ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE YERLİ SIĞIR IRKLARINDA MİTOKONDRİYAL DNA POLİMORFİK YAPILARININ PCR-RFLP ve DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ ile İNCELENMESİ

Memiş ÖZDEMİR

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2006
Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Ünsal DOĞRU'nun danışmanlığında Memiş ÖZDEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma 17.03.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Zootekni Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. M. İhsan SOYSAL İmza:

Üye : Prof. Dr. Necati YILDIZ İmza:

Üye : Prof. Dr. Naci TÜZEMEN İmza:

Üye : Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ İmza:

Üye :Yrd. Doç. Dr. Ünsal DOĞRU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET……i
ABSTRACT……ii
TEŞEKKÜR……iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ……iv
ŞEKİLLER DİZİNİ……v
ÇİZELGELER DİZİNİ……vi
1. GİRİŞ…… 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ……22
3. MATERYAL ve YÖNTEM……35
3.1.Materyal……35
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar…… 35
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması……36
3.2. Yöntem ……38
3.2.1. Hayvanlardan kan alımı……38
3.2.2. Genomik DNA'nın tüm kandan eldesi……38
3.2.2.1. Elde edilen DNA'nın gözlenmesi……39
3.2.2.2. Elde edilen DNA'ların spektrofotometrik kantitatif tayini…… 40
3.2.3. PCR işlemi…… 40
3.2.3.1. Primer dizaynı……43
3.2.3.2. PCR amplifikasyonu…… 47
3.2.3.3. PCR ürünlerinin gözlenmesi…… 48
3.2.4. Restriksiyon kesim haritasının oluşturulması……48
3.2.5. Restriksiyon enzimleriyle DNA'ların kesimi……49
3.2.6. RFLP için agaroz jel'in hazırlanması …… 49
3.2.7. Örneklerin jel'e yüklenmesi ve yürütme işlemi……49
3.2.8. DNA dizi analizi……50
3.2.9. İstatistiksel analizler…… 51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ……54
4.1. DNA sonuçlarının gözlenmesi…… 54
4.2. Genomik DNA'dan D-loop ve ND5 bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu…. 55
4.3. PCR-RFLP sonuçları……56
4.3.1. Değişken (Displacement =D-loop) bölge RE kesim haritası…… 56
4.3.2. Korunmuş (Constant) ND5 bölge RE kesim haritası……67
4.4. Dizi analiz (mtDNA D-loop baz dizilimi) sonuçları……78
4.4.1. Kontrol bölgesi 910 bç'lik dizi analiz sonuçları…… 79
4.4.2. Kontrol bölgesi 240 bç'lik dizi analiz sonuçları…… 89
5. TARTIŞMA ve SONUÇ……99
KAYNAKLAR……110
ÖZGEÇMİŞ……

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE YERLİ SIĞIR IRKLARINDA MİTOKONDRİYAL DNA POLİMORFİK YAPILARININ PCR-RFLP VE DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMLERİ İLE İNCELENMESİ

Memiş ÖZDEMİR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ünsal DOĞRU

Bu çalışmanın amacı, Türkiye yerli sığır ırklarının mtDNA polimorfik yapılarını PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle inceleyerek ırka özgün polimorfik bölgeleri tespit etmek, genetik varyasyonu belirlemek, yerli ırklarla mevcut diğer ırkları karşılaştırmak ve yerli ırklara ait mtDNA veri tabanı oluşturmaktır. Çalışmada, Bozırk, Doğu Anadolu Kırmızısı, Güney Anadolu Kırmızısı ve Yerli Kara yerli sığır ırkları mtDNA'larının, yüksek değişim hızına sahip tüm D-loop bölgesi ile korunmuş ND5 bölgesinin 1100 bç'lik kısmı PCR-RFLP, yine tüm D-loop bölgesi DNA dizi analizi yöntemiyle incelemeye alınmıştır.

910 bazlık D-loop bölgesinde toplam 17 tanıma bölgesine sahip %8'lik kısmı tarayabilen RE'lerden, *AluI*, *HaeIII*, *HpaII*, *AvaII, DraI, ApaI* enzimleri polimorfik yapı sergilemiş ve populasyon genelinde 19 haplotip tespit edilmiştir. İncelenen ND5 bölgesinde toplam 25 tanıma bölgesine sahip % 10'luk kısmı tarayabilen RE'lerden, *AluI*, *HaeIII, BglII* ve *SspI* enzimleri polimorfik yapı sergilemiş ve populasyon genelinde 6 haplotip elde edilmiştir. D-loop ve ND5 bölgesine uygulanan kümeleme analiz sonuçları benzerlik göstermiştir.

İncelenen tüm D-loop dizilimi üzerinde 26 farklı bölgede toplam 68 nükleotid faklılığı gözlenirken, bu görülen farklılıkların 47'sini transisyon, 5'ini transversiyon ve 16'sını insersiyon oluşturmuş, delesyon'a ise rastlanılmamıştır. Genetik yapı değerleri; haplotip sayısı 17, haplotip çeşitliliği 0,993, nükleotid çeşitliliği 0,00478 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 4,275 olarak elde edilmiştir. Ayrıca NCBI'de mevcut tüm D-loop ile 240 bç kısmi dizilimine sahip ırkların analize dahil edilmesi ile çeşitli ırklara ait filogenetik yapı ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan ırklarda populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğin yüksek olduğu görülmüştür.

2006, 116 sayfa

Anahtar Kelimeler: Yerli Sığır, Gen Kaynakları, Mitokondriyal DNA, Genetik Çeşitlilik, Kümeleme Analizi, PCR-RFLP, DNA Dizi Analizi.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHIC SITES WITH PCR-RFLP AND DNA SEQUENCING METHODS IN TURKISH NATIVE CATTLE BREEDS

Memiş ÖZDEMİR

Ataturk University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Fakulty of Agriculture
Department of Animal Science
Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Ünsal DOĞRU

The aim of this study is to determine the specific polymorphic sites of each cattle breed, genetic variation, compare with present breeds and other cattle breeds and to set a databank a mtDNA of Turkish native cattle breeds using PCR-RFLP and DNA sequence methods. In this study, entire D-loop region with high mutation rate and 1100 bp of constant ND5 region of mtDNA were characterized by PCR-RFLP and the entire D-loop region was analysed by DNA sequence analysis method in Turkish Grey, East Anatolian Red, South Anatolian Red and Anatolian Black native breeds.

In 910 bp of D-loop region, *AluI*, *HaeIII*, *HpaII*, *AvaII, Dra* and *ApaI* enzymes from RE having 17 restriction site corresponding to 8 % of 910 bp region dedected polymorphic sites, and 19 haplotype were found with the polymorphic sites. In ND5 region, *AluI*, *HaeIII, BglII* and *SspI* enzymes from RE having 25 restriction site corresponding to 10 % of 1100 bp region dedected polymorphic sites, and 6 haplotype were found with the polymorphic sites. Results of cluster analysis applied to D-loop and ND5 region were similar to each other.

A total of 68 nucleotide differences were observed in 26 different sites. These differences consisted of 47 transition, 5 transvertion and 16 insertion, but no deletion. The number of haplotype, haplotype diversity, nucleotide diversity and mean number of pairwise differences values were detected to be 17, 0,993, 0,00478 and 4,275, restpectively. In addition, phylogenetic structure related to cattle breeds were demonstrated using breeds having entire D-loop and partial 240 bp sequence and breeds used in present study.

In conclusion a high genetic variation was observed within and among the native cattle breeds.

2006, 116 pages

Keywords: Native Cattle, Animal Resources, mitochondrial DNA, Genetic Diversity, Cluster Analysis, PCR-RFLP, DNA Sequence.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanıp yürütülmesinde ve tezin hazırlanmasında yakın ilgi, teşvik ve desteklerini esirgemeyen danışmanım değerli hocam Sayın Yrd. Doc. Dr. Ünsal DOĞRU'ya, çalışmanın tamamlanmasında büyük yardımlarını gördüğüm Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Necati YILDIZ'a, tezin hazırlanmasında her türlü desteğinini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Naci TÜZEMEN'e ve Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hakkı EMSEN'e ve Zootekni Bölümü'nün diğer değerli elemanlarına en derin duygularla teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü laboratuar destek ve imkanlarını sunan Sayın Prof. Dr. Sezai ERÇİŞLİ'ye ve Sayın Doç. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e,

Çalışma esnasında karşılaştığım sorunların çözümünde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. İbrahim PİRİM'e, Prof. Dr. Sıtkı ÖZTAŞ'a, Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na ve Tıbbi Biyoloji Laboratuarında çalışan elemanlara,

Eserin ortaya çıkmasında büyük katkısı olan Proje destekçisi BAP yönetim kurulu üyelerine ve bana doktora aşamasında burs sağlayan TUBİTAK-BAYG ekibine,

Sığır kan alımında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Armağan HAYIRLI'ya ve Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü ve Ceylanpınar Tarım İşletmesi Müdürleri ve çalışanlarına,

Ayrıca benim bu günlere gelmemde her türlü destek ve teşviklerini esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli aileme,

teşekkürlerimi arz ederim. Saygılarımla.

Memiş ÖZDEMİR

Mart 2006

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
Bç	Baz çifti (Nükleotid)
D	Populasyonlar Arası Eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması (Mean number of pairwise differences)
DAK	Doğu Anadolu Kırmızısı
D-loop	Kontrol Bölgesi (Displacement loop)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GAK	Güneydoğu Anadolu Kırmızısı
Hd	Haplotip çeşitliliği
K	Populasyonlar içi Eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması (Average number of pairwise differences)
LHON	Leber's hereditary optic neuropathy
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitokondriyal DNA
NARP	Neurogenic Weakness Ataxia and Retinitis Pigmentosa
ND5	Nikotinamid adenin Dinükleotidfosfat Kompleks 5
OXPHOS	Oksidatif Fosforilasyon
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEO	Progressive External Ophthalmoplegia
$\hat{\pi}_n$	Nükleotid çeşitliliği
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Hücre, mitokondri ve mitokondriyal DNA……..... 4
Şekil 1.2. Mitokondriyal DNA üzerindeki bölgeler ve sentezlediği genler……..... 5
Şekil 1.3."Heteroplazmi" ve normal ve mutant mitokondrinin gelecek nesile aktarılması……..... 8
Şekil 1.4. DNA dizisi üzerinde oluşan substitisyon, insersiyon ve delesyon nokta mutasyonlarının şematik görünümü……..... 9
Şekil 1.5. Evcilleştirme merkezleri…….....17
Şekil 1.6. Nükleer DNA ve mtDNA verilerine göre sığır grupları……..... 17
Şekil 3.1. Uygun primer çiftinin seçimi…….....45
Şekil 3.2. Blastlama işlemi…….....46
Şekil 4.1. Tüm kandan elde edilen genomik DNA'nın agaroz jel'de görünümü……..... 54
Şekil 4.2. mtDNA D-loop ve ND5 bölgeleri PCR sonuçları……..... 55
Şekil 4.3. D-loop bölgesi PCR ürününün beklenen kesim haritası…….....57
Şekil 4.4. D-loop bölgesi PCR-RFLP sonuçları……..... 60
Şekil 4.5. Çeşitli RE enzimleri ile D-loop bölgesi RFLP sonuçları…….....60
Şekil 4.6. *AluI, HaeIII, TaqI, HindIII, HpaII, DraI, AvaII* ve *ApaI* RE enzimleri D-loop bölgesi RFLP sonuçları……..... 61
Şekil 4.7. PCR-RFLP sonuçlarına ait dendogram……..... 67
Şekil 4.8. ND5 bölgesi PCR ürününün beklenen restriksiyon kesim haritası……..... 69
Şekil 4.9. ND5 bölgesi PCR-RFLP sonuçları…….....71
Şekil 4.10. ND5 bölgesi PCR-RFLP sonuçları……...72
Şekil 4.11. ND5 bölgesi PCR-RFLP sonuçları……...72
Şekil 4.12. ND5 bölgesi PCR-RFLP sonuçları……...73
Şekil 4.13. PCR-RFLP sonuçlarına ait dendogram……..... 78
Şekil 4.14. 910 bç bireysel dizi analizi verilerine ait dendogram.....83
Şekil 4.15. 910 bp dizi analizi sonuçlarına göre sığır ırkları arasındaki filogenetik ilişki.. 88
Şekil 4.16. 240 bç bireysel dizi analizi verilerine ait dendogram.....90
Şekil 4.17. 240 bp dizi analizi sonuçlarına göre sığır ırkları arasındaki filogenetik ilişki…97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. D-loop bölgesine uygulanan enzimler, dizi tanıma bölgeleri ve beklenen parça uzunlukları……..... 56
Çizelge 4.2. D-loop bölgesi PCR-RFLP sonuçları üzerinde restriksiyon enzimlerinin oluşturdukları kesim tipi, tahmini fragment uzunlukları ve ırklara dağılımı……..... 59
Çizelge 4.3. D-loop bölgesinde restriksiyon enzimlerinin oluşturdukları haplotipler ve ırklara göre dağılımı……. 65
Çizelge 4.4. Irklara ait polimorfik bölge sayısı, eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması ve Standart Sapmaları……..... 66
Çizelge 4.5. k, D ve D_A değerleri ve önemlilik durumları……..... 66
Çizelge 4.6. ND5 bölgesinde kullanılan enzimler tanıma bölgeleri ve beklenen parça uzunlukları……..... 68
Çizelge 4.7. Restriksiyon enzimlerinin ND5 bölgesi üzerinde oluşturdukları kesim tipi, tahmini fragment uzunlukları ve ırklara dağılımı……..... 70
Çizelge 4.8. ND5 bölgesinde restriksiyon enzimlerinin oluşturdukları haplotipler ve ırklara göre dağılımı……..... 76
Çizelge 4.9. Irklara ait polimorfik bölge sayısı, eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması ve Standart Sapmaları……..... 77
Çizelge 4.10. k, D ve D_A değerleri ve önemlilik durumları……..... 77
Çizelge 4.11. D-loop bölgesinde tespit edilen 18 yerli sığıra ait dizi varyasyonu..... 80
Çizelge 4.12. Gözlenen mutasyonlar, bölge sayıları ve ırklara dağılımı……..... 81
Çizelge 4.13. 910 bp dizi analizi sonuçlarına ait ırk içi parametreler…… 82
Çizelge 4.14. 910 bç k, D ve D_A değerleri ve önemlilik durumları ……..... 84
Çizelge 4.15. 910 bp dizi analizi sonuçlarına ait genetik mesafeler ve standart hataları..... 86
Çizelge 4.16. 240 bp dizi analizi sonuçlarına ait ırk içi parametreler…….. 89
Çizelge 4.17. 240 bç k, D ve D_A değerleri ve önemlilik durumları ……..... 92
Çizelge 4.18. 240 bp dizi analizi sonuçlarına ait genetik mesafeler ve standart hataları…...95

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusuna bağlı olarak nicelik ve nitelik bakımından besin maddelerine olan talebin giderek artması, yeterli ve dengeli beslenmenin sağlanmasında çiftlik hayvanlarının önemini daha da artırmakta ve birden fazla verim yönünde geliştirilmelerini zorunlu kılmaktadır. Hayvan ırklarında, ekonomik önemi olan karakterler üzerinde yapılan seleksiyon ile ırkın sahip olduğu genetik varyasyon daralmakta, bu da gen kaynaklarının hızla kaybolması gibi bir tehlikeyi beraberinde getirmektedir. Ayrıca, yerli ırkların yetiştirildiği bölgelerde üretimi artırmak amacıyla genetik olarak üstün hayvan ırklarının devreye sokulması ve/veya sun'i tohumlama yoluna gidilmesi, potansiyel önemi olan yerli gen kaynaklarının kaybolma riskini her geçen gün daha da artırmaktadır.

Evcil hayvanların korunmasında ilk adım yerli ırkların genetik yapılarının ortaya konulması olarak kabul edilebilir. Irklar özgün bir allelik kombinasyona sahip olabilir, bunun bozulması ve sonradan tekrar oluşturulma ihtiyacının duyulmasına karşın, hangi ırkın korunması gerektiğinin belirlenmesi son derece önemlidir.

