireylerin sayısı

f_2 : 2'inci allel bakımından heterozigot genotipine sahip bireylerin sayısı

N : Toplam birey sayısı

S_{p_i} : i'inci allel frekansının standart hatası

ki-kare (χ^2) eşitliği:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(f_i - f'_i)^2}{f'_i}$$

χ^2 : ki-kare

f_i : i'inci genotip gözlenen frekansı

f'_i : i. genotip beklenen frekansı

Eşitlikten elde edilen hesaplamalar sonucu ki-kare (χ^2) değeri serbestlik derecesi 1 olan tablo değeri ile karşılaştırılarak Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkı populasyonlarının CAST ve DGAT1 gen bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinde olup olmadığı belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. CAST geninin PCR ile çoğaltılması

CAST geninin PCR ile çoğaltılması bölüm 3.5'de belirtilen Palmer vd. (1998) tarafından belirlenen PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemi sonucunda çoğaltılan gen bölgeleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. CAST geni için yapılan PCR işlemi sonunda 622 bç uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir. Elde edilen DNA bantları UV ışığı altında görüntülenmiş ve Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

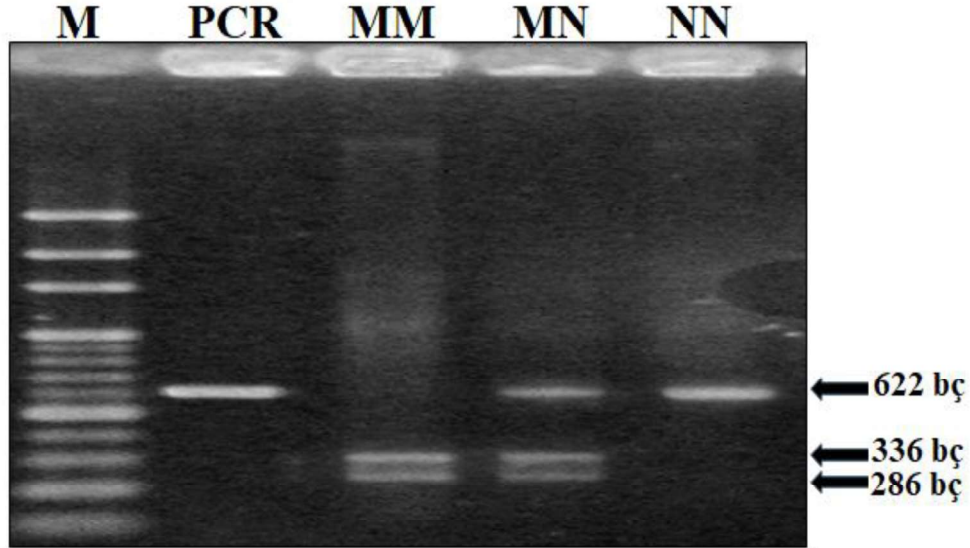
4.1.2. DGAT1 geninin PCR ile çoğaltılması

DGAT1 geninin PCR ile çoğaltılması bölüm 3.6'da belirtilen Yang vd. (2011) tarafından belirlenen PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemi sonucunda çoğaltılan gen bölgeleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve DGAT1 geni için yapılan PCR işlemi sonunda 309 bç uzunluğunda DNA bantları elde edilmiştir. Elde edilen DNA bantları UV ışığı altında görüntülenmiş ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

4.1.3. CAST geni PCR ürünlerinin *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi

CAST geninin M ve N allellerinin ayrımının yapılabilmesi için, PCR işleminde çoğalttığımız DNA bölgeleri, 5'-C⁺CGG-3' kesim enzimlerinin tanıma bölgesine sahip *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkına ait genomik DNA örneklerinden çoğaltılan 622 bç'lik CAST geni PCR işlemi sonucunda elde edilen ürünlerin *MspI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda; %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemi sonucunda MM, MN ve NN olarak adlandırılan üç genotipin bulunduğu görülmüştür. Homozigot MM genotipine sahip bireylerde 336 ve 286 bç boyutunda iki bant, heterozigot MN genotipine sahip bireylerde 622, 336 ve 286 bç boyutunda üç bant ve homozigot NN genotipine sahip bireylerde 622 bç boyutunda tek bir

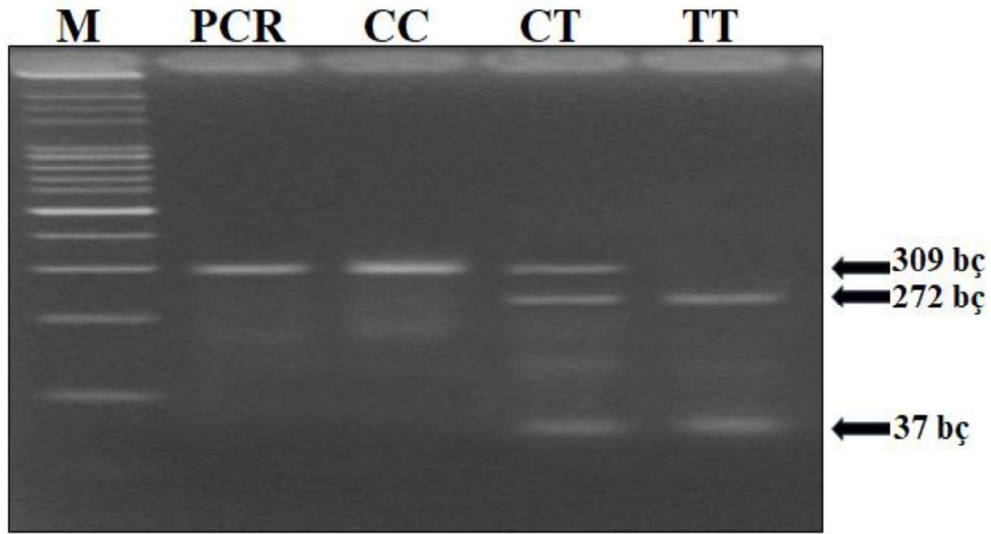
bant gözlenmiştir. Şekil 4.1’de CAST geninin PCR-RFLP işlemi sonunda UV ışığı altında agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1. CAST/*Msp*I polimorfizminin %2’lik agaroz jel görüntüsü (M:100 bç DNA ladder)