Koruma altına alınacak gen kaynaklarının tamamının süresiz olarak elde tutulmasındaki imkansızlıklar ve ekonomik güçlükler, korunmasına öncelik verilecek ırkların genetik yapılarının ve bu ırklar arasındaki genetik ilişkilerin incelenmesini gerektirmektedir. Irkın tanımlanmasında kullanılan morfolojik özellikler, kan grupları ve biyokimyasal polimorfizm gibi kıstaslar yanında, genomu doğrudan inceleyen yöntemlerle, birbirine yakın ırkların yanı sıra, aynı ırka ait ailelerin ya da bireylerin tanımlanmasındaki başarı şansı artmaktadır.

Tüm dünyada moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar baş döndürücü bir hızla devam etmektedir. Bundan yararlanılarak populasyondaki genetik varyasyon, bireylerin Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'larından hareketle moleküler düzeyde ortaya konabilmektedir. Tek yumurta ikizleri dışında eşeyli çoğalan canlılarda her birey,

moleküler yöntemlerle ortaya konabilen özgün bir genotipik kompozisyona sahiptir. Bu yöntemler, her birey için parmak izine benzetilebilecek farklı bir genetik profil ortaya koymaya imkan sağlamaktadır. Herhangi bir bireye ait DNA örneği ister kandan, ister kıldan ya da kemikten izole edilsin tüm dokularda aynıdır, bu da DNA'ya dayalı analizlerin temel ilkesini oluşturmaktadır.

Bireyler arasındaki farklılık genetik markerlar kullanılarak daha kolay yapılabilmektedir. Genetik marker olarak protein veya DNA (nükleer ve mitochondriyal DNA) kullanılabilmektedir. Protein markerlarının sayılarının az ve analizlerde çabuk bozulma, özel alet ekipman gerektirmesi, çalışma süresinin uzun olması gibi zorluklar taşıması sebebiyle DNA markerlarının büyük avantaja sahip olduğu bildirilmektedir (Berkman 2001). Ayrıca genetik varyasyonun, nükleotid bazındaki değişimi belirleyebilecek kapasitedeki hassas yöntemlerle ölçülebilmesi, araştırıcıları DNA markerları ile çalışmaya iten en önemli nedendir.

Moleküler tekniklerin gelişmesi son yıllarda farklı alanlarda çalışan araştırıcılara geniş bir imkan sunmaktadır. Araştırıcılar temel prensipleri ortak olan çok sayıda yöntemi çalıştıkları materyale göre modifiye etmektedirler. DNA düzeyinde polimorfizm belirleme yönteminde aranacak özellikler arasında; genetik polimorfizmi belirleme derecesi, bantların netliği, sonuçların tekrarlanabilirliği, analitik ve istatistik olarak değerlendirilmesi, ekonomik olması ve kolay uygulanabilmesi sıralanabilir (Akın 2002)

İnsanların genel gereksinimlerinin karşılanması amacıyla dünyada 40 hayvan türünün yetiştiriciliği yapılmakta ve bu türler içerisindeki 4500 ırk gen kaynağı olarak kabul edilmektedir. Belirtilen ırkların %30'dan fazlası yetersiz yararlanma nedeniyle yok olma riski taşımakta, bu durumun dünya tarımını yakın gelecekte olumsuz yönde etkileyeceği tahmin edilmektedir. Geçtiğimiz yarım yüzyıl içerisinde Türkiye'de çiftlik hayvanları gen kaynakları bakımından kayıplar olduğu bilinmektedir. Bu süreç günümüzde de artan bir ivme ile devam etmekte, farklı türlerden çeşitli genotiplerde hızlı bir azalma yaşanmaktadır. Oysa yerli ırklar yüzyıllardır yetiştirilegeldikleri çevrenin kendine özgü koşullarına çok iyi uyum sağlamış, verimleri düşük olsa bile

özgün nitelikleri olan, dayanıklı, kanaatkar, yetersiz çevre koşullarında üreyebilen hayvanlardan oluşur. Yerli ırkların yok olması, taşıdıkları bu ayırıcı özelliklerin de yok olması anlamına gelmektedir. Gelecekte bu özelliklerin hangisine gereksinim duyulacağı şimdiden tahmin etmek güç veya olanaksızdır. Kaldı ki bu gen kaynaklarının bugün saptanmamış olan olası özellikleri de ancak bunların varlıklarını sürdürebilmesi halinde elde tutulabilir (Ertuğrul vd 2000).

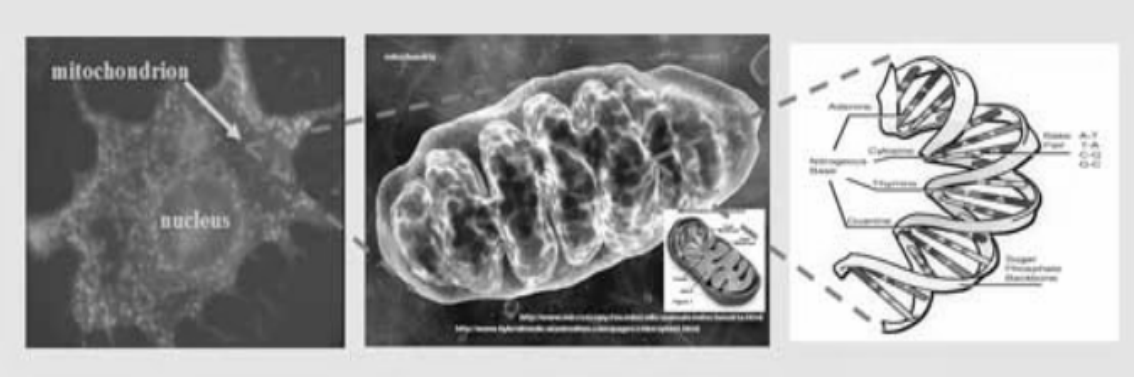
Ekonomik olarak en önemli evcil hayvanlardan birini oluşturan sığırlar birkaç farklı tipte gösterilmekte ve hemen hemen her ülkede yetiştirilmektedir. Bu hayvanlar, orijinleri, genetik çeşitliliği, kârlı ve sürekli olan yararlılıkları ile uzun zamandan beri yakın ilgi görmektedir. Mevcut araştırmalar 787 sığır ırkından, 135'i yok olma sınırında olmak üzere sayısal mevcudu bilinen 582 ve sayısal tespiti yapılamayan 205 sığır ırkı bulunduğunu bildirmektedir (Anonymous 1995). Sığırlardaki bu yüksek çeşitlilik bireyleri herhangi bir ırka veya özel gruba dahil etmede güçlükler oluşturmaktadır. Oldukça büyük ekonomik ve kültürel önemlerinden dolayı, sığırları ırk gruplarıyla değerlendirmek için sınıflandırılmasına büyük çaba sarf edilmektedir. Ancak bu sığır populasyonlarının orijinleri hakkında mevcut yerel kaynaklardan elde edilen morfolojik farklılıklara göre tanımlanan ve subjektif verilere dayalı bilgiler yeterli olamamaktadır. Bu nedenle sığır genetik kaynaklarının tam manasıyla daha etkin kullanımı için ırk sınıflandırmalarının daha objektif bir sisteme dayandırılması gerekmektedir.

Yapılan mevcut çalışmalar yaşayan sığır ırklarının çoğunun 8-10 bin yıl önce yaşayan ve günümüzde nesli tükenmiş olan *Bos primegenus*'dan türemiş *Bos taurus indicus* ve *Bos taurus taurus* olarak iki büyük tip veya alt tür içerisinde sınıflandırılabileceğini göstermektedir (Epstein 1971; Epstein and Mason 1984). Bununla beraber bağımsız iki evcilin varsayımı mitokondrial Deoksiribo Nükleik Asit (mtDNA) ve mikrosatellit baz dizisi bilgileriyle de desteklenmektedir (Loftus *et al.* 1994a,1994b; MacHugh et al. 1997; Loftus *et al.*1999; Troy *et al.* 2001; Bruford *et al.* 2003).

Mitokondri genel olarak tüm ökaryotlarda bulunan ve hücresel reaksiyonlar için gerekli enerjinin temin edildiği hücrenin en önemli organellerindendir. Kendine özgün DNA

molekülüne sahip mitokondrinin her bir hücredeki sayıları 500-1000 arasında değişirken hatta bu sayının yumurta hücrelerinde embiryogenesis öncesinde replikasyon olmaması ve daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulması nedenleriyle 10000'lere ulaştığı bildirilmektedir (Cummins 1998; Rokas *et al.* 2003).

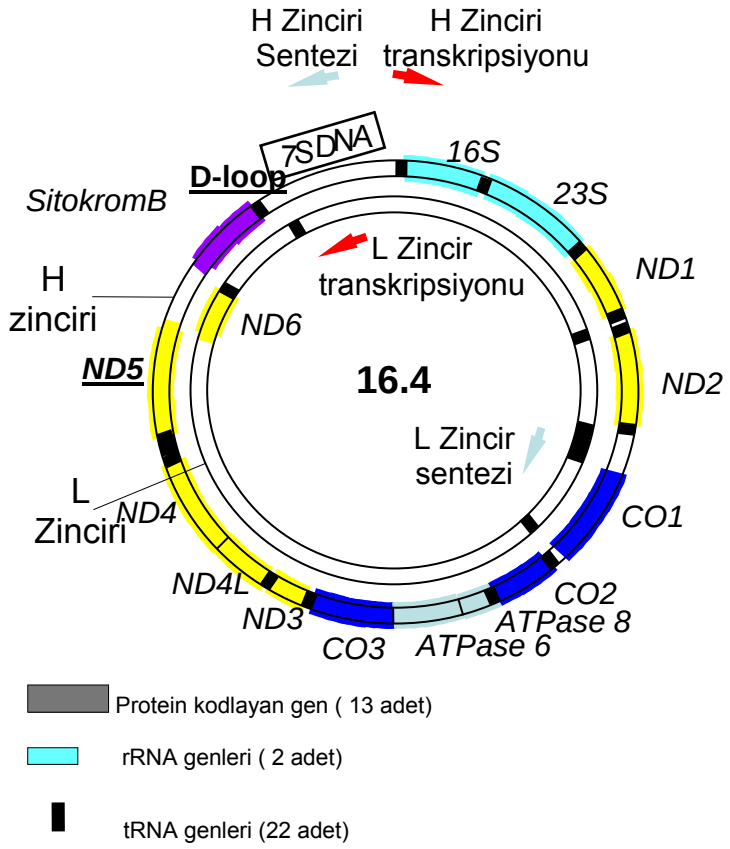
Solak vd (2000)'nin bildirdiğine göre Mitokondri 1850'de Kolliker tarafından ilk defa görülmüş olmasına rağmen, sistematik olarak 1894'de Altman tarafından tanımlanmıştır. Işık mikroskobunda hücre içinde granüler ve ipliksi yapılar şeklinde görülen bu organele 1897'de Benda, "ipliksi granül" anlamına gelen "mitokondrion" adını vermiştir. Mitokondrinin oksidatif fosforilasyonun merkezi olduğu 1948'de Eugene Kennedy ve Albert Lehinger tarafından ortaya konmuştur. Nass ve arkadaşları ise 1963'de mitokondri içerisinde iplikçikler şeklinde DNA molekülleri olduğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Hücre, Mitokondri ve Mitokondriyal DNA (Graphics Kine, KSU Ohıo Jakubowski, CSB Minnesota, Wang, UBC Canada**)**

İlk defa Anderson *et al.* (1982)'ın sığırlara ait mitokondriyal DNA'nın baz dizilimini ortaya koymalarıyla, hayvancılık alanında tanımlanmaya ihtiyaç duyulan ve bu suretle bir çok ülkede yetiştirilen çoğu ırkın mitokondriyal DNA yapıları detaylı bir şekilde tanımlanmış olmasına rağmen, Türkiye'de bu alanda yapılmış çalışma henüz bulunmamaktadır.

ADP (Adenozindifosfat)'den ATP (Adenozintrifosfat) üretmek için gerekli olan 13 elektron taşıma zinciri proteini, 2 adet rRNA (Ribozomal Ribo Nükleik Asit) ve 22 adet tRNA (Transfer Ribo Nükleik Asit) geni dahil toplam 37 geni kodlayarak kalıtlanan sığır mtDNA'sı, 16338 baz çifti (bç)'nden oluşan dairesel bir yapı sergilemektedir (Anderson *et al.* 1982). Mitokondriyal DNA üzerinde yer alan kontrol bölgesi (D-loop) ve sentezlenen gen (korunmuş/constant) bölgeleri Şekil 1.2'de görülmektedir.



Şekil 1.2. Mitokondriyal DNA üzerindeki bölgeler ve Sentezlediği Genler.

Sitoplazmik kalıtımın potansiyel kaynağını oluşturan mitokondri tamamıyla maternal olarak kalıtlanan kendi DNA'larına sahiptirler. Bunun yanı sıra; mtDNA'nın mutasyon hızının nükleer DNA ile karşılaştırıldığında çok yüksek olması, klonal kalıtım özelliği taşıması ve rekombinasyon özelliği göstermemesi gibi özellikleriyle alternatif marker

olarak çalışmalarda başarılı bir şekilde yer tutmaktadır (Carracedo *et al.* 2000; Rokas *et al.* 2003). Mitokondri üre siklusu, glukoneogenez, β-oksidasyon, krebs siklusu, ve en önemlisi de oksidatif fosforilasyonda görevli yüzlerce proteini barındırıp hücrenin enerji santrali görevini üstlenerek toplam enerjinin %90'dan fazlasını üretmektedir. Mitokondriler ayrıca laktasyonun kısmi bir evresini oluşturan birkaç metabolik reaksiyonun da gerçekleştiği bölgeleri olduğu bildirilmiştir (Freeman 1995; Boettcher *et al.* 1996).

Sperm mitokondrileri fertilizasyon esnasında yumurtaya girebilmekte ancak fertilizasyondan sonra embriyogenesisin iki veya dört hücre aşamasında iken kaybolduğu bildirilmektedir (Manfredi *et al.* 1997). Bunun yanı sıra paternal mtDNA'ya in vitro fertilizasyonda da rastlanılamamıştır (Kaneda *et al*. 1995; Cummins, 1998; Danan *et al.* 1999).

mtDNA'nın; etkili bir tamir mekanizmasından yoksun olması (Bogenhagen 1999), histon gibi koruyucu proteinlerin görülmemesi, iç mitokondriyal membranda meydana gelen oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile açığa çıkan oldukça yüksek mutajenik etkiye sahip oksijen radikalleriyle mtDNA'nın fiziksel ilişki içerisinde bulunması (Richter 1988), ayrıca mevcut mutant mitokondrinin etkisi ile mtDNA'nın mutasyon hızının artması (Lightowlers *et al.* 1997) gibi sayılan özellikler, mtDNA'da meydana gelen polimorfizmin nükleer DNA'dan daha yüksek oranda görülmesinin muhtemel sebeplerini oluşturmaktadır. Bunlara ilave olarak, dişi üreme hücrelerinde bölünme sayısının düşük olması ve olgun yumurta hücresinde mtDNA kopya sayısının yüksek olması durumlarına rağmen, mtDNA dizisinde generasyonlar arasında yüksek farklılıklar görülebilmektedir (Poulton *et al.* 1998). Bu sayılan özelliklerin genetik homozigotlaşmayı önlemede ve herhangi bir türün yok olma sınırı olarak kabul edilen darboğaz durumlarının dezavantajlarını gidermede büyük katkılar sağlayabileceği açıktır.

Her bir hücre yüzlerce mitokondriye ve her bir mitokondri de 2-10 adet kopya mtDNA molekülüne sahiptir. Hücre bölünmesinde mitokondriler ve genomları yavru hücrelere

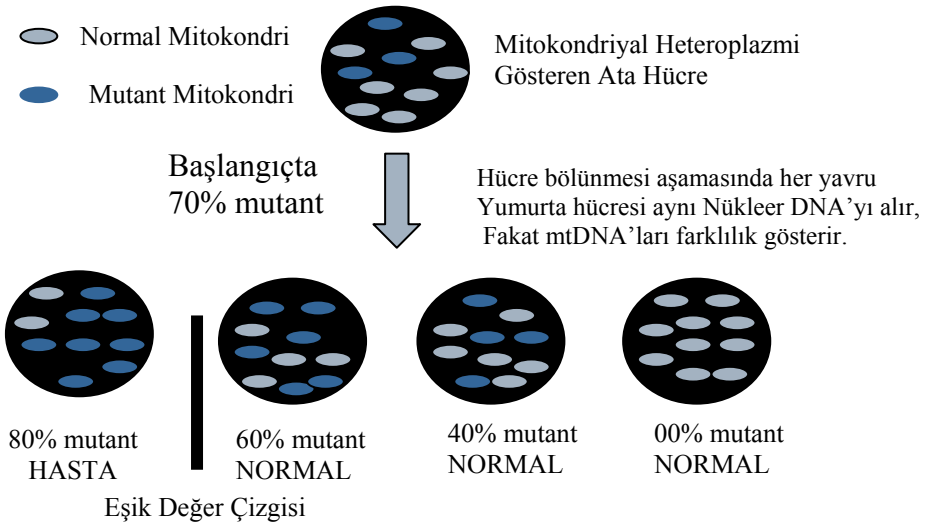
replikatif segregasyon ile rastgele dağılmaktadır. Bir hücredeki tüm mtDNA'ların aynı olması hali homoplazmi, mutant ve normal mtDNA'ların bir arada bulunması hali ise heteroplazmi olarak adlandırılmaktadır.

Mutant mtDNA'nın oranı doku içerisinde belli bir seviyenin (eşik değer/threshold effect) üzerine çıkıncaya kadar fenotip normaldir. Bu eşik değer mutasyondan mutasyona farklılık göstermekle birlikte bir kez aşıldığında, mutasyondaki küçük artış oranlarına karşılık fenotipte giderek artan seviyede daha büyük değişiklikler oluşturabilmektedir (Saara 1999). Üstelik her doku normal fonksiyonları için OXPHOS'a aynı derecede bağımlılık göstermemektedirler. Çok yüksek enerji gereksinimi olan ve çok düşük yenilenebilme kapasitesine sahip beyin, kalp ve iskelet kası gibi organların patojenik mtDNA mutasyonlarına çok daha duyarlı oldukları bildirilmektedir (Wallace 1994,1995).

Oksidatif fosforilasyon, oksidatif yıkım ürünlerinden alınan elektronların moleküler oksijene aktarılırken açığa çıkan enerji ile ADP'den ATP sentezlenmesi olayıdır. Oksidatif fosforilasyonda elektronların moleküler oksijene aktarımını sağlayan enzim kompleksleri ve ATP'nin sentezini sağlayan enzim kompleksi mitokondrinin iç membranında yer almaktadır. Bunlar Kompleks I: NADH dehidrogenaz, Kompleks II: süksinat dehidrogenaz, Kompleks III: ubiquinol: sitokrom-C oksidoredüktaz, Kompleks IV: sitokrom-C oksidaz, Kompleks V: ATP sentetazdır. Glikoliz, sitrik asit siklusu ve yağ asitlerinin oksidasyonuyla elde edilen elektronları taşıyan NADH ve $FADH_2$ molekülleridir. Oksidatif fosforilasyon ile NADH ve $FADH_2$'deki elektron oksijene transfer edilirken ATP açığa çıkmaktadır. Aerobik organizmalarda en önemli oksijen kaynağı budur. Oksidatif fosforilasyon mitokondrinin iç membranında gerçekleşir. Sitrik asit siklusu ve yağ asitlerinin oksidasyonu yine iç membranda ve matrikse yakın bir yerde olmaktadır. NADH'ın oksidasyonu ile 3 ATP ve $FADH_2$'nin oksidasyonu ile 2 ATP enerji kazanılmaktadır. Sitokrom gibi elektron taşıyıcıları, NADH ve $FADH_2$'den, O_2'ye elektron taşımaktadır. Ayrıca, elektron transfer kompleksleri mitokondriyal matriksin dışına proton pompalamaktadır. Bu protonlar mitokondriyal matrikse geri pompalandığında ATP sentezlenmektedir. Mitokondride ATP sentezi, 1961'de Mitchell

tarafından ileri sürülen kemiozmotik teori ile ortaya konmuştur. Buna göre elektronlar, Kompleks I, II, III, IV yardımıyla moleküler oksijene taşınırken açığa çıkan yüksek enerji ile üç kompleksden (I, III, IV) protonlar membranlar arası bölgeye pompalanır. İki bölge arasında elekrokimyasal bir proton gradienti oluşur. Bu gradient farkı ile protonlar pasif olarak matrikse geri döner ve ATP sentetaz (Kompleks V; ND5) enzimine bağlanır. Bu sayede ADP'den ATP sentezi gerçekleşmektedir (Solak vd 2000).

Nükleer DNA'dan bağımsız olarak replikasyon yapan mtDNA, bu otonom özelliği nedeniyle hücre bölünmesi sırasında heteroplazmik bir segregasyon gösterebilir. Ayrıca mtDNA'da oluşabilecek mutasyonlar sonucu hücre içinde mutant ve normal mtDNA'lar yavru hücrelere rastgele dağılabilmektedir (Şekil 1.3). Bir seri mitotik ve mayotik bölünme sonucunda mtDNA'nın segregasyonunun rastgele olması nedeniyle tamamen normal veya tamamen mutant mtDNA'ya sahip hücreler de oluşabilir. Bu durum da homoplazmi olarak adlandırılacaktır (Solak vd 2000).



Şekil 1.3. "Heteroplazmi" ve Normal ve Mutant Mitokondrinin Gelecek Nesile Aktarılması.

Nükleer DNA'da mutasyonun mtDNA'ya göre daha yavaş seyretmesine karşılık, genlerin her iki ebeveynden rastgele kalıtlanması ve de crossing-over ile meydana gelecek yeni rekombinant bireylerin belirtilen hangi mekanizma ile ortaya çıktığı gerçeğini açıklamada yetersiz kalmaktadır. Buna karşılık mtDNA; mutasyon hızının yüksek olması nedeniyle aynı generasyon içerisindeki mutasyonları dahi gösterebilmesi, maternal olarak kalıtlanması, rekombinasyon göstermemesi, bir hücre içerisinde çok fazla sayıda kopyasının bulunması ve haploid özellik göstermesi gibi avantajlarıyla bireyin filogenisindeki nasıl, nerede ve ne zaman gibi sorularına daha net cevap sunabilmektedir (Cann *et al.* 1987).

DNA dizisi üzerinde görülen nokta mutasyonları; substitisyon, insersiyon ya da delesyon şeklinde meydana gelmekte olup bu Şekil 1.4'de şematize edilmiştir.

Anne	Yavrular	Align Dizilimi
ACGACTTTACCGAT→	AACGACTTTACCGAT→	AACGACTTTACCGAT
	ACGACTGTACGAT →	A–CGACTGTAC–GAT
	İnsersiyon Mutasyonu	→↑ ↑ ↑
	Substitisyon Mutasyonu	→→→→→↑ ↑
	Delesyon Mutasyonu	→→ → → →→→↑

Şekil 1.4. DNA Dizisi Üzerinde Oluşan Substition, İnsersiyon ve Delesyon Nokta Mutasyonlarının Şematik Görünümü

mtDNA mutasyonunun bulunduğu dokuya etkisi, ilgili dokudaki hücrelerin mitokondriden gelecek enerji ihtiyacına bağlı olarak değişmektedir. Her bir hücre veya doku normal fonksiyonunu sürdürmek için minimal seviyede ATP üretimine ihtiyaç duyarken, mtDNA mutasyonları ATP üretiminde bir azalmaya sebep olduğunda, ATP seviyesi dokunun ekspresyon eşiği altına düşeceğinden hücresel dejenerasyon ve ölüm meydana gelecektir. Bu durumdan en yüksek seviyede ATP'ye ihtiyaç duyan merkezi sinir sistemi gibi organ sistemleri en fazla etkilenecektir. Ayrıca somatik hücre mtDNA mutasyonlarının birikmesine paralel olarak tüm sistem için oksidatif fosforilasyondan gelecek gerekli enerji ihtiyaçı karşılanamayacağından beraberinde yaşlanmayı hızlandıracaktır. Nitekim günümüzde insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda mtDNA ile ilişkili tanımlanmış; PEO (Progressif Eksternal Oftalmopleji), Alzhemier, Parkinson,

LHON (Leber's Herediter Optik Nöropati), NARP (Nöropati Ataksi Retinitis Pigmentoza), Wolfram sendromu, Leigh hastalığı (Subakut nekrotize ansefalomiyelit), Diabetes mellitus, katarakt ve işitme kaybı gibi hastalık sayısının arttığı bildirilmektedir (Öztaş ve Yakan 2000).

Son yıllarda taksonomistler DNA hibridizasyonu, PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), Alloziym, SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), Y-kromozomu, Mikrosatellit, SSR (Simple Sequence Repeat) veya STR (Single Tandem Repats), VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) gibi tekniklere dayalı moleküler bilgileri kullanarak filogenetik ilişkileri ortaya koyan moleküler biyoloji araçları, moleküler sistematiğin hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamışlardır. İlgili araştırıcılar filogenetik problemleri çözmede baz dizilim temelli moleküler markerlardan ziyade, ekonomik ve hızlı yöntemler oldukları için alloziym bilgilerini veya RFLP ve RAPD'i kullanmayı tercih etmektedirler. Buna karşılık DNA baz dizi bilgilerinin elde edilmesi daha zor olup, zaman ve yüksek maliyet gerektirmektedir. Bununla birlikte taksonomistler için genlerin genetik varyasyonunu doğru tahmin etmenin en iyi yolu DNA baz dizi analizi olarak görülmektedir (Hwank and Kim 1999).

Populasyon biyolojisi alanında yayımlanan bilimsel makalelerde kullanılan çeşitli moleküler tekniklerin kullanılma oranlarının %44 RFLP, %18 DNA baz dizi analizi, %14 RAPD, %10 Parmak izi, %8 Mikrosatellit, %5 VNTR, %1 DNA denatürasyon teknikleri (SSCP, DGGE (Denaturant Gradient Gel Elektrophoresis), Heteroduplex Analizi) olduğu bildirilmektedir. Bunlara ilave olarak yeni gelişen AFLP ve SSO (Sequence Specific Oligonucleotides) tekniklerinde de kullanıldığı bildirilmektedir (Silva and Russo 2000).

mtDNA mutasyonları hakkında detaylı bilgi ancak RFLP ya da DNA baz dizi analizi yöntemleri ile sağlanabilmekte ve bu da mtDNA'nın sahip olduğu özelliklerinden faydalanılan filogenetik analiz yapabilme imkanını sunmaktadır.

Yerli hayvanlara ait genetik yapı çalışmalarında RFLP'nin mtDNA'da kullanımı iki avantaja sahiptir. Birincisi, hayvan mtDNA'sının gen organizasyonunun basit, korunmuş bölgeye sahip olması ve rekombinasyon yapmadığından evcil hayvanların orijini mtDNA'ya dayalı analizler yoluyla tespit edilebilmesidir. İkincisi ise, bir dişide form alan mtDNA tipinin dişinin tüm yavrularına taşınması ve mtDNA'nın maternal olarak monoklonal yapı sergilemesidir (Lan and Shi 1993).

Solak vd (2000)'e göre, Rekombinant DNA teknolojisine ilişkin deneysel çalışmalar 1944 yılında genetik bilginin nükleik asitlerde depolandığının bulunması ile başlamıştır. Ancak gerçek hikayesi Smith'in 1970'de mikroorganizmalarda bulunan ve DNA'yı spesifik dizi bölgelerinden kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerini bulmasıyla başlamıştır. Kan ve Dozy (1978) tarafından yapılan çalışmada, moleküler yapısı bilinmeyen kalıtsal hastalıklarda RFLP markerları kullanarak bazı hastalıkların tespitinin yapılabileceği ortaya konulmuştur. Rekombinant DNA teknolojisindeki en büyük buluş ise, 1985'de bir veya daha fazla hücreden elde edilen DNA materyalinin birkaç saat içinde çoğaltılarak genetik tanının konması, gen terapi ve genom projesi gibi uygulamalar ile halihazırda mevcut gündemi oluşturan ve moleküler genetiğin temelini teşkil eden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yönteminin uygulamaya konulması olmuştur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlar altında oligonükleotid primer ve Taq polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termocycle sistem (PCR aleti) yardımıyla çoğaltılma (sentezleme=amplifiye etme) metodudur. PCR ilk defa 1985 yılında Saiki ve çalışma arkadaşları tarafından Orak Hücre Anemi'si hastalığının teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmış bir tekniktir. 1988 yılında *Thermus aquaticus* bakterisinden aşırı sıcaklıklara dayanıklı Taq DNA Polimeraz enziminin izole edilmesi ve bu enzimin DNA amplifikasyonu için kullanıma sunulması, PCR'ın uygulama alan ve amaçlarını genişletmiştir. Daha sonraki yıllarda çeşitli amaçlarla kullanılan bu metod sayesinde Tıp, Ziraat, Biyoloji ve Genetik ile ilgili bilim alanlarında çok sayıda yeni buluşlar ve gelişmeler olmuştur. Son yıllarda PCR tekniğinin pratikte en fazla kullanıldığı alanlar

bitki, hayvan ve insan hastalıklarının teşhisi, patojenlerin tanısı, küçük miktarlardaki örneklerle konukçu genetik materyalinin saptanması, farklı kaynaklardan elde edilen DNA'lar arasındaki genetik akrabalığın saptanması, genetik klonlama ve baz dizilişinin tespiti olarak sıralanabilmektedir (Şahin vd 2000).

Rekombinant DNA teknolojisinde restriksiyon endonükleazlar adı verilen enzimlerin bulunması önemli gelişme olarak yer almaktadır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE) bakterilerde doğal olarak çok miktarda bulunan enzim türleridir. Bu enzimler DNA molekülünü iç kısımlardan kestikleri için "endonükleaz", aktiviteleri yabancı DNA'da sınırlı kaldığı için "restriksiyon" tanımını almışlardır (Solak vd 2000).

Bakterilerin DNA'yı kesen enzimler oluşturmak istemesinin altında yatan mantığın nedeni muhtemelen RE'lerin bakteriyofajlara (virüslere) karşı bakteriyel savunma sistemi olarak geliştirilmiş olmasıdır. Bu enzimler tarafından savunulan bir bakteriye giren viral DNA küçük, fonksiyon göstermeyen parçalara kesilerek virüs etkisiz hale getirilmektedir. Burada bakteri kendi DNA'sının RE tanıma bölgelerini ve kesilmesini, DNA'sı tarafından sentezlenen diğer enzimleri kullanarak metilaz aktivitesiyle korumaktadır. Gerçekte RE'ler virüslere karşı dirençli bakterilerin incelenmesi sonucunda keşfedilmiştir. Bu RE'lerin geliştirilmesiyle DNA üzerinde maniplasyon yapabilmeyi doğurmuş böylece moleküler biyolojinin gelişmesi sağlanmıştır. Daha önceleri yapılan çalışmalarda herhangi bir dokudan elde edilen genomik DNA mekanik olarak fragmentlere ayrılabilirse de oluşan fragmentler farklı büyüklükte olmakta ve işlem rastgele olduğundan elde edilen DNA dizisinin istenilen fragment olup olmadığı şüpheli kalmakta bu da uygulamanın çok yararlı olmasını engellemekteydi (Solak vd, 2000).

RE'ler DNA'nın 4-8 baz çiftlik bölgesini tanıyan spesifik enzimlerdir ve nükleotidler arasındaki fosfodiester bağlarını keserek işlem görmektedirler. RE'ler bir grup olarak tanıma dizisi içinde herhangi bir yeri kesebilir, fakat bir enzim sadece belli iki nükleotid arasında kesim yapabilmektedir. Bazı enzimler "yapışkan uç" üretirken bazıları "kör uç" üretmektedirler. Çoğu RE tanıma bölgesi 5′→3′ e doğru üst zincir ve 5′→3′ e doğru

alt zincirin baz dizisi sırası aynı olduğu palindromik özelliğe sahiptirler (Solak vd 2000).