4.1.4. DGAT1 geni PCR ürünlerinin *Alu*I restriksiyon enzimi ile kesilmesi

DGAT1 geninin C ve T allellerinin ayrımı için, PCR’da çoğalttığımız agaroz jel elektroforezi sonunda 309 bç’lik DNA örneklerini içeren PCR ürünleri 5’-AG⁺CC-3’ tanıma bölgesine sahip restriksiyon enzimi *Alu*I ile kesilmiştir. Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkına ait genomik DNA örneklerinden çoğaltılan 309 bç boyutundaki DGAT1 geni PCR işlemi sonucunda elde edilen ürünlerin *Alu*I restriksiyon enzimiyle kesimi işlemi sonunda %2’lik agaroz jelde elektroforez işlemi sonucunda CC, CT ve TT olarak adlandırılan üç genotipin bulunduğu görülmüştür. Homozigot CC genotipine sahip bireylerde 309 bç boyutunda tek bant, homozigot TT genotipine sahip bireylerde 272 ve 37 bç boyutunda iki bant ve heterozigot CT genotipine sahip bireylerde 309, 272 ve 37 bç boyutunda üç bant gözlenmiştir. Şekil 4.2’de DGAT1 geninin PCR-RFLP işlemi sonunda UV ışığı altında agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.2. DGAT1/*AluI* polimorfizminin %2'lik agaroz jel görüntüsü (M:100 bç DNA ladder)

4.1.5. CAST gen ve genotip frekansları

Eskişehir'de halk elinde yetiştiriciliği yapılan Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarından elde edilen sonuçlardan CAST geni yönünden polimorfik olduğu belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan dört koyun ırkından alınan kanlardan elde edilen DNA örneklerinden CAST geninin M ve N allellerinin farklı frekanslarda olduğu belirlenmiştir. Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarının M ve N allel frekansı 0.67-0.33, 0.75-0.25, 0.75-0.25 ve 0.76-0.24 olarak hesaplanmıştır. M allel frekansı 0.76 ile en yüksek Suffolk ırkında, 0.67 ile en düşük Orta Anadolu Merinos ırkındadır.

Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında MM, NN ve MN genotiplerinin farklı frekanslarda olduğu belirlenmiştir. MM, MN ve NN genotip frekansları sırasıyla Orta Anadolu Merinosu 0.40, 0.54 ve 0.06; Pırlak 0.63, 0.25 ve 0.12; Romanov 0.70, 0.10 ve 0.20; Suffolk 0.71, 0.10 ve 0.19 olarak tespit edilmiştir. Dört koyun ırkına ait CAST geninin gen ve genotip frekansları Çizelge 4.1'de, gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleriyle hesaplanan ki-kare testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Eskişehir’de halk elinde yetiştirilen yerli koyun ırklarında CAST geninin genotip ve allel frekansları

İrk	N	Genotip Frekansları			Allel Frekansları	
		MM	MN	NN	M	N
Orta Anadolu Merinosu	137	0.40	0.54	0.06	0.67	0.33
Pırlak	8	0.63	0.25	0.12	0.75	0.25
Romanov	10	0.70	0.10	0.20	0.75	0.25
Suffolk	21	0.71	0.10	0.19	0.76	0.24

Çizelge 4.2. CAST geninin gözlenen ve beklenen genotip frekansları ve ki-kare testi

İrk	Gözlenen Genotip Frekansları			Beklenen Genotip Frekansları			χ^2
	MM	MN	NN	MM	MN	NN	
Orta Anadolu Merinosu	55	74	8	61.4	60.5	14.9	6.86
Pırlak	5	2	1	4.5	3	0.5	0.88
Romanov	7	1	2	5.6	3.7	0.6	5.37
Suffolk	15	2	4	12.1	7.6	1.2	12.64

$\chi^2_{1,0.05}$: 3.841 Hardy-Weinberg genetik dengesi ($P<0.05$)

Çizelge 4.2’de verilen hesaplamalar sonucunda, CAST geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun populasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık χ^2 testi ile kontrol edilmiştir. CAST geni bakımından Pırlak populasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmamıştır. CAST geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun populasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Eskişehir ilinde halk elinde yetiştirilen Pırlak koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu, Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı bulunmuştur ($P<0.05$).

4.1.6. DGAT1 gen ve genotip frekansları

Eskişehir ilinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarından elde edilen sonuçlar DGAT1 geni yönünden polimorfik olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmada kullanılan dört koyun ırkından alınan kanlardan elde edilen DNA örneklerinden DGAT1 geninin C ve T allellerinin farklı frekanslarda olduğu belirlenmiştir. Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarının C ve T allel frekansı 0.60-0.40, 0.25-0.75, 0.80-0.20 ve 0.31-0.69 olarak hesaplanmıştır. C allel frekansı 0.80 ile en yüksek Romanov ırkında, 0.25 ile en düşük Pırlak ırkındadır.

Araştırmada kullanılan Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında CC, TT ve CT genotip frekanslarının farklı olduğu tespit edilmiştir. Homozigot TT genotipi Romanov ırkında ve heterozigot CT genotipi Pırlak ırkında tespit edilememiştir. CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla Orta Anadolu Merinosu 0.40, 0.40 ve 0.20; Pırlak 0.25, 0 ve 0.75; Romanov 0.60, 0.40 ve 0; Suffolk 0.14, 0.33 ve 0.53 olarak tespit edilmiştir. Dört koyun ırkına ait DGAT1 geninin gen ve genotip frekansları Çizelge 4.3’de, gözlenen ve beklenen heterozigotluk değerleriyle ki-kare testinin sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Eskişehir’de halk elinde yetiştirilen yerli koyun ırklarında DGAT1 geninin genotip ve allel frekansları

İrk	N	Genotip Frekansları			Allel Frekansları	
		CC	CT	TT	C	T
Orta Anadolu Merinosu	137	0.40	0.40	0.20	0.60	0.40
Pırlak	8	0.25	-	0.75	0.25	0.75
Romanov	10	0.60	0.40	-	0.80	0.20
Suffolk	21	0.14	0.33	0.53	0.31	0.69

Çizelge 4.4. DGAT1 geninin gözlenen ve beklenen genotip frekansları ve ki-kare testi

İrk	Gözlenen Genotip Frekansları			Beklenen Genotip Frekansları			χ^2
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Orta Anadolu Merinosu	55	55	27	49.3	65.7	21.9	3.59
Pırlak	2	-	6	0.5	3	4.5	8
Romanov	6	4	-	6.4	3.2	0.4	0.62
Suffolk	3	7	11	2.01	8.9	9.9	1.01

$\chi^2_{1,0.05}$: 3.841 Hardy-Weinberg genetik dengesi ($P<0.05$)

Çizelge 4.4’de verilen hesaplamalar sonucunda, DGAT1 geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun populasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık χ^2 testi ile kontrol edilmiştir. DGAT1 geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk populasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmamıştır. DGAT1 geni bakımından Pırlak koyun populasyonunda gözlenen ve beklenen genotip frekansları arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Eskişehir ilinde halk elinde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırkında Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu, Pırlak koyun ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı bulunmuştur ($P<0.05$).