RE'ler Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç grupta toplanmaktadırlar. Tip I RE'ler DNA'yı tanıdığı bölgeden 1000 baz çiftlik uzaklıkta özgül olmayan yerlerden asimetrik olarak kesmektedirler. Tip III RE'ler ise DNA'yı tanıma bölgesinden 24-26 baz çiftlik uzaklıktan keserek 5-7 baz çiftlik asimetrik fragmentler oluşturmaktadırlar. Tip I ve Tip III RE'ler kesim sırasında ATP'ye ihtiyaç duyarken Tip II RE'ler kesim sırasında enerjiye ihtiyaç duymazlar ve DNA'yı tanıma bölgesinden keserek 4-8 baz çiftlik kör uç veya yapışkan uç şeklinde palindromik fragmentler oluşturmaktadırlar. Tip II RE'ler bu sahip oldukları özelliklerinden dolayı rekombinant DNA teknolojisine ilişkin uygulamalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Solak vd 2000).

RE'leri izole edildikleri bakterilere göre adlandırılıp, üç harfden oluşan bir kısaltma ile gösterilmektedirler. Bu üç harf enzimin izole edildiği bakterinin cins ve türünü göstermekle beraber bir bakteriden birden fazla enzim izole edilmişse I, II ve III gibi Romen rakamları kısaltmanın sonuna eklenerek isimlendirilmektedir (Solak vd 2000).

DNA molekülü üzerinde her RE'nin tanıdığı spesifik diziler bulunabilmektedir. Bazı enzimler farklı bakterilerden elde edildikleri halde aynı bölgeyi keserken, bazı enzimler de aynı diziyi tanıdıkları halde farklı yerlerden kesim yapabilmektedirler (Solak vd 2000).

Uygun bir materyalden elde edilen saf DNA molekülü veya spesifik PCR ürünü uygun RE'ler ile kesildiğinde bir çok DNA fragmenti elde edilebilmektedir. Ortaya çıkan bu DNA fragmentleri agaroz-jel elektroforeziyle boylarına göre birbirinden ayırt edilebilmekte ve jeldeki DNA fragmentleri etidyum bromid varlığında ultraviyole ışık altında bantlar halinde kolaylıkla görülebilmektedir. Eğer söz konusu DNA'nın tüm nükleotid dizisi biliniyorsa bu bilgi bilgisayar vasıtasıyla birkaç saniye içinde o DNA üzerindeki bütün RE kesim noktaları koordinatları ile beraber yazılı olarak geri

alınabilmektedir. Bu bilgi söz konusu DNA üzerinde çok değişik çalışmalara ve maniplasyonlara imkan vermektedir (Solak vd 2000).

RFLP diye tanımlanan teknikle, DNA molekülünün geniş analizi bir çok farklı tanıma bölgesine sahip enzim kullanma şansını mümkün kıldığı için ilgili moleküldeki dizi farklılıkları tespit edilebilmektedir. DNA molekülü üzerinde kalıtımdan veya yeni bir mutasyondan kaynaklanan DNA dizi değişiklikleriyle restriksiyon enzimlerinin mevcut spesifik kesim bölgesinin kaybolmasına veya yeni kesim bölgelerinin ortaya çıkmasına sebep olarak sonuçta kesilen parça büyüklükleri değişeçektir.

RFLP, çeşitli Restriksiyon Endonükleazlar ile DNA'da meydana getirilen fragmentlerinin büyüklüğü ve sayısını karşılaştırmak esasına dayanır. Görülen fragment sayı farklılıkları mutasyon olarak tanımlanır ki, ilgili moleküldeki restriksiyon kesim bölgelerinin varlığı veya yokluğu ile açıklanmaktadır. Bu teknik, nükleer ya da mtDNA'da geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Genetik mesafe, populasyondaki varyasyon, gen akışı, etkili populasyon büyüklüğü, bireyin biografisi, ortak ebeveyn veya prenatal tanı, gen klonlanması, doku tiplemesi, enfeksiyon ajanlarının tespiti gibi çalışmalarda uygulama alanlarına sahip görülmektedir. (Meghen *et al.* 2002; Anonim 2005).

mtDNA'da meydana gelen mutasyon hızı nükleer DNA'dan yaklaşık 5-10 kat daha fazla olması (Uphold and David 1977; Hecht 1990) ve maternal olarak kalıtlanması nedeniyle mtDNA'ya uygulanan RFLP'i hem türler ve populasyonlar arasında hem de içerisindeki ayrıntılı ilişkileri ortaya koymada yararlı bir metod olarak bildirilmektedir. RFLP yönteminin mtDNA'daki bir başka avantajı farklı sığır ırklarının birbirleri ile ne derecede akraba olduklarının tespitine olanak sağlamasıdır. Bu da ırklardaki genetik varyasyonun araştırılması, filogenetik ilişkinin tespiti, ve başarılı yetiştirme stratejilerinin geliştirilmesinde yetiştiricilere yardımcı olabilecektir (Nei 1987; Zhang and Shi 1992; Chen and Leibenguth 1995).

Çok yönlü verim özelliği taşıyan ırklara sahip çıkılarak et, süt ve hastalıklara dayanıklılıklarını artırıcı ve yetiştiricilere daha fazla kar sağlayacı stratejiler genetik alanında sağlanan gelişmelerle DNA seviyesinde istenilen özellikler oluşturularak ıslah çalışmaları hem daha kısa sürede hem de daha etkili olarak yapılabilmektedir.

DNA seviyesinde yapılan çalışmalarla ıslah çalışmalarında dolaylı seleksiyondan yararlanırken ilgili gen içinde veya o gene çok yakın bir bölgede bulunan ve DNA segmentiyle bir sonraki generasyona aktarılan polimorfik bölgelerin tespiti amaçlanmaktadır. Tespit edilen bu polimorfik bölgeler marker olarak adlandırılmaktadır. Bu markerların tespiti ise RFLP, VNTR veya mikrosatellitler aracılığı ile kolayca yapılabilmektedir.

Bir lokusa ait allel frekansları, bir populasyondaki bireylerden alınan örneklerden aynı lokusun analiz edilmesiyle tahmin edilebilir. Genellikle populasyon genetikçileri bir lokusta bir veya daha fazla allel varsa ve bu allellerden en yaygın olanının frekansı 0.99'dan daha küçük ise o lokusu polimorfik olarak kabul etmektedirler. Gen havuzundaki allel frekansı değişiklikleri çok uzun zaman alabileceği gibi çok kısa sürede de gerçekleşebilir. Populasyonlardaki bireylerin sayısının azalması ya da artmasında; yiyecek kaynakları ve iklim gibi çevre şartlarının yanı sıra hastalıklar rol oynarken, genetik düzeydeki bir değişimin nedenleri arasında; mutasyon, göç, seleksiyon ve genetik sürüklenme gibi etkenler rol oynamaktadır. Bu sayılan etkenler allel frekansının değişimine ve dolayısıyla populasyon yapısının değişmesine yol açabilirler (Gardner *et al.* 1991).

Bir taraftan çiftlik hayvanları üretimine artan talep, bir taraftan özellikle alt gelir gruplarının ucuza üretebileceği, çevreye uyumlu özel genetik yapıya erişmiş yerli ırkların hızla yok olması, çok acil olarak yerli ırklar için koruma planlarının oluşturulması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Gen havuzları ıslah ve hayvan transferleri gibi yöntemlerle ya da genetik sürüklenme ile de generasyondan generasyona değişime uğramaktadır. Bu da yerli gen kaynaklarının

kaybolmasındaki artan risk karşısında bunlara dair en doğru genetik bilgiyi içerecek şekilde tanımlayıp derhal korunma altına alınması gerçeğini kaçınılmaz kılmaktadır. Yerli gen kaynaklarının korunması ile ilgili olarak FAO tarafından 1993 yılında "Hayvan Gen Kaynakları"nın (Animal Genetic Resources:AnGR) durumu araştırma projesi başlatılmıştır (Anonymous 1993). Proje ile moleküler markerlardan faydalanılarak ırk içi ve ırklar arası çeşitliliğin tespiti ve bu markerların kullanılması ile de ırkların korunması mümkün olacaktır.

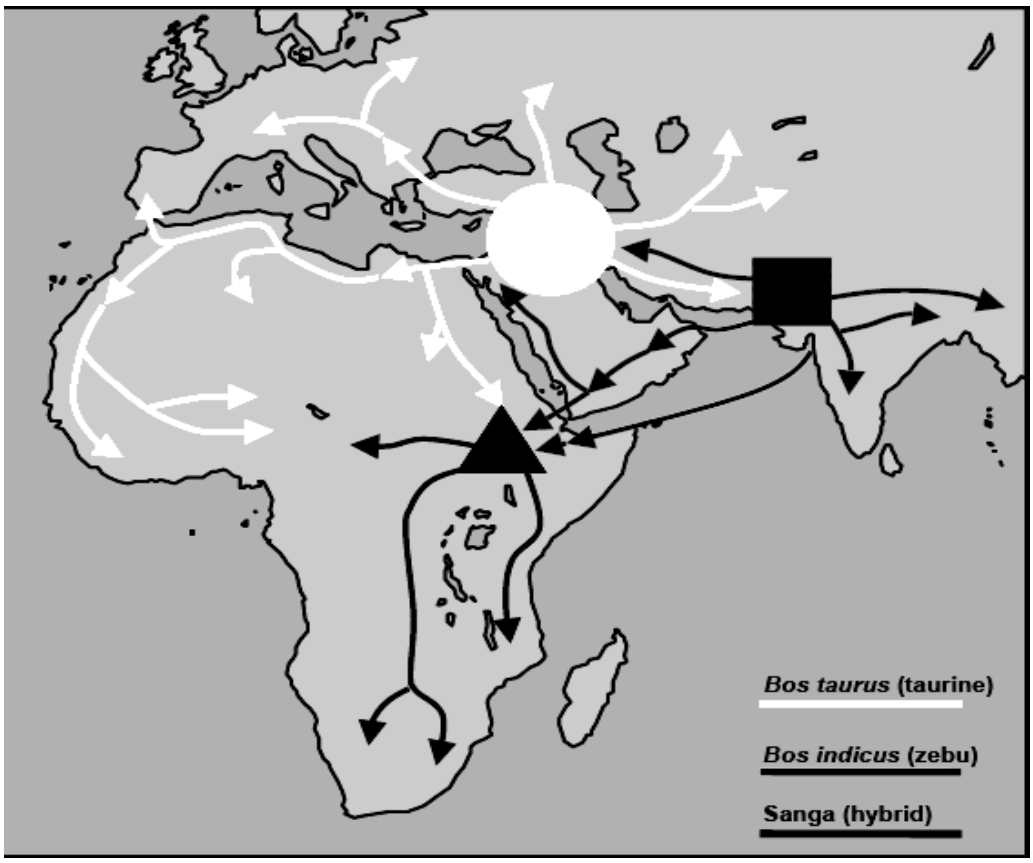
Genetik varyasyonun ırk özelliklerine ilişkin kayıtların tutulmadığı bir yetiştiricilikten ziyade, geniş sürüler halinde saf yetiştirme uygulanan koruma sürülerinde etkin biçimde korunabileceği bildirilmektedir (Hall and Brodley 1995).

Gen kaynaklarının korunması para, insan gücü ve iyi bir organizasyon gerektirmektedir. Gen kaynaklarının korunma nedenleri arasında; yerli ırkların tarıma elverişli olmayan arazileri değerlendirerek bu alanları et, süt ve güç kaynağına dönüştürmeleri, genetik çeşitliliğin devamını sağlayarak gelecekte oluşturulacak yeni tipler için temel genetik materyali oluşturmaları, melez tiplerde ortaya çıkabilecek çeşitli duyarlılıklara (hastalık, yaşama gücü vs.) karşı direncin artırılmasında kullanılabilmeleri sayılabilir (Soysal vd. 2001).

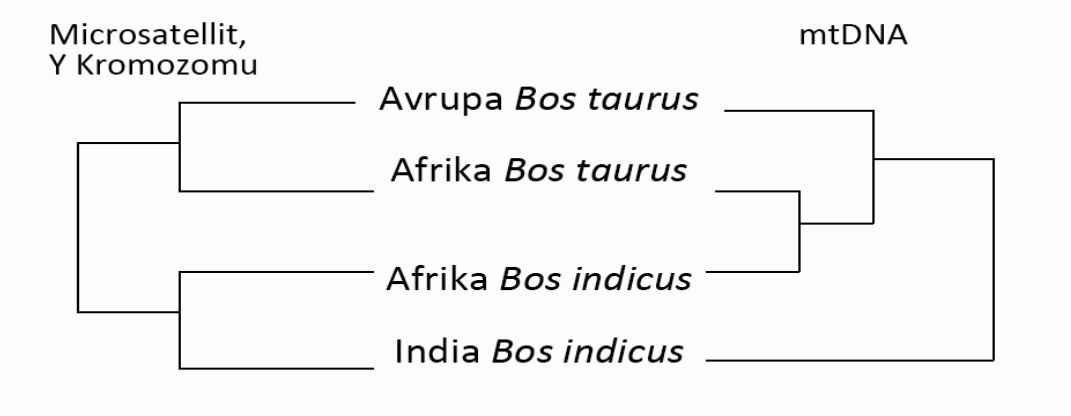
Genetik varyasyonun azalmasına ve nesillerin tükenmesine neden olabilen iki önemli etkenden söz edilebilir. Bunlardan ilki, son yıllarda tüketici tercihlerindeki değişiklik nedeni ile bir çok ırk yerine, tek bir ırkın yetiştiriciliğinin yaygınlaşması ve artmasıdır. İkinci önemli neden ise, ekonomik önemi olan verim özelliklerini artırmak için rastgele melezleme tekniklerinin uygulanması ile ırklardaki orijinal genetik bileşimin değişmesi ve dolaylı olarak da orijinal gen kaynaklarının hızla kaybolmasıdır (Soysal vd. 2001).

Evcil sığırların evcilleştirme merkezinin en az iki farklı bölgede; Yakın Doğu'da gerçek sığırlar olarak babul edilen hörgüçsüz Taurin ırkı (Bos taurus) ile Hindistan'ın Indus vadisinde hörgüçlü Zebu ırkı (Bos indicus) olduğu bilgisine hem mikrosatellitler hem de mtDNA verileri vasıtasıyla ulaşılmıştır (Loftus *et al.*1999; Troy *et al.* 2001; Bruford *et*

al. 2003). Ayrıca Afrika Zebu'su olarak bilinen sığırların annelerinin Taurin, babalarının Zebu sığırları olduğu bildirilmekte (MacHugh et al. 1997; Troy et al. 2001; Cunningham 2003) ve dış görünümün ırk gurupları içinde bir ırkın yerinin tanımlanmasında yanıltıcı sonuçlar verebileceği gösterilmektedir (Şekil 1.5; 1.6).



Şekil 1.5. Evcilleştirme Merkezleri (Cunningham 2003)



Şekil 1.6. Nükleer DNA ve mtDNA Verilerine Göre Sığır Grupları (Cunningham 2003)

mtDNA rekombinasyon geçirmediği için annesel de olsa ırkların birbirleri ile ve yabani türlerle filogenetik ilişkilerini ortaya çıkarması böylelikle evcilleştirme merkezlerinin yerini göstermesi bakımından da avantaj sağlamaktadır (Troy *et al.* 2001; Hiendleder *et al.* 2002).

Sığır, koyun ve keçide yapılan genetik analizler, arkeolojik verileri destekleyerek Anadolu'nun Doğu ve Güneydoğusu'na yakın merkezin büyük bir olasılıkla bu türler için evcilleştirmenin başladığı en eski merkez olduğunu göstermektedir (Loftus *et al.*1994a; 1999; Luikart *et al.* 2001). Bu sonuçlar, dünyadaki pek çok ırka atalık etmiş ilk evcil sürülerin günümüzde yaşayan en yakın akrabalarından olan Anadolu yerli ırkları gibi ırkların dünyadaki diğer birçok yerli ırktan daha büyük bir öncelikle korunmaları gerektiğini ortaya çıkartmaktadır (Bruford *et al.* 2003).

Irklar arasında korunmada öncelik sırasını belirleyecek kıstas çalışmalarında daha çok ırk içi genetik varyasyona önem verilmiş olmakla birlikte, son yıllarda ırkların öncelikli korunma sıralarının saptanması için ırklar içi ve ırklar arası genetik varyasyonun yanı sıra, ilerideki kullanım potansiyelleri, şu andaki risk durumları, özel çevre koşullarına uyum sağlamış olmaları ve ekonomik önemlerinin de değerlendirmeye alınması gerektiği bildirilmektedir (Siminiar *et al.* 2003).

Ülkemiz çoğrafi ve ekolojik çeşitlilik ve kıtalar arası geçit bölgesindeki konumu ile sığır, koyun, manda gibi hayvanlar için çok sayıda ırk ile karakterize edilebilen genetik çeşitliliğe sahiptir. Ülkemizde şu ana kadar ırk özelliklerine dayalı detaylı bir sayım yapılamadığından ırkların mevcut sayıları hakkında kesin rakamlar vermek mümkün olmamakta ve hangi ırkların tehdit altında olduğu açıkça ortaya konamamaktadır. Ancak yerli ırkların her geçen gün yerini yüksek verimli kültür ırklarına bıraktığı, hatta bazı ırkların daha tam olarak tanımlanamadan yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kaldığı bildirilmektedir (Soysal 2004). Son yıllarda üzerinde çeşitli yönde çalışmaların yoğunlaştığı yerli sığır ırklarımızın sahip oldukları özelliklerin bilinmesi yapılacak çalışmalara yön verme bakımından önemlidir.

Bozırk; Türkiye'nin Trakya Bölgesi ile Bursa, Balıkesir, Çanakkale ve Kocaeli illeri civarında dağılım göstermektedir. Renkleri gümüşten griye doğru değişir. Boynuzları hilal şeklindedir. Yetişkin canlı ağırlıkları 300 kg civarında, vücutları ince yapılı olup süt için yetiştirilirler. Ortalama süt verimleri 1000-1500 kg arasındadır. 100-150 yıl önce Bulgaristan'dan geldikleri bilinmektedir.Yavaş gelişen bir ırktır. Ağır bozkır şartlarına uyum yetenekleri yüksektir. Populasyon durumları giderek azalmaktadır (Soysal 2004; Özhan vd. 2004).

Doğu Anadolu Kırmızısı; Türkiye'nin Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu Bölgeleri'ne dağılım göstermiştir. Renkleri kırmızı, soluk kırmızı veya kestane rengine kadar değişir. Her iki cinsiyet de boynuzludur. Yetişkin canlı ağırlıkları 300-350 kg civarında olup vücutları dar yapılıdır. Hem et hem de süt için yetiştirilirler. Yerli ırklar içerisinde en iyi etçi özellikli ırkımızdır. Ortalama süt verimleri 1000-1200 kg olup yağ yüzdesi %3,6 civarındadır. Adaptasyon kabiliyetleri yüksektir ve sert iklim koşullarına karşı dayanıklıdırlar. Populasyon durumları giderek azalmaktadır (Soysal 2004; Özhan vd. 2004).

Güney Anadolu Kırmızısı; Mersin'den başlayarak Hatay ve Şanlıurfa'ya kadar olan bölgeleri oluşturan Güney ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde dağılım göstermektedir. Sarıdan kahverengiye doğru değişen vücut rengi ve genellikle kısa, ancak bazen gelişmemiş boynuz tipiyle karakterize edilir. Yetişkin canlı ağırlıkları 325 kg civarında olup vücutları dar yapılı, uzun bacaklı ve kısa boyunludurlar. Hem süt hem de et için yetiştirilirlerse de Türkiye'nin en iri ve en sütlü ırkıdır. Ortalama süt verimleri 2000 kg olsa da en yüksek 5000 kg ve daha fazla verenlerde mevcuttur. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin sıcak iklimine uyum sağlamıştır ve bu tür iklimlere özgü hastalıklara karşı dayanıklıdır. Populasyon durumları giderek azalmaktadır (Soysal 2004; Özhan vd. 2004).

Yerli Kara; tüm Orta Anadolu'ya dağılım göstermiş olup gerek sayı gerekse yayılma alanı en geniş olan ırktır. Siyah vücut rengine sahip olup her iki cinsiyette boynuzludur. Yetişkin canlı ağırlıkları 200-300 kg civarında olup vücutları dar yapılı, kısa ve ince

bacaklıdırlar. Hem süt hem de et tipi özelliklerine sahiptir. Ortalama süt verimleri 500-1000 kg arasında olup, sütlerindeki yağ oranı %5'in üzerindedir. Her türlü iklimi çabuk uyum sağlayabilir ve hastalıklara karşı oldukça dayanıklıdır. Populasyon durumları giderek azalmaktadır (Soysal 2004; Özhan vd. 2004).

Türkiye'de yerli sığır gen kaynaklarımız üzerinde moleküler düzeyde yapılmış iki mikrosatellit çalışması bulunmaktadır. Altınalan (2005)'nın yaptığı çalışmada, 26 farklı mikrosatellit lokusu ile Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan 4 yerli sığır ırkı (Bozırk, Yerli Kara, Güney Anadolu Kırmızısı ve Doğu Anadolu Kırmızısı) ve bir kültür sığır ırkının (Siyah-Alaca) genetik yapısı incelenmiş ve Siyah-Alaca kültür ırkı ile karşılaştırmalı filogenisi sunulmuştur. Özkan (2005)'ın yaptığı diğer çalışmada ise 7 farklı mikrosatellit lokusu ile Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan 4 yerli sığır ırkı (Bozırk, Yerli Kara, Güney Anadolu Kırmızısı ve Doğu Anadolu Kırmızısı) ve üç kültür sığır ırkının (Siyah-Alaca, Jersey ve Esmer-İsviçre) genetik yapısı daha fazla örnek kullanılarak incelenmiş ve karşılaştırmalı filogenisi sunulmuştur.

Adaptasyon yeteneği yüksek yerli ırklarımızın korunması ile ıslah çalışmalarına temel oluşturacak genetik çeşitlilik kaybedilmeden, melez üstünlüğünden yararlanılabilecek, ayrıca düşük girdi ile üretim yapılan bölgelerde ve tüm kesimlerin önemsediği organik tarımda önemli rol oynayabileceği göz önüne alındığında yukarıda belirtilen moleküler düzeydeki bu ve farklı kalıtım materyalinin dikkate alındığı çalışmalarla yerli gen kaynaklarımızın genetik yapısı geç kalınmadan ortaya çıkarılmalı ve bir an önce etkili koruma planları yürürlüğe geçirilmelidir.

Artan dünya nüfusuna karşılık nicelik ve nitelik açısından azalan tarım alanlarına ilave olarak ortaya çıkan sosyal ve ekonomik gelişmeler dengeli ve yeterli beslenmede hayvansal ürünlere olan talebi giderek artırmaktadır. Bu talebin karşılanmasında, hayvan başına elde edilen verimin artırılması büyük önem taşımaktadır. Verim artışının sağlanmasında çevre şartlarının iyileştirilmesi ve klasik ıslah metodları ile doyuma

ulaşıldığından genotipin iyileştirilmesinde daha sonraki generasyonlarda kalıtsallığın kullanıldığı moleküler markerlara artan düzeylerde yer verilmelidir.

Hayvanlarda çeşitli verim özellikleri bakımından başarılı bir ıslah çalışması yapılabilmesi için öncelikle genetik yapılarının iyi bir şekilde ortaya konması gerekmektedir. Genetik yapının belirlenmesi çalışmaları içinde, önceleri protein ve enzim polimorfizmine dayalı teknikler kullanılmakta iken, son yıllarda bu çalışmalar doğrudan DNA üzerinde yapılmaya başlanmıştır. Bir çok ülkede çoğu araştırıcı, ülkelerine ait ırkların hem ıslahı, hem de yerli gen kaynağı olarak korunmasına yardımcı olmak amacıyla moleküler düzeyde teknikleri kullanarak DNA düzeyinde çalışmalar yapmaktadırlar. Ülkemizde bu konuyla ilgili çalışmalar henüz çok sınırlı bulunmaktadır. Bu sebeple hem DNA düzeyinde çalışma imkanı sunan teknikleri kullanmak, hem de mtDNA'yı nükleer DNA'dan ayıran avantajlarından faydalanmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

mtDNA'daki yüksek değişim hızının ortaya koyduğu olumlu ve olumsuz yönlerin daha fazla geç kalınmadan ele alınması zorunludur. Çünkü mtDNA'daki yüksek değişim hızı sebebiyle incelemeler daha sonraki generasyonlara bırakıldığı takdirde, gerçek genetik yapıdan uzaklaşma ihtimalinin artacak olması, arzulanan gerçek genetik yapıyı ortaya koymada sapmalar meydana getirebileceğinden bu aleyhdeki durumu bir an evvel sonlandırmak gerekmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada; Türkiye'de mevcut yerli sığır ırklarının mtDNA'ları üzerindeki polimorfik yapılarının ortaya konulması amacıyla PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemlerinin kullanıldığı çalışma planlanmış, bu suretle; Türkiye yerli sığır ırkları genetiği çalışmaları içerisinde ilk kez mtDNA ve üzerinde bulunan polimorfik bölgeler hakkında bilgi sunmak, mtDNA kaynaklı genetik varyasyonunu belirlemek, yerli ırklarla mevcut diğer ırklar arasındaki genetik mesafeleri tespit etmek, filogenisini sunarak karşılaştırma imkanı sağlamak, ırka özgün polimorfik bölgeleri tespit etmek, polimorfik bulunan bölgelerin marker olabilmesine rehberlik etmek ve yerli sığırlarımıza ait mtDNA veri tabanı oluşturmak hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Anderson *et al.* (1982) tarafından sığır mtDNA'sının tam dizisi ortaya konduktan sonra mtDNA üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Özellikle RFLP çalışmaları, mtDNA'nın çeşitli variyantlarının bulunduğunu ortaya koymuştur.

Hauswirth and Laipis (1982), yaptıkları çalışmalarında hat-içi mitokondrial DNA polimorfizminin nadir görüldüğünü bildirmişlerdir. Bunlara karşılık mtDNA'nın yüksek memelilerde nükleer DNA'dan daha hızlı değişime uğradığı bir çok araştırıcı (Upholt and Dawid 1977; Brown *et al.* 1979) tarafından bildirilirken, Avise (1991), mtDNA'nın D-loop bölgesinin mutasyon hızının geri kalan kısımlarına göre %2-4 kat, nükleer DNA'ya göre ise en az 10 kat daha hızlı olduğunu bildirmektedir. Ayrıca mtDNA, yüksek mutasyon hızı ve rekombinasyon eksikliği gibi kalıtım özellikleriyle yakın akrabalı türler arasındaki genetik ilişkileri değerlendirmede oldukça faydalı bulunmaktadır (Brown *et al.* 1979).

Tess *et al*. (1987), iki farklı bölgede yetiştirilen Hereford sığırlarda sitoplazmik etkinin; doğum ağırlığı, ortalama günlük canlı ağırlık artışı ve 205 günlük canlı ağırlık özellikleri üzerinde iki, süt verimi açısından ise bir bölgede istatistiki önemlilik bildirirlerken, sitoplazmik genetik etkinin doğruluğunun saptanması için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Tess and Robison (1990), Hereford sığırlar üzerindeki çalışmalarında, çeşitli verim özellikleri üzerinde sitoplazmik genetik etkiden kaynaklanan önemli bir varyasyon tespit edilemediğini bildirmektedirler.

Kapalı olarak yetiştirilen Hereford sığırların maternal hatlarına ait 5 generasyon takip edilerek oluşturulan 3400-4700 verim kaydının kulanıldığı bir çalışmada, doğum ağırlığı, sütten kesim öncesi günlük ortalama canlı ağırlık artışı ve sütten kesim sonrası

günlük ortalama canlı ağırlık artışı özellikleri ile sitoplazmik genetik etki arasında herhangi bir ilişki tespit edilemediği bildirilmiştir (Tess and MacNeil 1994).

3 Japon Shorthorn'u, 4 Japon yerli ve 6 Holstein ineklerine ait tüm mtDNA'ya 17 RE enziminin uygulandığı RFLP çalışmasında, *HindIII* enzimi haricinde uygulanan diğer enzimlerin polimorfizm belirleyemediği bildirilmiştir (Watanable *et al.* 1985).

Boğalar değerlendirilirken mevcut sistemde sitoplazmik etkiler ihmal edilmektedir. Çünkü güçlü bir mitokondriyal etki yavrusuna sadece dişilerle aktarıldığından boğaların damızlık değer tahminleri bu suretle dişilerin performansı üzerine dayandırılmış olmaktadır. Bu nedenle sitoplazmik genetik varyasyon üzerine yapılacak çalışmalarla heterosis ve maternal etkinin daha iyi temellere oturtulması gerektiği bildirilmektedir (Brown *et al.* 1989).

Bhat *et al.*(1990), Hariana, Hindistan Su Bufalosu ve Holstein sığırlarının mtDNA'ları üzerinde yaklaşık 40 bç tanıma bölgesine sahip 13 RE ile yaptıkları çalışmalarında, *AvaII, BamHI, BglII, HindIII, HpaI* ve *PstI* enzimleri ile Holstein'da, *Bst I* enzimi ile de Bufalo'da polimorfizm tespit etmişlerdir. Hariana sığırından tek bölge kesim farklılıkları ile Holstein sığırları toplam 6 bölgede farklılık sergilerken, Hariana ırkında polimorfik bölge bulunmamasının sebebi genetik göçün çok çok sınırlı olması gösterilmektedir.

Suzuki *et al.* (1993), Afrika'da mevcut 25 N'Dama, 13 Kenyan Boran, 12 Kenyan Zebu ve 8 Holstein olmak üzere toplam 58 mtDNA örneği üzerine PCR-RFLP ile yaptıkları çalışmalarında; tüm D-loop bölgesini kapsayan 15601-404 bazları arası 1142 bç'lik bölge içerisinde 154 bç tarayabilen 12 enzimden*; ApaI, AvaII, BamHI, BstXI ve EcoNI* polimorfizm gösterirken, *AseI, DraI, HpaII, NsiI, PstI*, *SspI ve TaqI* enzimleri ise farklılık oluşturmamıştır. D-Loop bölgesinde; *ApaI* enziminin kesim yeri oluşurken, diğer enzimler kesim bölge kaybı ile polimorfizm göstermişlerdir. Enzimlerden *EcoNI* N'Dama'da, *BstXI* Kenyan Boran'da, *BamHI* ve *ApaI* Kenyan Zebu'da ve *AvaII*

Holstein'da B formları oluşturmuştur. İncelenen ND5 bölgesinin 453 bç'lik kısmında 54 nükleotid dizisini tarama kapasitesine sahip 7 enzimden *EcoRI,* sadece Holstein'larda sahip olduğu tek kesim yerinin kaybolması şeklinde polimorfizm göstermiş, *BstXI, DraI, HindIII, SnaBI*, *SpeI* ve *SspI* enzimleri ise populasyonlarda herhangi bir farklılık göstermemiştir.

Loftus *et al.* (1994b), 3 kıtadan aldıkları 13 farklı ırkı temsil eden 130 hayvandan elde edilen mtDNA'lara, ırklar arasındaki varyasyonu ve filogenetik ilişkileri belirlemek için RFLP yöntemiyle tüm mtDNA'nın 180 bç'ini 30 tanıma bölgesiyle tarayan *ApaI, BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, HpaI* ve *StyI* RE'leri kullanarak yaptıkları çalışmalarında *ApaI* haricinde diğer 6 enzimle polimorfizm belirlemişlerdir. Toplam 16 farklı haplotip belirledikleri çalışmalarında tiplerin tümü iki büyük (Afro-Avrupa ve Asya) hat içerisinde yer almıştır. Haplotipler içerisinde önemli varyasyon bulamamışlardır.