4.2. Tartışma

4.2.1. CAST geni polimorfizmi

Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkı populasyonunda CAST lokusunda MM, MN ve NN olmak üzere üç farklı genotip belirlenmiştir. Araştırılan bütün koyun ırklarının CAST lokusu bakımından polimorfik yapıda olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak tüm ırklarda M allel frekansının (0.73), N allel frekansından yüksek olduğu görülmüştür. CAST/*MspI* polimorfizminin ülkemizde ve diğer

ülkelerde yapılan çalışmalarda da genellikle M allel frekansının N allel frekansından yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Literatürde farklı koyun ırklarında CAST/*MspI* polimorfizminin belirlenmesi için yapılan çalışmalar Çizelge 4.5’de verilmiştir. Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında 0.75-0.25 olarak hesaplanan M ve N allel frekansları diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında; Shahroudi vd. (2006), Szkudlarek-Kowalczyk (2011), Gharahveysi vd. (2012), Tohidi (2013), Sunilkumar vd. (2014), Avanus vd. (2015), Bozhilova-Sakova vd. (2020) ve Bayraktar ve Shoshin (2022) koyunlarından elde edilen allel frekanslarıyla uyumlu bulunmuştur.

Orta Anadolu Merinosu koyun ırkında 0.67-0.33 olarak hesaplanan M ve N allel frekansı diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında; Nanekarani vd. (2011), Tohidi (2013), Asadi vd. (2014) ve Balcıoğlu vd. (2014) tarafından elde edilen bulgular ışığında allel frekanslarıyla benzer bulunmuştur.

Gabor vd. (2009), Szkudlarek-Kowalczyk vd. (2011), Khan vd. (2012), Suleman vd. (2012), Tohidi (2013), Balcıoğlu vd. (2014), Yılmaz vd. (2014a), Yılmaz vd. (2014b) ve Georgieva vd. (2015) tarafından yapılan çalışmalar incelendiğinde hesaplanan M ve N allel frekanslarının bu çalışma sonucunda belirlenen M ve N allel frekansından yüksek olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5. CAST geni PCR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmalarda tespit edilen M ve N allel frekansları

Irk	Allel Frekansları		Kaynak
	M	N	
Karagül	0.79	0.21	Shahroudi vd. 2006
Tsigai x Lacaune	0.90	0.10	Gabor vd. 2009
Tsigai	0.91	0.09	
Polonya Merinos	0.76	0.24	Szkudlarek-Kowalczyk 2011
Berrichon du Cher	0.92	0.08	
Ile de France	0.95	0.05	
Atabi	0.64	0.36	Nanekarani vd. 2011
Zel	0.75	0.25	Gharahveysi vd. 2012
Balkhi	0.88	0.12	Khan vd. 2012
Kajli	0.86	0.14	
Lohi	0.87	0.13	Suleman vd. 2012
Kajli	0.81	0.19	
Thalli	0.90	0.10	
Sanjabi	0.72	0.28	Tohidi 2013
Ghezel	0.69	0.31	
Afshari	0.63	0.37	
Makui	0.88	0.12	
Bandur	0.72	0.28	Sunilkumar vd. 2014
Lori	0.63	0.37	Asadi vd. 2014
Güney Karaman	0.67	0.33	Balcıoğlu vd. 2014
Akkaraman	0.69	0.31	
İvesi	0.59	0.41	
Kangal	0.92	0.08	
Karayaka	0.89	0.11	
Morkaraman	0.87	0.13	
Gökçeada	0.99	0.01	Yılmaz vd. 2014a
Kıvırcık	0.85	0.15	
Karacabey Merinosu	0.80	0.20	
Kıvırcık	0.84	0.16	Yılmaz vd. 2014b
Karagül	0.73	0.27	Avanus vd. 2015
Shumen	0.92	0.08	Georgieva vd. 2015
Kuzeydoğu Bulgar Merinosu	0.73	0.27	Bozhilova-Sakova vd. 2020
İvesi	0.78	0.22	Bayraktar ve Shoshin 2022

Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkı popülasyonunda CAST geninde belirlenen MM, MN ve NN genotip frekansları sırası ile Orta Anadolu Merinosu koyun ırkında 0.40, 0.54, 0.06; Pırlak koyun ırkında 0.63, 0.25, 0.12;

Romanov koyun ırkında 0.70, 0.10, 0.20 ve Suffolk koyun ırkında 0.71, 0.10, 0.19 olarak belirlenmiştir.

CAST geni bakımından Pırlak populasyonunda gözlenen ve beklenen frekans farklılıkları istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Pırlak populasyonunun CAST polimorfizmi yönünden Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu belirlenmiştir. Elimizde herhangi bir veri olmadığı için Pırlak populasyonunda CAST geni bakımından herhangi bir genotip seleksiyonun yapılmadığı ve rastgele çiftleşme olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

CAST geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk populasyonunda gözlenen ve beklenen frekans farklılıkları istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinden saptıkları belirlenmiştir. Hardy-Weinberg genetik dengesi göç, mutasyon, seleksiyon ve rastgele olmayan çiftleşme gibi sebeplerden etkilenir. Orta Anadolu Merinosu koyun ırkına ait örnekler Eskişehir ilçelerinden küçük ölçekli işletmelerden rastgele toplanmıştır. Elimizde herhangi bir veri olmadığı için populasyon az sayıda koçlarla çiftleştirilmiş olabileceğinden dolayı rastgele olmayan çiftleşme ve seleksiyon seçimine bağlanmış olabilir. Romanov ve Suffolk koyun ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinden sapması ise az sayıda koçlarla çiftleştirilmiş olabileceğinden dolayı rastgele olmayan çiftleşme ve örnek sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Romanov ve Suffolk koyun ırkında örnek sayısı artırılarak araştırmaların yapılması daha doğru sonuçlar verebilir.

Kas hücrelerinin gelişiminin düzenlenmesindeki rolü nedeniyle CAST geninin çiftlik hayvanlarında büyümenin kontrolünde önemli bir aday gen olduğu düşünülmektedir. Koyunlarda CAST geninde belirlenen polimorfizmler ile farklı dönemlerdeki canlı ağırlıklar arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Literatürde yapılan çalışmaların çoğunda MM genotip frekansının diğer genotiplerden yüksek olduğu bildirilmiştir. Ancak MN genotip frekansının yüksek olduğu çalışmalar da bildirilmiştir. İvesi ırkı koyunlarda yürütülen bir çalışmada MN genotip frekansına sahip bireylerin diğer genotip frekansına sahip bireylere göre daha yüksek canlı ağırlık kazancına sahip olduğunu bildirmişlerdir (Jawasreh vd., 2017). Pakistan'da yetiştirilen lokal Balkhi ve Kajli koyun ırklarında MN genotipindeki bireylerin günlük canlı

ağırlık artışının diğer genotiplere göre daha iyi oldukları bildirmişlerdir (Khan vd., 2012). Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu koyun ırkında MN genotipinin en yüksek frekansa sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun altında yatan nedeninin Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarının %80 Alman Et Merinosu koyun ırkı kanı taşıması olduğu düşünülmektedir.