Alman Siyah-Alaca ve Kırmızı-Alaca sığır ırklarından elde edilen mtDNA üzerine 5 RE (*HindIII, BglII, EcoRI, EcoRV ve BamHI*) uygulanması sonucu, ırklar ve aynı ırkın bireyleri arasında polimorfik bölge tespit edilemediği bildirilmiştir (Chen and Leibenguth 1995)

Parfitt and Huisman (1998), 11 Afrikaner, 12 Nguni, 1 Brahman ve 1 Jersey sığırları D-loop bölgesi üzerinde toplam 50 bç tanıma bölgesine sahip *AvaII, AspHI, BarnHI, HaeIII, MspI, PstI, SaeI, TaqI ve XbaI* enzimlerini kullanarak yaptıkları PCR-RFLP çalışmalarında polimorfizm tespit edemezken, gözlenen kesim yerlerinin tümü Anderson *et al.* (1982) tarafından bildirilenlerle benzerlik göstermiştir.

Yu *et al.* (1999), Çin'in güney bölgesinde yetiştirilmekte olan 11 yerli sığır ırkına ait 154 mtDNA üzerine 10 RE uyguladıkları RFLP çalışmalarında, *BglII* ve *EcoRI* enzimleri herhangi bir kesim farklılığı oluşturmazken, *AvaI, BamHI, EcoRV, HindIII*, *HpaI, PstI, PvuII* ve *SalI* enzimlerinin ortaya çıkardığı 23 farklı kesim bölgesinin oluşturduğu 5 haplotip bildirmişlerdir.

21 Yak mtDNA'sı üzerine PCR-RFLP ile 20 RE kullanıldığı bir çalışmada, *AvaI* A ve B, *AvaII A, B, C ve D, BglII, EcoRI, HindIII* ve *HpaI* enzimlerinin *A ve B* şeklinde ortaya koyduğu polimorfizm ile 4 farklı mtDNA haplotipin tanımlandığı bildirilmektedir (Tu *et al.* 2002)

mtDNA'nın sahip olduğu yukarıda sayılan avantajları yanında, görülen varyasyonların yüksek düzeyde bulunması araştırıcılara, polimorfik yapı gösteren markerlar ile verim özellikleri arasındaki varyasyonları ilişkilendirme çalışmalarını ortaya çıkarma noktasında konuya farklı bir bakış açısı kazandırmıştır.

mtDNA moleküllerinin toplam büyüklüğü, gen transkripsiyon ve translasyon ürünlerinin varlığı ve mitokondriyal oksidatif enerji transdüksiyonunun tamamı mtDNA'daki varyasyonlar tarafından etkilenebilmektedir. Verim özellikleri üzerine sitoplazmik etkilerin varlığını ortaya koymak için sitoplazmik genetik varyasyonun doğruluğunu ispatlayacak kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple büyük populasyonlarda sitoplazmik genetik etkiler moleküler analiz yöntemleriyle ortaya konmalı ve verim varyansı üzerine etkileri açıklanmalıdır (Brown *et al.* 1989).

mtDNA'nın aynı türün hayvanları arasında varyasyon göstermesi ve mitokondrinin laktasyonda rol oynamasından (Jones and Rosano 1972; Sarma 1975; Rosano *et al.* 1976) dolayı süt verim özelliklerindeki toplam varyasyon içerisinde sitoplazmik varyasyonun da rol aldığı düşünülebilir.

Maternal olarak kalıtlanan genetik üniteleri mitokondri ve mtDNA oluşturmaktadır. Memeli mtDNA'sı oksidatif fosforilasyonda kullanılan 13 enzimi, 22 tRNA ve 2 rRNA'yı kodlamasına rağmen bu mitokondri içerisinde bulunan toplam proteinlerin ancak %2'sini oluşturmakta, geri kalan %98'lik kısmı teşkil eden proteinler ise nükleer DNA tarafından kodlanmaktadır. Döl verim özellikleriyle mitokondriyal genlerin doğrudan ilişkisi tam kesin olmamakla birlikte, sığırlarda verim özellikleri bazı mtDNA polimorfik yapılarıyla doğrudan ilişkili bulunabilmektedir. mtDNA'nın kalıtım bilgisi

ve verim üzerine etkisi açığa kavuşturulduğunda hayvanlarda döl verimi artırılabilecek, böylelikle mitokondri genetiğini daha iyi kavramamızı sağlayacak uygulamalara sahip olabilme imkanı doğacaktır (Smith and Alcivar 1993).

Çiftlik hayvanlarında marker yardımlı seleksiyon vasıtasıyla verim artışındaki genetik kazancın oranı yükseltilebilmektedir. Kashi *et al.* (1990), marker yardımlı seleksiyon ile çiftlik hayvanlarında genetik kazancın oranının %15-30 kadar artırılabileceğini bildirmektedirler. Edwards and Page (1994), marker yardımlı seleksiyon ile beklenen toplam kazancın kullanılan modele bağlı olarak %44,7 den %99,5'e kadar değişebileceğini tahmin etmişlerdir. Kalitatif özellikler için seleksiyonun isabet derecesi ayrıca marker yardımlı seleksiyon ile geliştirilebilir (Brenneman *et al.* 1996). Bishop *et al.* (1995), sığırlar üzerinde ileri üreme teknikleri ile beraber marker destekli seleksiyon kullanıldığı takdirde, generasyon aralığının 69'dan 45 aya kadar kısaltılabileceğini bildirmişlerdir.

Resiprokal çaprazlarda, paternal ırktan gelen nükleer genin aynı oranına sahip olduklarından, resiprokallerin performansları arasındaki farklılık sitoplazmik kalıtım ile açıklanabilmektedir (Bell *et al.* 1985).

Bell *et al.* (1985), 102 maternal hattı temsil eden 4461 sığırın verilerinin kullanıldığı analizde sitoplazmik kalıtımın toplam varyasyonda paylarını; süt verimi için %2,0, yağ verimi için %1,8 ve yağ oranı için %3,5 şeklinde bildirirlerken, süt sığırlarının verim özelliklerinde sitoplazmik etkinin varyasyonun önemli bir kaynağını oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca aşıma açık gün sayısı üzerine etkisi önemli bulunan maternal hattın önemini ise steroidlerin sentezinde rol alan mitokondriye bağlamışlardır. Sitoplazmik etkiler olarak kabul edilen mitokondri ve diğer bazı sitoplazmik komponentlerin süt sığırlarında verim özelliklerini etkilediği, bunlardan mitokondrinin hücrenin metabolik enerji merkezi olması nedeniyle laktasyonda oynadığı direkt rol ve mtDNA'nın da çeşitlilik göstermesiyle oynadığı indirekt rolle görülen farklılıkların çoğunun mitokondriden kaynaklandığını belirtmektedirler.

Maternal olarak kalıtım sergileyen sitoplazmik etkinin diğer verim özelliklerinden ziyade yağ oranı üzerine daha büyük oranda etki yapması, yağ asit sentezinde mitokondrinin rol oynaması ile açıklanmaktadır (Bell *et al.* 1985).

Huizinga *et al.* (1986), süt verimi varyasyonun %13'ünün ve sütte bulunan yağ ve protein verimindeki varyasyonun %10'unun maternal pedigrilerdeki farklılıklarla açıklandığını bildirirken, Schutz *et al.* (1992), yağ verimi, yağ oranı ve süt enerji konsantrasyonu ile maternal hattı önemli derecede ilişkili bulmuşlar ve varyasyondaki oranlarını sırasıyla %5,2, %4,1 ve %10,5 olarak bildirmişlerdir.

Kennedy (1986), 5 farklı sürüden 90'ar adet sığırda simulasyon tekniği kullanarak elde ettiği verilere dayalı çalışmasında ortaya çıkan sitoplazmik etkinin Bell *et al.* (1985)'ın verileriyle uyum içerisinde olduğu, süt ve yağ verimi üzerine etkilerin önemli bulunduğunu bildirmiştir.

Reed and Van Vleck (1987), Holstein sığırların mevcut verim kayıtlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarında, süt ve yağ verimi ile yağ oranı üzerine hat-içi sitoplazmik etkiden kaynaklanan varyasyon belirleyememişlerdir.

Brown *et al.* (1988), yaptıkları çalışmalarında in vitro mitokondrial ATP sentez oranı ile Holstein sığırların süt verimi arasındaki korelasyonu yaklaşık 0,5 olarak tahmin etmişlerdir.

Brown *et al.* (1989), 35 Holstein maternal hattı üzerinde RFLP metodunu kullandıkları çalışmalarında; *AluI, BstEII, DraI, MboII, RsaI* ve *SstI* markerları ile farklılık bulamazlarken, *HpaII* markeri ile belirlenen polimorfizmin süt ve yağ verimi ile ilişkisiz olduğunu, % yağ oranı düşüklüğü ile de çok önemli derecede ($p<0.001$) ilişkili bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile, mtDNA-RFLP markerları sayesinde sitoplazmik hatların potansiyel faydalarının bulunduğu gösterilmiş ve kantitatif fenotip üzerine sitoplazmik genetik etkinin varlığını destekleyen önemli kanıtlar sunulmuştur.

Harrison *et al.* (1990), düşük vücut ısısına sahip olan süt sığırlarının daha düşük gebe kalma oranına sahip olduğunu, bunun da mitokondrinin hücre enerji metabolizmasındaki görevi nedeniyle mtDNA genotipinin önemini öne çıkardığını bildirmişlerdir.

Maternal kalıtım etkisini oluşturan mtDNA, süt sığırlarında süt ve döl veriminin üstünlüğü için önemli olabilmektedir. Nitekim süt ve sütün bileşenleri için hesaplanan fenotipik varyasyonda maternal hattın etkisinin farklı oranlarda olduğu bildirilmektedir. (Robison *et al.* 1981; Lin *et al.* 1982; Bell *et al.* 1985; Huizinga *et al.* 1986; Schutz *et al.* 1992).

Schutz *et al.* (1993), maternal polimorfik hatların sütte enerji seviyesi ve yağ verimi üzerine küçük oranda fakat istatistiki olarak önemli etki yaptığını bildirmişlerdir. Çünkü yağ, protein ve laktoz sütteki enerjinin başlıca kaynaklarıdır, dolayısıyla mtDNA polimorfizmi sütteki enerji içeriği ile doğrudan ilişkili olacaktır.

mtDNA'nın D-loop bölgesi mevcut herhangi bir gen üretmediği için kodlanmamakta; bu nedenle bu bölgede gerçekleşen dizi varyasyonun metabolik zincir üniteleri olan özel aminoasit dizilerini değiştirmemesi beklenmektedir. mtDNA'nın ağır ve hafif zincirlerinin replikasyon orjinlerine ilave olarak transkripsiyon için gerekli promoterler de D-loop bölgesi içinde uzanmaktadır. Bu sebeple mtDNA'daki herhangi bir dizi farklılığı replikasyon ve transkripsiyon üzerine etkisiyle kendisini gösterir. Ayrıca bazı özelliklerin fenotipe yansımasını doğrudan etkileyen genlerin kodlanma bölgesinde oluşacak böyle bir D-loop polimorfizmi marker olarak kullanılabilmektedir (Schutz *et al.* 1994).

Schutz *et al.* (1994), 36 maternal hatta sahip sürüdeki 728 ineğin 1800 kaydını kullandıkları ve 7 verim özelliğiyle (süt verimi, yağ verimi, SNF (sütün yağsız kuru madde kısmı), % yağ, % SNF, laktasyon enerjisi ve enerji içeriği) ilişkilendirdikleri çalışmalarında, tespit edilen 17 polimorfik bölgeden 11'inin en az bir verim özelliği

üzerine önemli derecede etkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca dataların yeterli olması halinde daha büyük etkilerin tespit edilebileceğini bildirmişlerdir. Daha önce yaptıkları çalışmada önemli olmayan bir bölgenin bu çalışma ile önemli çıkması D-loop değişiminin etkisinin düşünülmesi gerektiğini ve ayrıca diğer çalışmalarla da D-loop bölgesinin dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır. Burada D-loop dizi polimorfizminin, muhtemelen verim özelliklerini doğrudan etkilemeden mtDNA genomundaki başka bölgeleri kodlayan genler üzerine etki yaparak işlevini gerçekleştirdiğini bildirmektedirler.

Boettcher *et al.* (1996), Iowa State Üniversitesinde 29 maternal hatta ait mtDNA'nın rRNA dizileri mevcut 602 sığıra ait 1476 verim kaydını kullandıkları çalışmalarında, 11 polimorfik bölge tespit derken, bu bölgelerin süt, yağ, SNF ve süt enerji içeriği ile yağ ve SNF oranı üzerine önemli etki yaptıklarını bildirmişlerdir. Kuzey Carolina'da 12 maternal hatta ait D-loop dizi bilgileri mevcut 668 sığırın 1472 verim kaydını kullandıkları çalışmada ise, 4 polimorfik bölge tespit ederken D-loop polimorfizmi ile bahsedilen verim özellikleri arasında herhangi önemli bir ilişki bulamamışlardır. Çalışmada mutant nükleotidlerle ilgili incelenen tüm önemli bulanan etkiler negatif yönde tespit edilirken bunun da süt sığırı seleksiyonunda kriter olarak düşünülmesi gerektiğini ortaya koymuşlardır.

Cymbron *et al.* (1999), 6 Portekiz yerli ırkını temsil eden toplam 49 sığırda mtDNA D-loop bölgesinin 240 bç'lik dizi varyasyonunu inceledikleri çalışmalarında, 30 transisyon, 1 transversiyon ve 1 delesyondan oluşan 32 polimorfik bölgenin ortaya çıkardığı 26 haplotipin Avrupa ve Afrika orijinli iki gruba dahil olduklarını bildirmektedirler.

Sutarno *et al.* (2002), Hereford ve melezlerinden oluşan 422 sığıra ait mtDNA'nın 15601 ve 404 pozisyonları arasında 1142 bç lik bölgede kalan D-loop ile 12058 ve 12510 pozsiyonları arasında kalan 453 bç uzunluğunda kısmi ND5 bölgelerine PCR-RFLP analizi ile 7 RE uyguladıkları çalışmada, D-loop bölgesinde *HindIII* ve *SpeI* enzimlerinin farklılık oluşturmadığını, ancak *TaqI ve PstI*'in kesim yerinin kaybolması

ve *SspI, ApaI* ve *AvaII* enzimlerinin yeni birer kesim yerleri oluşması şeklinde tespit edilen B formları ile 8 haplotip bildirmişlerdir. ND5 bölgesinde ise *HindIII* ve *SpeI* enzimlerinin tanıma bölgesi kaybıyla oluşan 2 polimorfik bölge ve 2 haplotip belirlemişlerdir. mtDNA polimorfizmi ile buzağılama oranı arasında önemli ilişkiler olduğunu ve bu gibi bulguların sığırların genetik ıslahında kolaylıklar sağlayabileceğini bildirmişlerdir.

Bir ırka ait eldeki bir hayvanı tanımlamak için deri renginden testis büyüklüğüne kadar değişebilen çeşitli fenotipik karekterler kullanılırken bu amaçla kantitatif karakterlerden faydalanmak zor olmaktadır. Irk içi karşılaştırmalarda herhangi bir anlamlılık sağlamayacağından bu çeşit bilgiler tanımlamada yetersiz kalmaktadır. Kan protein tipleri, karyotipleme ve immunolojik deneyler ile elde edilen fenotipik karekterlere ait verilerle yakın akrabalı sığır ırkları arasındaki farklılıkları çözmek mümkün olamamaktadır. Bu sorun, genomu doğrudan incelemeye dayalı moleküler tekniklerin kullanılmasıyla çözülmektedir (Meghen *et al.* 2002).

Irk içi ve ırklar arası varyasyonu değerlendirmek ve ırklar arası ilişkileri ortaya koymak bakımından seçilecek markerların polimorfik olması gerekmektedir. Ayrıca markerların nötral olması esastır. Ancak bu şekildeki gözlemler ile benzerlikler ortaya konabilir (Meghen *et al.* 2002).