4.2.2. DGAT1 geni polimorfizmi

Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırkı popülasyonunda DGAT1 geninde CC, CT ve TT olmak üzere üç farklı genotip belirlenmiştir. Araştırılan bütün koyun ırklarının DGAT1 lokusu bakımından polimorfik yapıda olduğu tespit edilmiştir. C allel frekansının (0.80) en yüksek Romanov, T allel frekansının (0.75) Pırlak koyun ırkında yüksek olduğu görülmüştür. Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırkının DGAT1/*AluI* polimorfizmi yönünden Hardy-Weinberg genetik dengesinde oldukları, Pırlak koyun ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinden saptığı görülmüştür. Literatürde farklı koyun ırklarında DGAT1/*AluI* polimorfizminin belirlenmesi için yapılan çalışmalar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Romanov koyun ırkında 0.80-0.20 ve Orta Anadolu Merinosu koyun ırkında 0.60-0.40 olarak hesaplanan C ve T allel frekansları diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında; Yang vd. (2011), Mahrous vd. (2015), Özmen ve Kul (2016), Meena vd. (2016), Nanekarani vd. (2016), Bayram vd. (2018), Altwaty vd. (2020) ve Bayraktar ve Shoshin (2022) tarafından koyunlardan elde edilen allel frekansları C allel frekansıyla uyumlu bulunmuştur.

Pırlak koyun ırkında 0.25-0.75 ve Suffolk koyun ırkında 0.31-0.69 olarak hesaplanan C ve T allel frekansı diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında; Xu vd. (2008), Mohammadi vd. (2013) ve Noshahr ve Rafat (2014) tarafından koyunlardan elde edilen allel frekansları T allel frekanslarıyla uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 4.6. DGAT1 geni PCR-RFLP yöntemi ile yapılan çalışmalarda tespit edilen C ve T allel frekansları

İrk	Allel Frekansları		Kaynak
	C	T	
İç Moğolistan	0.26	0.74	Xu vd. 2008
Tan	0.41	0.59	
Han	0.38	0.62	
Tan	0.77	0.23	Yang vd. 2011
Ganjia	0.69	0.31	
Oula	0.65	0.35	
Qiaoke	0.62	0.38	
Lori-Bakhtiari	0.26	0.74	Mohammadi vd. 2013
Zel	0.19	0.81	
Moghani	0.17	0.83	Noshahr ve Rafat 2014
Barki	0.88	0.12	Mahrous vd. 2015
Rahmani	0.80	0.20	
Akkaraman	0.87	0.13	Özmen ve Kul 2016
İvesi	0.89	0.11	
Malpura	0.92	0.08	Meena vd. 2016
Lori	0.56	0.44	Nanekarani vd. 2016
Akkaraman	0.96	0.04	Bayram vd. 2018
Najdi	0.83	0.17	Altwayt vd. 2020
Barki	0.89	0.11	
Harri	0.75	0.25	
İvesi	0.58	0.42	Bayraktar ve Shoshin 2022

Bu çalışmada dört koyun ırkı popülasyonunda DGAT1 geninde belirlenen CC, CT ve TT genotip frekansları sırası ile Orta Anadolu Merinosu koyun ırkında 0.40, 0.40, 0.20; Pırlak koyun ırkında 0.25, 0, 0.75; Romanov koyun ırkında 0.60, 0.40, 0 ve Suffolk koyun ırkında 0.14, 0.33, 0.53 olarak bulunmuştur.

DGAT1 geni bakımından Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk popülasyonunda gözlenen ve beklenen frekans farklılıkları istatistik olarak önemli bulunmamıştır. Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk popülasyonunun DGAT1 polimorfizmi yönünden Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu belirlenmiştir. Elimizde herhangi bir veri olmadığı için Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk popülasyonunda DGAT1 geni bakımından herhangi bir genotip seleksiyonun yapılmadığı ve rastgele çiftleşme gerçekleştirilmiş olabileceği düşünülmektedir.

DGAT1 geni bakımından Pırlak popülasyonunda gözlenen ve beklenen frekans farklılıkları istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Pırlak popülasyonunun DGAT1 polimorfizmi yönünden Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı belirlenmiştir. Elimizde herhangi bir veri olmadığı için Pırlak popülasyonu az sayıda koçlarla çiftleştirilmiş olabileceğinden dolayı rastgele olmayan çiftleşme, seleksiyon seçimi ve örnek sayısının az olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Pırlak koyun ırkında örnek sayısı artırılarak araştırmaların yapılması daha doğru sonuçlar verebilir.

Çiftlik hayvanlarında DGAT1 geni çoğunlukla süt proteinleri ile süt yağı arasındaki ilişkileri ile ilgili çalışmalarda incelenmiş bir genidir. DGAT1 geni ile et kalitesi, büyüme ve canlı ağırlık artışı ile ilgili özelliklerin araştırıldığı çalışmalar nispeten daha azdır. Bu çalışmada Pırlak koyun ırkında CT genotipi gözlenmezken, Romanov koyun ırkında TT genotipi görülmemiştir. Literatürdeki çalışmalarda, İran'da yetiştirilen yağlı kuyruklu Lori-Bakhtiari koyunları ile küçük kuyruklu Zel koyun ırklarında CC genotipli bireylerin diğer genotiplere göre daha yüksek sıcak karkas ağırlığına ve daha yüksek randımana sahip oldukları bildirmişlerdir (Mohammadi vd., 2013). İran'da yetiştirilen Moghani ırkı koyunlarda CC genotipli bireylerin sıcak karkas ağırlığı yönünden diğer genotiplilerden üstün oldukları bildirmişlerdir (Noshahr ve Rafat, 2014). Sekiz yerli Hint koyun ırkında CC genotipine sahip bireylerin koyun eti ve karkas ağırlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir (Kumar vd., 2016). Malpura koyun ırkında CC genotipinin baskın olduğunu bildirmişlerdir. C allelinin daha fazla yağ kuyruğu ağırlığı ve sırt yağ kalınlığı ile ilişkili olduğunu ve karkas ağırlığını artırma eğilimi olduğunu bildirmişlerdir ve bu allelin karkas ağırlığını artırmasını daha detaylı şekilde araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Meena vd., 2013). İvesi koyun ırkında CC genotipli bireylerin diğer genotiplere göre daha yüksek kuyruk yağı ve kuyruk uzunluğu arasında olumlu bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Bayraktar ve Shoshin, 2021). Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu ve Romanov koyun ırkında CC genotipi diğer genotiplerden yüksek ve C alleli baskın allel bulunmuştur. Orta Anadolu Merinosu koyunu et verimi yüksek bir ırktır. CC genotipinin yüksek olmasının nedeni Orta Anadolu Merinosu koyun ırklarının %80 Alman Et Merinosu koyun ırkı kanı taşıması olduğu düşünülmektedir.

Mısır'da yetiştirilen Barki, Rahmani ve Osseimi koyun ırklarında CT genotipinin orta derecede kas mermerleşme yağ yapısı ve kas içi yağ içeriğine olumlu yönde etki ettiğini

bildirmişlerdir (Mahrous vd., 2015). Barki koyun ırkında yapılan bir çalışmada CT genotipli bireylerin kas mermerleşme yapısı ve orta derecede kas içi yağ içeriğini arttırdığını ve üstün performans gösterdiği bildirmişlerdir (Altwaty vd., 2020). Akkaraman koyun ırkında DGAT1 ile canlı ağırlık arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada C allelinin baskın allel olduğunu ve CT genotipli kuzuların daha yüksek doğum ağırlığına sahip olduğunu bildirmişlerdir (Bayram vd., 2018). Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu koyun ırkında CT genotipine sahip bireylerin diğer genotipe sahip bireylerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunların altında yatan nedenin Orta Anadolu Merinosu koyun ırkının %80 Alman Et Merinosu ırkı kanı taşıması olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen Yüksek Lisans tez çalışması Eskişehir ilinde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında CAST ve DGAT1 gen polimorfizmlerinin belirlendiği ilk çalışmadır. CAST geninin et kalitesi ve yumuşaklığı üzerinde etkili bir aday gen olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bu çalışmada Pırlak koyun ırklarının CAST geni için polimorfik olduğu ve popülasyonların Hardy-Weinberg genetik dengesinde olduğu belirlenmiştir. Pırlak popülasyonunda rastgele çiftleşme ve örnek sayısının az olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Pırlak koyun ırkında örnek sayısı artırılarak benzer çalışmaların yapılması daha doğru sonuçlar verebilir.

Orta Anadolu Merinosu koyun ırkı ilgili gen bakımından Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmasa bile MN genotipinin %50'nin üzerinde olması Marker Destekli Seleksiyon çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir. Daha önce de belirtildiği gibi MN genotipini taşıyan hayvanların günlük canlı ağırlık artışı MM ve NN genotiplerine oranla daha fazladır. Suffolk ve Romanov koyun ırkının Hardy-Weinberg genetik dengesinden sapması ise az sayıda koçlarla çiftleştirilmiş olabileceğinden dolayı rastgele olmayan çiftleşme ve örnek sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Suffolk ve Romanov koyun ırkında örnek sayısı artırılarak benzer çalışmaların yapılması daha doğru sonuçlar verebilir. Romanov ve Suffolk koyun ırkında MN genotipi düşük frekanslarda (0.10) bulunmasına karşın bunun altında yatan neden de düşük örnek sayısı olabilir. Bu ırklarda örnek sayısı artırılarak ilgili gen bölgelerinin çalışılması daha doğru sonuçlar verebilir.

DGAT1 geninin 17. ekzonundaki polimorfizmin karkas ağırlığı ilişkili önemli bir aday gen olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Orta Anadolu Merinosu, Romanov ve Suffolk koyun ırklarında DGAT1 polimorfizmi yönünden Hardy-Weinberg genetik dengesinde oldukları ve CT genotipli bireylerin daha fazla görüldüğü belirlenmiştir. CT genotipin hayvanlarda daha fazla mermerleşme ve kuzularda daha yüksek doğum ağırlığına neden olması sebebiyle ilgili ırklarda MAS çalışmalarında kullanılabileceği söylenebilir. Pırlak