Kantitatif özellik lokuslarının (QTL) haritalanmasında doğrudan ekonomik verimlerle ilgili gen üzerinde çalışmak yerine, dolaylı yönden ilişkili genetik markerları tanımlamak daha kolay ve etkili bir yol olarak bildirilmektedir (Ge *et al.* 2002).

D-loop bölgesi herhangi bir gen ürünü üretmediği için bu bölgedeki genetik varyasyonlar mtDNA'nın kalan diğer üretken bölgeleri için de marker olarak kullanılabilir.

Boettcher *et al.* (1996), tüm mtDNA dizi analizleriyle tespit edilen polimorfik bölgelerden ziyade RFLP ile tespit edilecek markerları kullanmanın yetiştiricilere daha yararlı olacağını bildirmektedirler.

Ron *et al.* (1993), İsrail Holstein populasyonlarında 4 düşük ve 4 yüksek süt verimine sahip maternal hattın D-loop bölgesine ait 719 baz dizilimini inceledikleri çalışmalarında, 18 polimorfik bölge tespit ederken, polimorfik bölgelerin süt verim özellikleri üzerine etkili bulunamadığını bildirmişlerdir.

Steinborn *et al.*(1998), birbirine akraba olmayan 32 Avusturya sığırı D-loop bölgesi üzerinde 43 nükleotid farklılığı gözlerken, bunların 33 adetini transisyon, 5'i transversiyon, 1'ini delesyon ve 4'ünü 221 sıralı sitozin serisindeki insersiyon olarak bildirmişlerdir.

Mannen *et al.* (1998), 32 Japon yerli sığırının D-loop bölgesi dizilimini inceledikleri çalışmalarında 18 haplotip tespit ederlerken, diğer ırklarla oluşturdukları filogenetik analiz sonucunda Avrupa, Afrika ve Japon grubu olmak üzere üç ayrı kümenin oluştuğu ve bir kaç yerli sığır ırkının Avrupa ve Afrika ırkları ile aynı gruplar içerisinde bulunduğunu ve ayrı küme oluşturan Japon grubunun Doğu Asya'ya getirilen ilk evcil sığırların kanıtı sayılabileceğini bildirmişlerdir.

Enerji üretimindeki kritik önemliliğinden dolayı mitokondri bilim adamlarının büyük ilgisini çekerken, insanlarda mtDNA kalıtım varyantlarının sağlıklı yaşam ve ömür uzunluğuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Benedictis *et al.* 1999).

Troy *et al.* (2001), 383 Bos taurus'a ait 240 D-loop dizisini inceledikleri çalışmalarında, 77 polimorfik bölgeye sahip 152 haplotip tespit etmişlerdir. Çalışmalarında Avrupa sığırlarının yakın doğu orjinli olduklarını belirlemişlerdir. Orijinal bir merkezden gelen genetik lokusların daha fazla atasal varyansa ulaşması ve daha yüksek haplotip ve nükleotid çeşitliliği göstermesi beklenmesi gerektiğini, nitekim Orta Doğu ve Anadolu

orjinli ırkların incelenen diğer ırklar içerisinde en yüksek çeşitliliğe sahip olduklarını bildirmektedirler. Eşleştirilmiş farklılıklar ortalamasını; Orta Doğu ırklarında 3,97, Anadolu ırklarında 3,49, Afrika'da 2,09 ve Avrupa ırkları için ise Orta Avrupa'da 1,92, Britanya'da 2,68 ve Batı Avrupa'da 1,47 olarak bulunmuştur.

Bruford *et al.* (2003), sığır, koyun, keçi, manda ve domuz türlerinin evcilleştirilme tarihleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında öncelikli kullanılacak markerların mikrosatellitler ve mtDNA baz dizisi gibi bilgilerin olması gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Kim *et al.* (2003), 4 Cheju Black, 4 Cheju Yellow, 4 Korean Yellow ve 2 American Brahman sığıra ait 15738-463 bazları arası 1064 bç'lik D-loop dizisi üzerinde sadece 1'i transversiyon olan 17 bölgede yer değişimi ve 5'i insersiyon/delesyon olmak üzere 22 farklı pozisyonda mutasyon belirlemişlerdir. Çalışmalarında NCBI'da verilen 31 Japan Black, 45'i Avrupa ve 8'i Afrika sığırı, 6 Hint Zebu'su ve 5 Amerikan Bizon'una ait dizilerin kullanıldığı filogenetik çalışmada mevcut ırk gruplarının yeri tespit edilmiştir.

7 Kolombiya yerli sığır ırkına ait 110 bireyde 15969-16324 bazları arası yaklaşık 350 bç'lik D-loop dizisi üzerinde yapılan bir çalışmada 30 transisyon ve 3 transversiyon'dan oluşan 33 polimorfik bölgenin oluşturduğu 29 haplotip tespit edildiği bildirilmiştir. Filogenetik analiz sonucu ırkların Eşleştirilmiş Farklılıklar ortalamasının (Mean Number of Pairwise Differences=k) 1,99'dan 4,70'e kadar değiştiği bildirilmektedir (Carvajal-Carmona *et al.* 2003)

Mannen *et al.* (2003), 8 Japon yerli sığırı üzerinde tüm mtDNA dizilimini inceleyerek gerçekleştirdikleri çalışmalarında, D-loop bölgesinde 13, geri kalan kısımda toplam 14 substitisyon tespit ederlerken, oluşan haplotipler arasındaki ortalama dizi değişkenliğini D-loop bölgesinde %0,47, gen kodlama bölgelerinde ise %0,032 bildirmişlerdir. Tespit edilen substitisyonlar ile karkas ağırlığı, longissimus dorsi kas alanı, deri altı yağ kalınlığı, yenilebilir et ve et marbling skoru gibi altı karkas özelliğini ilişkilendirdikleri

çalışmalarında, longissimus dorsi kas alanı ve et marbling skoru ile 2232. bç'i mutasyonu arasında istatistiki önemlilik tespit ederlerken, bu mutasyonun et kalitesi üzerine etkili olduğu, incelenen diğer bölgeler ile karkas özellikleri arasında ise önemli bir ilişki bulunamadığını bildirmektedirler.

Arjantin ve Bolivya'da yetiştirilen 5 Creole sığır populasyonundan alınan 36 örnek üzerinde D-loop bölgesine ait 489 bç'in incelendiği bir çalışmada, dizilim üzerinde 30 transisyon, 4 transversiyon ve 1-2 insersiyon'dan oluşan toplam 35 polimorfik pozisyonun etkili olduğu 23 haplotip tespit edilirken, ortalama nükleotid çeşitliliği 0,058 ve eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması 2,61 olarak bildirilmektedir (Mirol *et al.* 2003).

Tsuji *et al.* (2004), *RsaI* restriksiyon enzimiyle Japonya'da mevcut Holstein ve yerli 588 sığırı kullandıkları çalışmalarında tespit ettikleri 3 haplotip ile verim özellikleri arasında herhangi ilişki belirleyememişlerdir. Avrupa Holstein ırkı görünüşüne sahip Japon Holstein sığırlarında tespit edilen farklı bir mitokondriyal haplotipin oluşmasında 120 yıllık seleksiyonun etkin rol oynayabileceğini bildirmektedirler.

Nepal'de Lulu yerli sığırlarına ait mtDNA D-loop bölgesi üzerinde yapılan PCR-RFLP çalışmasında, *HindIII, BglII* ve *HpaI* enzimlerinin 3 haplotip oluşturduğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada D-loop bölgesi DNA dizilim sonuçlarıyla da Lulu sığırlarının 3 farklı gruba ayrılarak PCR-RFLP sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği ve bulunan mtDNA tiplerinin vücut büyüklüğü bakımından önemli farklılıklar oluşturduğu belirtilmektedir (Takeda *et al.* 2004).

136 Bos taurus ve 71'i Bos indicus'dan olmak üzere 207 Çin sığırına ait D-loop bölge dizisinin incelendiği bir çalışmada, Bos taurus'larda 77 substitisyon ile 81 haplotip, çeşitli ülkelerden 76 bireyinde dahil edildiği Bos indicus'larda ise 53 substitisyon ile 50 haplotip bildirilmiştir (Lai *et al.* 2005).

Henkes *et al.* (2005), Bos primigenius taurus ve Bos Primigenius indicus melezi Brangus-Ibage et sığırları ile Nelore ırkı sığırlara ait 15964-16240. bazları arası 277 bç'lik D-loop bölge dizisi üzerinde yaptıkları çalışmalarında, Brangus-Ibage'de 16 polimorfik bölge ile 18, Nelore ırkında 25 polimorfik bölge ile 3 haplotip belirlemişlerdir. Brangus-Ibage'de haplotip çeşitliliği 0,851, nükleotid çeşitliliği 0,009, ve eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması'nı 1,91, Nelore ırkında ise aynı değerler sırasıyla; 1,00, 0,014, 4,00 olarak bildirilmektedir. Brangus-Ibage'de 57, Neleore'de 66 mutasyon tespit edilirken, referans (Anderson *et al.* 1982) ile Brangus-Ibage ve Nelore arasındaki dizi benzerliği değerleri sırasıyla %99,6 ve %92,1 olarak bildirilmiştir.

Almanya'da mevcut 15 Dahomey sığırında 323 bç'lik D-loop bölgesi dizi analizi çalışmasında, 6 polimorfik bölge tespit edilmiş ve incelenen çeşitli ırklar arasından Afrika sığır ırklarıyla aynı grupta yer aldığı filogenetik analizler sonucu ortaya konmuştur (Pfeiffer *et al.* 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nden 10 ve Çankırı ili Ilgaz ilçesi dağ köylerinden 14 olmak üzere toplam 24 adet "Yerli Kara", Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden 16 "Doğu Anadolu Kırmızısı", Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü Ceylanpınar Tarım İşletmesinden 10, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden 16 ve Adıyaman ili Gölbaşı ilçesine bağlı köylerden 8 olmak üzere toplam 32 "Güney Anadolu Kırmızısı" ve Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden 23 "Bozırk" sığır olmak üzere toplam 95 yerli hayvan araştırmanın materyalini oluşturmuşlardır. Kayıtlı sürülerde bireylerin, soy kütükleri izlenerek birbirleriyle akraba olmayan hatlardan oluşturulmasına özen gösterilmiş ve bu hayvanların kanı araştırma için kullanılmıştır.

Çalışma 2003-2005 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi ile Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Genetik Laboratuarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma esnasında aşağıda belirtilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır;

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)
Çekerocak (Elder, TÜRKİYE)
Derin Dondurucu (Nuaire, U.S.A, -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK)
Elektroforez Sistemi (Biogen, Apelex, FRANCE, SN 280800)
Hassas Terazi (Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42-90908239)
İnkübatör (Nüve, TÜRKİYE, ES 500, SN 03-0591)

Jel Görüntüleme Sistemi (Uvitec, Biolab, EEC, SN M01-2467)
Kar Makinesi (Angelontonia, ITALIA, SN 25183/00)
Magnetik Karıştırıcı (Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083)
Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE, MD 592)
Otoklav (Hırayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)
Otomatik Termocycle Sistem (Eppendorf, GERMANY, SN 5331-01846)
pH Metre (Hana, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202)
Saf Su Cihazı (Ateks, 7x35, Eu)
Santrifüj (Eppendorf, GERMANY, 5414 D, SN 5425-40112)
Spektrofotometre (Shimadzu, JAPAN, UV 1201, SN A1080)
Sterilizatör (Nüve, TÜRKİYE, FN 500, SN 303-3051)
Vorteks (YellowLine TTS2, USA)

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

0,1 N'lik NaOH Çözeltisi:
0,4 g NaOH 100 ml distile su ile çözülür ve oda ısısında saklanır.

%12 lik DTAB:
12 g DTAB, 45 ml 5M NaCl ve 15 ml 1M Tris-HCl içerisinde çözülür. Hacim distile su ile 100 ml'ye ayarlanır. Otoklav yapılır. Daha sonra 15 ml 0,5M EDTA eklenerek, oda ısısında saklanır.

%5 lik CTAB:
5 g CTAB 80 ml distile suda çözülür. 8 ml 5 M NaCl buna ilave edilir. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5 M NaCl Çözeltisi:
29,22 g NaCl 80 ml distile suda çözülür. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak Otoklav yapılır.

1.2 M NaCl Çözeltisi:

5 M NaCl'den 24 ml alınıp 100 ml ditile su ile tamamlanır.

1 M TRİS HCl:

12,1 g TrisBase 80ml distile suda çözülür. pH'sı 8,3-8,6'ya ayarlanır. 100 ml'ye distile su ile tamamlanıp otoklav yapılır.

0.5 M EDTA:

18,61 g EDTA 80 ml distile suda çözülür. Yaklaşık 2 g NaOH peleti eklenir (pH ayarı için) ve manyetik karıştırıcıda çözülür. pH'sı NaOH ile 8'e ayarlanır. Distile suyla 100 ml'ye tamamlanarak otoklav yapılır.

10 X TBE:

108 g TrisBase ve 55 g Borik asit 700 ml distile suda çözülür. Bu çözeltiye 40 ml 0,5 M EDTA (pH=5,8) eklenir. Hacim distile suyla 1 lt'ye tamamlanır. Plastik şişede saklanması önerilir.

1 X TBE:

10X TBE'den 100 ml alarak distile suyla 1,0 litreye tamamlanır.

%1 Ethidium Bromide (EtBr):

1 mg Ethidium Bromide 100 ml distile suda çözülür. Işık geçirmeyen renkli şişede aliminyum folyo ile iyice sarılarak saklanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvanlardan Kan Alımı

Kan örneklerini almak için özel 10 ml'lik K_3 EDTA (Etilen Diamin Tetra-Asetik Asit)'lı vakumlu tüpler kullanıldı. Kan alma işleminde sterilizasyona azami derecede dikkat edildi. Hayvanların boynunun sol tarafında bulunan "Venae Jugularis Externa" toplar damarından kan alındı (Doğru 1994). Kan alınan tüpler alt-üst ettirilerek kanın EDTA ile iyice karışması sağlandı ve her bir tüp laboratuara gelene kadar buz kaplarında muhafaza edildi. Tüplerin birbiri ile karıştırılmaması için hayvanın numarası ve ırkı ait olduğu tüp üzerindeki etikete kaydedildi. Kan almada kullanılan iğnelerin her örnek için özel olması sağlandı.

3.2.2. Genomik DNA'nın Tüm Kandan Eldesi

Genomik DNA'nın tüm kandan eldesi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuarı'nda uygulanan yönteme göre aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapıldı;

1- Her örnek için 2 set tüp hazırlandı. Tüplerin üzerine etiketle numara verildi.
2- Kan dolu tüp oda sıcaklığında yaklaşık bir saat dinlendirilerek lenfosit halkası oluşturuldu.
3- Pasteur pipetiyle dikkatlice lenfosit halkasından 400 µl alınarak birinci tüpe kondu.
4- Üzerine 400 µl DTAB solusyonu eklendi ve iyice karıştırıldı.
5- 68 ^{o}C'de etüvde 5 dk. inkübe edildi.
6- İkinci tüpe 100 µl CTAB solusyonu ve 900 µl dH_2O kondu.
7- Etüvden çıkan 1. tüpe 800 µl kloroform çekerocak ortamında eklendi.
8- Karışım vortekslenerek homojen hale getirildikten sonra 10 000 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi.

9- Santrifüjden sonra tüpün üzerinde kalan süpernatant 2. tüpe alınarak iyice çalkalandı. (DNA bu aşamada çıplak gözle görülebildi).

10- DNA'lı tüp 10 000 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.

11- Dipte kalan DNA'nın üzerine 300 µl 1.2 M NaCl çözeltisi eklendi ve vortekslendi.

12- Vorteksin ardından 750 µl %96'lık Etanol eklendi.

13- 13.000 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi.

14- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve üzerine 1000 µl %70'lik etanol eklendi.

15- 13 000 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.

16- Tüplerde kalan alkol, 140 ^{o}C'de steril edilmiş pamuklu eküvyon uçları ile dikkatlice emdirilerek uzaklaştırıldı.

17- Alkolden arındırılan DNA'lı tüpün içine 300-500 µl ddH_2O veya TE eklendi ve DNA'nın çözünmesi sağlandı.