koyun ırkında TT genotipli bireylerin frekansının daha yüksek olduğu ve populasyonun Hardy-Weinberg genetik dengesinde olmadığı bulunmuştur. Pırlak ırkındaki bu farklılık az sayıda koçlarla çiftleştirilmiş olabileceğinden dolayı rastgele olmayan çiftleşme, seleksiyon seçimi ve kullanılan örneklerin sayısından kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle örnek sayısı artırılarak tekrar araştırılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışılan ırklarda et verim ve kalite özelliklerinin altında yatan genetik potansiyelin belirlenmesi için daha fazla sayıda örnekle, hayvanların fenotipik verilerini de dahil ederek çalışılması daha doğru sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan koyun ırklarında et verimi ve kalitesi ile ilişkili aday genlerin belirlenmesi ileride yapılması muhtemel ıslah çalışmaları açısından oldukça önemlidir. Et verimi ve kalitesi ile ilişkili aday genlerin belirlenmesi ve bu genlerin MAS çalışmalarında kullanımı sayesinde seleksiyonda başarı oranı artırılıp, daha hızlı genetik ilerleme sağlanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altwaty, N. H., Salem, L. M., Mahrous, K. F. (2020). *Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone receptor gene and AluI polymorphisms in the diacylglycerol acyltransferase 1 gene as related to meat production in sheep*. Veterinary World, 13(5), 884. DOI: 10.14202/vetworld.2020.884-889.
- Anton, I., Kovacs, K., Hollo, G., Farkas, V., Lehel, L., Hajda, Z., Zsolnai, A. (2011). *Effect of Leptin, DGAT1 and TG gene polymorphisms on the intramuscular fat of angus cattle in hungary*. Livestock Science, 135: 300–303. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.07.012.
- Asadi, N., Nanekarani, S., Khederzadeh, S. (2014). *Genotypic frequency of calpastatin gene in lori sheep by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method*. African Journal of Biotechnology, 13: 1952-1954. DOI: 10.5897/AJB12.1354.
- Ata, N. (2012). *Çine Çaparı ve Karya koyunlarda calpastatin gen polimorfizminin PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmesi*. [Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>.
- Avanus, K. (2015). *Genetic variability of CAST gene in native sheep breeds of Turkey*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21(6): 789-794. DOI: 10.9775/kvfd.2015.13138.
- Azari, M. A., Dehnavi, E., Yousefi, S., Shahmohamadi, L. (2012). *Polymorphism of calpastatin, calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran*. Slovak Journal Animal Science, 45(1): 1-6.
- Balcıoğlu, M. S., Karlı, T., Şahin, E., Ulutaş, Z., Aksoy, Y. (2014). *Türkiye’de yetiştirilen bazı yerli koyun ırklarında kalpastatin (CAST) geni polimorfizminin PCR-RFLP yöntemiyle belirlenmesi*. Tarım Bilimleri Dergisi, 20: 427-433. DOI: 10.15832/tbd.87050.
- Bayraktar, M., Shoshin, O. (2021). *Estimation of the associations between GH and DGAT1 genes and growth traits by using decision tree in Awassi sheep*. Animal Biotechnology, 1-7. NO. 1, 167–173. DOI: 10.1080/10495398.2021.1975727.
- Bayraktar, M., Shoshin, O. (2022). *Association between CAST and MSTN gene polymorphisms with growth traits in Awassi sheep*. Kuwait Journal Science, 49(2): 1-15. DOI: 10.48129/kjs.10955.
- Bayram, D., Akyüz, B., Çınar, M. U., Arslan, K., İlgar, E. G., Özdemir, F. (2018). *Türkiye’de yerli koyun ırklarından Akkaraman ırkında canlı ağırlık artışı üzerine etkili üç aday gen yönünden genetik karakterizasyonları ve genotip-fenotip ilişkilerinin araştırılması*. Sonuç Raporu, Erciyes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, 35 s. TSA-2016-6541. DOI: 10.9775/kvfd.2018.20055.
- Bozhilova-Sakova, M., Dimitrova, I., Tzonev, T. I., Petrov, N. (2020). *Genotype frequencies in calpastatin (CAST) and callipyge (CLPG) genes in Northeast Bulgarian Merino sheep breed using PCR-RFLP method*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 26 (2) 2020, 475–479.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Buhman, K. K., Smith, S. J., Stone, S. J., Repa, J. J., Wong, J. S., Knapp Jr, F. F., Farese Jr. R. V. (2002). *DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis*. Journal of Biological Chemistry, 277(28), 25474-25479. DOI: 10.1074/jbc.M202013200.
- Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, Jr. C. C., Johnson, D. D., Smith, T. P. L. (2006). *Effects of calpastatin and μ -Kalpain meakers in beef cattle on tenderness traits*. Journal of Animal Science 84: 520-525. DOI: /10.2527/2006.843520x.
- Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y. W., Myers, H. M., Lear, S. R. (1998). *Identification of a gene encoding and acylcoA diacylglycerol acyltransferase a key enzyme in triacylglycerol syynthesis*. Poc. Natl. Acad. Science, 95: 13018-13023. DOI: 10.1073/pnas.95.22.1301.
- Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen, E., Tow, B., Lardizabal, K. D., Farese, R. V. (2001). *Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members*. Journal of Biological Chemistry, 276, 38870-38876. DOI: 10.1074/jbc.M106219200.
- Choi, B.H., Lee, J.S., Jang, G.W., Lee, H.Y., Lee, J.W., Lee, K.T., Chung, H.Y., Park, H.S., Oh, S.J., Sun, S.S., Myung, K.H., Cheong, I.C. ve Kim, T.H. (2006). *Mapping of the porcine calpastatin gene and association study of its variance with economic traits in pigs*. AsianAustralian Jorunal of Animal Sciences, 19, 1085- 1089. DOI: 10.5713/ajas.2006.1085.
- Ciobanu, D. C., Bastiaansen, J. W. M., Lonergan, S. M., Thomsen, H., Dekkers, J. C. M., Plastow, G. S., Rothschild, M. F. (2004). *New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs*. Journal of Animal Science 82: 2829-2839. DOI: 10.2527/2004.82102829x.
- Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Arrigoni, M. D. B., Silveira, A. C., Oliveira, H. N. (2011). *Associations between LEP, DGAT1 and FABP4 gene polymorphisms and carcass and meat traits in Nelore and crossbred beef cattle*. Livestock Science, 135(2-3), 244-250. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.07.013.
- Çelikeloğlu, K. (2012). *Pırlak Kuzularında Büyüme Eğrilerini Etkileyen Genetik ve Çevresel Faktörlerin Belirlenmesi ve Eğri Parametreleri Yönünden Baba Koçların Değerlendirilmesi*. [Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. Lalahan Hayvan Araştırma Entitüsü Dergisi 54(1):8-14. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>.
- Gabor, M., Trakovicka, A. ve Miluchova, M. (2009). *Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep By PCR-RFLP method*. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 42: 470-476.
- Gedik, Y. (2017). *Keçi populasyonlarının mukopolisakkaridoz tip III D genetik kusuru bakımından tanımlanması*. [Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Georgieva, S., Hristova, D., Dimitrova, I., Stancheva, N., Bozhilova-Sakova, M. (2015). *Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) genes in synthetic population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP*. Journal of BioScience Biotechnology, 2015, 4(1): 95-99.
- Ghanem, M.E., Akita, M., Suzuki, T., Kasuga, A., Nishibori, M. (2008). *Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation*. Animal Reproduction Science, 103: 348-354. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.006.
- Gharahveysi, S., Abbasi, H.A., Irani, M., Abdullahpour R., Mirhabibi, S. (2012). *Polymorphism investigation of calpastatin gene in Zel sheep population of Iran by PCR-RFLP method*. African Journal Biotechnol, 11:3211-3214. DOI: 10.5897/AJB11.3256.
- Giannoulia, K., Haralampidis, K., Poghosyan, Z., Murphy, D.J., Hatzopoulos, P. (2000). *Differential expression of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) genes in olive tissues*. Biochem Soc Trans, 28, 695-697. DOI: 101042/0300-5127.
- Gill, J. L., Bishop, S. C., McCorquodale, C., Williams, J. L., Wiener, P. (2009). *Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of aberdeen Angus-Sired beef cattle*. Genetics Selection Evolution, 41, 36-48. DOI: 10.1186/1297-9686-41-36.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Ouali, A. (1998). *The kalpain system and skeletal muscle growth*. Canadian Journal of Animal Science, 78: 503-512. DOI: 10.4141/A98-081.
- Gregula-Kania, M. (2011). *New allelic variant of the ovine calpastatin gene*. African Journal of Biotechnology, 10: 13082-13085. DOI: 10.5897/AJB11.1027.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. (1989). *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 37. DOI:10.2980/1195-6860(2007)14[544b:POPG]2.0.CO;2.
- HAYGEM, (2022). *Hayvancılık Genel Müdürlüğü, Ocak 2023*, Tarım ve Orman Bakanlığı. Erişim: <https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM>, Erişim Tarihi: 10.03.2023.
- Jawasreh, K. I., Jadallah, R., Al-Amareen, A. H., Abdullah, A. Y., Al-Qaisi, A., Alrawashdeh, I. M., Al-Zghoul, M. B. F., Ahamed, M. K. A., Obeidat, B. (2017). *Association between MspI calpastatin gene polymorphisms, growth performance, and meat characteristics of Awassi sheep*. Indian Journal of Animal Sciences, 87(5): 635-639.
- Kaymakçı, M., Sönmez R. (1996). *İleri Koyun Yetiştiriciliği*. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir.
- Kawasaki, H., Kawashima, S. (1996). *Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (review)*. Molecular Membrane Biology 134: 217-224. DOI: 10.3109/09687689609160599.
- Khaleel I. J., Zuhair B. İ. (2019). *Effects of calpastatin gene polymorphism on hematology and selected serum biochemical parameters in Awassi lambs*. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 6: 193-196. DOI: 10.54555/javar.2019.f331.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Khan, S. H., Riaz, M. N., Ghaffar, A., Ullah, M. F. (2012). *Calpastatin (CAST) gene polymorphism and its association with average daily weight gain in Balkhi and Kajli sheep and Beetal goat breeds*. Pakistan Journal of Zoology, 44: 377-382.
- Khederzadeh, S. (2011). *Polymorphism of calpastatin gene in crossbreed Dalagh sheep using PCR-RFLP*. African Journal of Biotechnology, 10(53): 10839-10841. DOI: 10.5897/AJB11.265.
- Kırıkçı, K., Mehmet, C. A. M., Mercan, L. (2021). *Investigation of the CAST gene polymorphism in Karayaka sheep*. Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences, 11(1): 89-93.
- Koohmaraie, M., Babiker, A. S., Schroeder, A. L., Merkel, R. A., Dutson, T. R. (1988). *Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca²⁺-dependent proteases*. Journal Food Science, 53:1638-1641. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb07803.x.
- Kolören, Z., Elif, Ç. İ. L., Emine, A. Y. A. Z., Karaman, Ü. (2017). *RFLP yönteminin parazitolojide uygulama alanları*. Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 7(2), 215-225.
- Kumar, R., Gupta, S., Meena, A. S., Naqvi, S. M. K., Kumar, S. (2016). *Polymorphism in exon 17 of diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1) gene in Indian sheep breeds*. Indian Journal of Small Ruminants, 22(2): 170-173. DOI: 10.5958/0973-9718.2016.00063.5.
- Li, X., Ekerljung, M., Lundstrom, K. ve Lunden, A. (2013). *Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in sweden*. Meat Science, 94 (2),153-158. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.01.010.
- Mahrous, K. F., Hassanane, M. S., Mordy, M. A., Shafey, H. I., Rushdi, H. E. (2015). *Polymorphism of some genes associated with meat-related traits in egyptian sheep breeds*. Iranian Journal of Applied Animal Science, 5(3): 655-663.
- Mayorek, N., Grinstein, I., Bar-Tana, J. (1989). *Triacylglycerol synthesis in cultured rat hepatocytes. The rate-limiting role of diacylglycerol acyltransferase*. European Journal of Biochemistry, 182: 395-400. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14844.x.
- McPherson, M.J, Moller, S.G. (2001). *PCR: The basics from background to bench*. BIOS Scientific Publishers Limited, 276 p., Oxford.
- Meadows J.R.S., 2014, *Sheep: domestication*. In: Smith C. (eds) Encyclopedia of Global Archaeology, Springer, New York. DOI: 10.1007/978-1-4419-0465-2_2215.
- Medrano, R.F.V., Oliveira, C.A. (2014). *Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development*. Molecular Biotechnology, 56: 599-608. DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- Meena, A. S., Sahoo, A., Bhatt, R., Kumar, S. (2016). *Genetic polymorphism of the diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene in Malpura sheep*. Indian Journal of Small Ruminants, 22(1): 97-99. DOI: 10.5958/0973-9718.2016.00013.1.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Mohammadi, H., Shahrebabak, M. M., Sadeghi, M. (2013). *Association between single nucleotide polymorphism in the ovine DGAT1 gene and carcass traits in two Iranian sheep breeds*. *Animal Biotechnology*, 24(3),159-167. DOI: 10.1080/10495398.2013.763816.
- Morris, S. T. (2017). *2-Overview of sheep production systems*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 19-35. DOI: 10.1016/B978-0-08-100718-1.00002-9.
- Mullis, K. B. (1990). *The unusual origin of the polymerase chain-reaction*. *Scientific American*, 262: 56-61.
- Murachi, T. (1989). *Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin*. *Biochem International*, 18, 263–294.
- Nanekarani, S., Khederzadeh, S., Kaftarkari, A. M. (2011). *Genotypic frequency of calpastatin gene in Atabi sheep by PBR method*. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 9:189-192.
- Nanekarani, S., Kolivand, M, Goodarzi, M. (2016). *Polymorphism of a mutation of DGAT1 gene in Lori sheep breed*. *Journal of Advanced Agriculture Technologies*, 3(1), 38-41.
- NBCI, (2023a). National Library of Medicine, *Ovis aries strain OAR_USU_Benz2616 breed Rambouillet chromosome 5, ARS-UI_Ramb_v2.0, whole genome shotgun sequence*. Erişim:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_056058.1?report=genbank&from=93695915&to=93785491, Erişim tarihi: 12.09.2023.
- NBCI, (2023b). National Library of Medicine, *Ovis aries diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene, complete cds*. Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU178818>, Erişim tarihi: 12.09.2023.
- Noshahr, F. A., Rafat, A. (2014). *Polymorphism of DGAT1 gene and its relationship with carcass weight and dressing percentage in Moghani sheep breed*. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4(2): 331–334. DOI 10.1002/jsfa.3431.
- Özgül, F. (2007). *Mitokondriyel Dna Pcr-Rflp (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye'nin farklı yörelerine ait bal arılarının tanımlanması*. [Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>. DOI: 20.500.12575/28788.
- Özmen, Ö., Kul, S. (2016). *Identification of novel SNPs and 10 bp deletion of ovine dgat1 gene and their association with milk production traits*. *Thai Journal Veterinary Medicine*, 46(2): 271-278.
- Palmer, B. R., Roberts, N., Hickford, J. G., Bickerstaffe, R. (1998). *Rapid Communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene*. *Journal of Animal Science*, 76: 1499-1500. DOI: 10.2527/1998.7651499.
- Pandey, S., Ranjan, R., Mishra, R.M., Seth, T., Saxena, R. (2012). *Effect of ANXA2 gene single nucleotide polymorphism (SNP) on the development of osteonecrosis in Indian sickle cell patient: a PCR-RFLP approach*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50: 455-8. DOI: 123456789/14325.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Reville, W. J., Goll, D. E., Zeece, M. G., Robson, R. M., Dayton, W. R. (1976). *A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover*. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, 15, 2150–2158, 1976. DOI: 10.1083/jcb.70.1.1.
- Ricordeau, G., Thimonier, J., Poivey, J. P., Driancourt, M. A., Hochereau-De-Reviers, M.T., Tchamitchian, L. (1990). *Research on the Romanov sheep breed in france: a review*. *Livestock Production Science*. 24: 305-332. DOI: 10.1016/0301- 6226(90)90009-U.
- Safkanmerinos. (2015). *Suffolk*. Safkan Merinos, Erişim: <http://www.safkanmerinos.com/tr/urunler/detay/2/suffolk>, Erişim Tarihi: 24.03.2023.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 230 (4732), 1350-1354. DOI: 10.1126/science.2999980.
- Schenkel, F. S., Miller, S. P., Jiang, Z., Mandell, I. B., Ye, X., Li, H., Wilton, J., W. (2006). *Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle*. *Journal of Animal Science*, 84: 291-299. DOI: 10.2527/2006.842291x.
- Sevane, N., Armstrong, E., Wiener, P., Pongwong, R., Dunner, S., Gemqual, C. (2014). *Polymorphisms in twelve candidate genes are associated with growth, muscle 67 lipid profile and meat quality traits in eleven European cattle breeds*. *Molecular Biology Reports*, 41 (7), 4721-4731. DOI: 10.1007/s11033-014-3343-y.
- Shahroudi, F.E., Nassiry, M.R., Valizadh, R., Moussavi, A. H., Pour, M.T., Ghiasi, H. (2006). *Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep*. *Iranian Journal Biotechnol.*, 4: 117-122.
- Suleman, M., Khan, S. U., Riaz, M. N., Yousaf, M., Shah, A., Ishaq, R., Ghafoor, A. (2012). *Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds*. *African Journal of Biotechnology*, 11(47): 10655-10660. DOI:10.5897/AJB11.2478.
- Sunilkumar, M. C., Nagaraja, M., Jayashankar, N., Fairoze, B., Veeregowda, B. (2014). *Molecular studies on meat quality gene in Bandur sheep*. *Journal of Cell and Tissue Research* 141: 4049.
- Szkudlarek-Kowalczyk, M., Wiśniewsk, E., Mroczkowsk, S. (2011). *Polymorphisms of calpastatin gene in sheep*. *Journal of Central European Agriculture*, 12: 425-432. DOI: 10.5513/JCEA01/12.3.934.
- TAGEM, (2009). *Türkiye evcil hayvan genetik kaynakları kataloğu*. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Ankara. Erişim: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr>, Erişim tarihi: 14.03.2023.
- Tait, R.G., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., King, D.A, Casas, E., Thallman, R.M., Smith, T.P., Benneett, G.L. (2014). *mu-calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies*. *Journal of Animal Science*, 92 (2), 456- 466. DOI: 10.2527/jas.2013-7075.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- TİGEM, (2022). *Hayvancılık sektör raporu*. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Ankara. Erişim: <https://2022%20YILI%20HAYVANCILIK%20SEKTOR%20RAPORU.pdf> , Erişim Tarihi: 28.03.2023.
- Tohidi, R. (2013). *Molecular analysis of ovine calpastatin gene in six iranian sheep breeds using PCR-RFLP*. Journal of Animal Production Advances, 3, 271-7. DOI: 10.5455/japa.20120506125834.
- TUİK, (2022). *Kırmızı et üretim istatistikleri, 2022*. Erişim: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-2022-49696>, Erişim Tarihi: 08.05.2023.
- TUİK, (2023). *Hayvansal üretim istatistikleri, 2023*. Erişim: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2023-49680>, Erişim Tarihi: 19.09.2023.
- Veteriner.CC, (2023). *Romanov koyunu*. Erişim: <https://www.veteriner.cc/koyun/romanov.asp>, Erişim Tarihi: 24.03.2023.
- Vicente, M.C., Fulton, T. (2004). *Molecular marker learning modules-Vol 1*. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. International Plant Genetic Resources Institute Publications. ISBN: 978-92-9043-627-0.
- Wang, G., Mahalingan, R., Knap, H.T. (1998). *(C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, Glycine max (L.) Merr*. Theoretical and Applied Genetics, 96, 1086-1096.
- Wikipedia. (2023). *Dünya nüfusu*. Erişim: https://tr.wikipedia.org/wiki/D%C3%BCnya_n%C3%BCfusu#:~:text=Birle%C5%9Fmi%C5%9F%20Milletler%20taraf%C4%B1ndan%20Kas%C4%B1m%202022,ula%C5%9Fmas%C4%B1%20sadece%20219%20y%C4%B1%20s%C3%BCrd%C3%BC, Erişim Tarihi: 05.02.2023.
- Winter, A., Krämer, W., Werner, F. A. O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G ve Fries, R., (2002). *Association of a lysine-232_alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-coA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content*. PNAS, 99(14): 9300–9305. DOI: 10.1073/pnas.14229379.
- WordPress.com. (2023). *PCR'a giriş*. Erişim: <https://bilimblogum.wordpress.com/2021/04/27/pcra-giris/>, Erişim Tarihi: 05.02.2023.
- Xu, Q. L., Chen, Y. L., Ma, R. X., Xue, P. (2008). *Polymorphism of DGAT1 associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 232–237. DOI 10.1002/jsfa.3431.
- Yang, J. T., Zang, R. X., Liu, W. J., Xu, H. W, Bai, J. L, Lu, J. X., Wu, J. P. (2011). *Polymorphism of a mutation of DGAT1 gene in four chinese indigenous sheep breeds*. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(5): 460-468. DOI: 10.3923/ajava.2011.460.468.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Yılmaz, O., Sezenler, T., Ata, N., Yaman, Y., Cemal, İ., Karaca, O. (2014a). *Polymorphism of the ovine calpastatin gene in some turkish sheep breeds*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38: 354-357. DOI:10.3906/vet-1401-13.
- Yılmaz, O., Cemal, İ., Karaca, O., Ata, N. (2014b). *Association of calpastatin (CAST) gene polymorphism with weaning weight and ultrasonic measurements of loin eye muscle in Kıvrıkcık lambs*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20: 675-680. DOI: 10.9775/kvfd.2014.10816.
- Zeder, M.A. (2008) Domestication and Early Agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, Diffusion, and Impact. PNAS, 105 (33); 11597-11604. DOI: 10.1073/pnas.0801317105.



EK AÇIKLAMALAR



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 09.10. 2020
TOPLANTI SAYISI : 151
DOSYA KAYIT NUMARASI : 809
KARAR NUMARASI : 809
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Yüksek Lisans Öğr. Göknur BAYRAK
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Koyun- (Orta Anadolu Merinosu, Pırlak, Suffolk, Romanov) (200 adet dişi)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni/Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı **Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GEDİK**'in araştırma yürütücüsü olduğu 809/2020 kayıt numaralı ve "Eskişehir İlinde Yetiştirilen Bazı Koyun Irklarının CAST ve DGAT1 Genotiplerinin Belirlenmesi" konulu çalışma; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.