18- Örnekler spektrofotometrik ölçüm anına kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2.2.1. Elde Edilen DNA'nın Gözlenmesi

Elde edilen DNA'lar %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı. Bunun için 0,24 g agaroz, 30 ml 1XTBE tamponu içerisine konularak mikrodalga fırın içerisinde 500 Watt'da 2 dakika tutularak eritildi. Daha sonra eriyik içerisine 6 µl EtBr ilave edildi. Biraz soğutulan karışım daha sonra hazırlanan taraklı jel kabinine hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatlice dökülerek polimerizasyon için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilmeye alındı. Tarağı alınan jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi, kuyucuklarına 2 µl jel yükleme buffer ile 5 µl DNA karışımı otomatik pipetler aracılığı ile dikkatlice yüklenerek 110 volt'ta 15 dakika süreyle yürütüldü. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı ultraviyole (UV) ışığı ile gözlemlendi.

3.2.2.2. Elde Edilen DNA'ların Spektrofotometrik Kantitatif Tayini

Nükleik asitlerin ihtiva ettikleri bütün pürin ve pirimidin bazlarının 260-280 nm'de UV ışığı kuvvetle absorblamalarından dolayı, kantitatif analizleri spektrofotometrik yöntemle yapılabilmektedir. Proteinler de bünyesindeki aromatik amino asitlerden dolayı 280 nm'de UV ışığı absorblamaktadırlar. Saf proteinlerde A_{260}/A_{280}=0,57 iken, bu oran saf DNA'da 1,8 ve saf RNA'da 2,0'dır. Çift zincirli DNA için 260 nm'de ekstinksiyon katsayısı (1 cm'lik ışık yolu için %1'lik çözeltinin ekstinksiyon katsayısı, $a^{\%1}$) 200 iken, tek zincirli DNA ve RNA için bu değer 250'dir. Bu sebeple saflaştırılmış DNA miktarı direkt olarak 260 nm'de absorbsiyon ölçümü kullanılarak ve seyreltme faktörü de dikkate alınarak tüp içindeki DNA konsantrasyonu (DNA Konsantrasyonu (ug/ml)= A_{260} x Seyreltme Faktörü x 50) hesaplanabilmektedir (Küfrevioğlu vd. 2000). Bu aşamada DNA konsantrasyonu düşük bulunan örneklerde, istenilen değer yakalanana kadar kan örneklerinden DNA elde etme işlemleri tekrarlandı.

3.2.3. PCR İşlemi

PCR, bir çok moleküler tekniğin laboratuvar işlemlerinin en önemli aşamasını oluşturduğundan, öncelikle PCR sırasında kullanılan malzemelerin sahip olduğu özellikler ve PCR şartları bilinmelidir. Çünkü bu aşamada meydana gelebilecek küçük bir hata veya dengesizlik sonrasında uygulanacak diğer tekniklerin hatalı sonuç vermesine ya da uygulanamamasına sebebiyet verecektir. Bu nedenle kullanılacak malzemeler çok dikkatli seçilmeli ve doğru sonucu verecek mükemmel PCR şartları oluşturulmalıdır.

Şahin vd (2000), PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli madde ve içerikleri ile PCR şartlarının aşağıda belirtilen şekilde olmaları gerektiğini bildirmektedirler.

Primerler (oligonükleotidler): Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmalıdır. Derişimleri 0,1-0,5 mM arasında değişebilir. Bundan daha büyük derişimlere sahip primerlerin kullanılması hatalı dizilimlere sebep olabilir ve ayrıca kalıntıyı artırır. Tipik primerler yaklaşık %50 G+C bileşimine sahip 18-28 baz uzunluğundadır.

dNTP: Stok deoksiribonükletidler (dNTP= dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) nötral değilse pH 7'de nötralize edilmelidir ve -20 ^{o}C'de saklanmalıdır. dNTP'lerin dördü de aynı derişimde kullanılmalıdır ve önerilen derişim 1,0 mM'dır.

Kalıp DNA: Saflaştırılan DNA, amplifiye edilecek DNA parçalarına kalıp görevi yapar. Bu kalıp DNA için A_{260}/A_{280} oranının 1,5'den yüksek olması istenir.

Taq DNA Polimeraz: *Thernus aquaticus*'dan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Değişik türleri vardır. Enzim 5′→ 3′ ekzonükleaz aktivitesine sahiptir, 3′→ 5′ ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Önerilen miktar; 100 µl'lik bir hacim için 1-5 ünitedir. Bununla beraber amplifikasyon bölgesine göre bu miktar değişebilir. Yüksek konsantarasyonlarda enzim kullanımı spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına, düşük konsantrasyonda ise yetersiz ürün oluşumuna sebep olabilir.

Mg^{+2} Derişimi: Mg^{+2} derişimi, primer yapışmasına, hem kalıp hemde PCR ürününün ayrışma ısılarını, ürünün spesifikliğini, primer-dimer kalıntılarının oluşumunu ve enzimin aktivitesini etkiler. Mg^{+2} derişimi dNTP derişiminden fazla olmalıdır. Önerilen derişim 0,5-2,5 mM'dır.

PCR tamponu: PCR için uygun tampon 10-50 mM arasında değişen Tris-HCl'dir. Tamponun pH'sı ise 8,3-8,8 arasında değişir. Bu tampona 50 mM kadar KCl çözeltisi eklenmesi primer yapışmasını kolaylaştırır. Ancak 50 mM'ın üzerindeki KCl ve NaCl çözeltilerinin eklenmesi Taq DNA Polimeraz aktivitesini düşürür. %10 ve daha az derişimdeki Dimetilsülfoksit (DMSO) derişimi de yararlıdır. Jelatin, bovin serum

albümin (BSA), Tween-20 ve Laureth-12 gibi iyonik olmayan maddelerin enzim kararlığına etkisi vardır, fakat mutlak zorunlu değildir.

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü; denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzaması (amplifikasyon) şeklindeki üç basamaktan oluşmaktadır (Şahin vd 2000).

Denatürasyon: Denatürasyon çift zincirli DNA moleküllerinin sıcaklıkta açılmasıdır. Denatürasyon şartları 97 ^{o}C'de 15-30 saniyedir. G+C'ce zengin dizilerde daha yüksek ısı olabilir. Denatürasyonun tam olmaması halinde verim düşer. DNA'nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise Taq DNA Polimeraz aktivitesini düşürür. Bundan dolayı DNA denatüre edilirken dikkatli olunmalıdır. Taq DNA Polimeraz'ın yarı ömrü 92,5 ^{o}C'de yaklaşık 2 saatten fazla, 95 ^{o}C'de yaklaşık 40 dakika, 97 ^{o}C'de ise yaklaşık 5 dakika olması nedeniyle yüksek ısı gereksiz aktivite kayıplarına yol açabilir. Bundan dolayı denatürasyon için en uygun sıcaklık 96 veya 95 ^{o}C'dir.

Primer yapışması: Primer yapışması için gerekli sıcaklık (T_m) hesaplanırken, A ve T için 2 ^{o}C, G ve C için 4 ^{o}C alınır. Ancak gerçek T_m sıcaklığı bunun birkaç ^{o}C altındadır. T_m sıcaklığı 55-72 ^{o}C arasında değişir. Primerin yapışması için geçen süre ise primerin baz içeriğine bağlı olup birkaç saniye sürer. Sıcaklığın artırılması yapışmış olan primerlerin ayrışmasına neden olabilir.

Zincir uzaması: Zincir uzaması 5′→3′ yönünde olup, uzama hızı 35-100 nükleotid/saniyedir. Uzama zamanı; hedef dizinin derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. En uygun sıcaklık 72 ^{o}C'de 1 dakikadır. 1 dakikada yaklaşık 2 kb'a kadar uzama sağlanabilir.

Döngü sayısı, başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlıdır. Tek DNA sarmalı ile başlandığında en fazla 40 döngü, çok DNA sarmalı ile başlandığında ise ideal döngü sayısı 30 olmalıdır. Çok döngü, hatalara yol açarak spesifik olmayan arka plan ürünlerini oluşturmaktadır. Bunun sebebi; substrat kullanımının azalması,

enzimin kararsız hale gelmesi, son ürün inhibisyonu, spesifik olmayan ürün veya primer-dimer yapışması ve ürünün tam olarak denatüre olmamasıdır.

Çalışmada, PCR için son hacim 50 µl olacak şekilde steril 0,2 ml'lik steril ependorf tüpler hazırlanmıştır. Her PCR reaksiyonu için 1 adet negatif kontrol (template DNA içermeyen kontrol reaksiyon tüpü) ve 1 adet pozitif kontrol (daha önce standart markera göre doğru PCR ürünü veren DNA'ya sahip tüp) kullanılarak amplifikasyonun doğru olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.3.1. Primer Dizaynı

Primer seçimi için internet vasıtasıyla aşağıdaki işlemler yapılarak D-loop ve ND5 bölgeleri için uygun primerler düzenlenmiş ve seçilmiştir.

1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov web sayfası açılır. "Entrez" tuşuna basılarak "search" kısmında "nucleotide" tuşu seçilir ve daha sonra araştırılan bölge ismi girilerek "go" tuşlanır. Aranılan bölge dizisi, ilgili makalelerden taranarak bölgenin baz dizilimi elde edilir. Dah sonra "fasta" kısmı ekrana getirilip "display" tuşuna basılır ve bölgenin birbiri ardına sıralı baz dizilimi kopyalanır.

2. http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi web sayfasına girilerek kopyalanan baz dizilimi, sayfanın başındaki kutuya yapıştırılır. İstenen uzunlukta PCR ürünü baz uzunluğu ve primerin özellikleri girilerek "pick primers" tuşuna basılır. Seçilen primer ekrana gelir (Şekil 3.1).

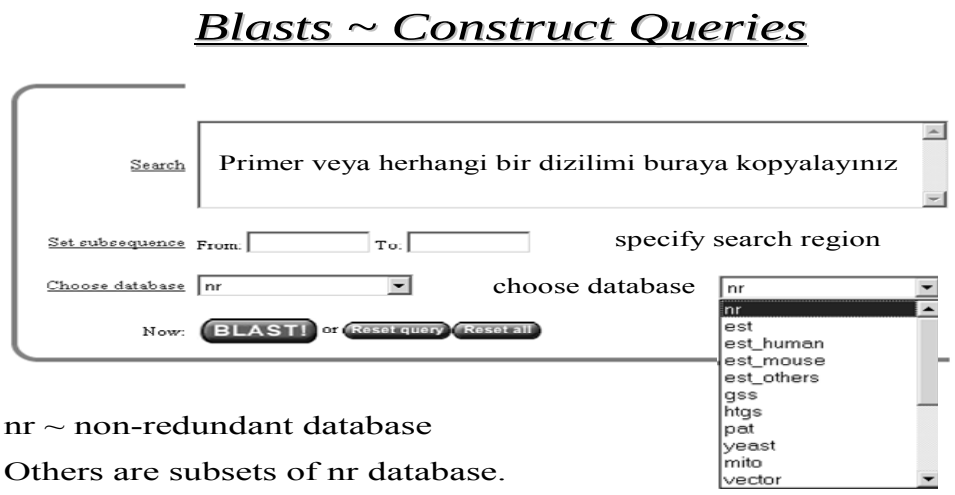
Şekil 3.1'de görüldüğü gibi en uygun primer çiftini 910 bazlık D-loop bölgesini kapsayan ve 994 baz uzunluğunda ürün verecek olan primer seti oluşturmaktadır. ND5

bölgesi için de aynı işlemler tekrar edildi ve uygun primer çifti seçildi. Daha sonra seçilen primerlerin sadece istenilen bölgeye sipesifik olup olmadığını kontrol etmek için takibeden Blast'lama işlemi yapıldı.

```
D-loop bölgesi primer seçimi
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%   any    3' seq
LEFT PRIMER          9   20   59.26   55.00  6.00  0.00 CTGCAGTCTCACCATCAACC
RIGHT PRIMER      1002   20   59.75   50.00  4.00  2.00 GTGCCTTGCTTTGGGTTAAG
SEQUENCE SIZE: 1005
INCLUDED REGION SIZE: 1005

PRODUCT SIZE: 994, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

    1 GGAAGAAACTGCAGTCTCACCATCAACCCCCAAAGCTGAAGTTCTATTTAAACTATTCCC
            >>>>>>>>>>>>>>>>>>>
   61 TGAACACTATTAATATAGTTCCATAAATACAAAGAGCCTTATCAGTATTAAATTTATCAA
  121 AAATCCCAATAACTCAACACAGAATTTGCACCCTAACCAAATATTACAAACACCACTAGC
  181 TAACATAACACGCCCATACACAGACCACAGAATGAATTACCTACGCAAGGGGTAATGTAC
  241 ATAACATTAATGTAATAAAGACATAATATGTATATAGTACATTAAATTATATGCCCCATG
  301 CATATAAGCAAGTACATGACCTCTATAGCAGTACATAATACATATAATTATTGACTGTAC
  361 ATAGTACATTATGTCAAATTCATTCTTGATAGTATATCTATTATATATTCCTTACCATTA
  421 GATCACGAGCTTAATTACCATGCCGCGTGAAACCAGCAACCCGCTAGGCAGGGATCCCTC
  481 TTCTCGCTCCGGGCCCATAAACCGTGGGGGTCGCTATCCAATGAATTTTACCAGGCATCT
  541 GGTTCTTTCTTCAGGGCCATCTCATCTAAAACGGTCCATTCTTTCCTCTTAAATAAGACA
  601 TCTCGATGGACTAATGGCTAATCAGCCCATGCTCACACATAACTGTGCTGTCATACATTT
  661 GGTATTTTTTTATTTTGGGGGATGCTTGGACTCAGCTATGGCCGTCAAAGGCCCTGACCC
  721 GGAGCATCTATTGTAGCTGGACTTAACTGCATCTTGAGCACCAGCATAATGATAAGCATG
  781 GACATTACAGTCAATGGTCACAGGACATAAATTATATTATATATCCCCCCTTCATAAAAA
  841 TTTCCCCCTTAAATATCTACCACCACTTTTAACAGACTTTTCCCTAGATACTTATTTAAA
  901 TTTTTCACGCTTTCAATACTCAATTTAGCACTCCAAACAAAGTCAATATATAAACGCAGG
  961 CCCCCCCCCCCCGTTGATGTAGCTTAACCCAAAGCAAGGCACTGA
                          <<<<<<<<<<<<<<<<<<<
KEYS (in order of precedence):
>>>>>> left primer
<<<<<< right primer
ADDITIONAL OLIGOS
                   start  len      tm     gc%   any    3' seq

 1 LEFT PRIMER          8   21   60.17   52.38  8.00  0.00 ACTGCAGTCTCACCATCAACC
   RIGHT PRIMER      1002   20   59.75   50.00  4.00  2.00 GTGCCTTGCTTTGGGTTAAG
   PRODUCT SIZE: 995, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

 2 LEFT PRIMER          9   20   59.26   55.00  6.00  0.00 CTGCAGTCTCACCATCAACC
   RIGHT PRIMER      1004   20   61.18   50.00  3.00  2.00 CAGTGCCTTGCTTTGGGTTA
   PRODUCT SIZE: 996, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

 3 LEFT PRIMER          8   21   60.17   52.38  8.00  0.00 ACTGCAGTCTCACCATCAACC
   RIGHT PRIMER      1004   20   61.18   50.00  3.00  2.00 CAGTGCCTTGCTTTGGGTTA
   PRODUCT SIZE: 997, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

 4 LEFT PRIMER          9   20   59.26   55.00  6.00  0.00 CTGCAGTCTCACCATCAACC
   RIGHT PRIMER      1003   21   60.65   47.62  4.00  2.00 AGTGCCTTGCTTTGGGTTAAG
   PRODUCT SIZE: 995, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
Statistics
         con   too    in    in          no    tm    tm  high  high        high
         sid  many   tar  excl   bad    GC   too   too   any    3'  poly   end
        ered    Ns   get   reg   GC% clamp   low  high compl compl     X  stab    ok
Left     117     0     0     0     0     0    32    54     3     0     0     5    23
Right    138     0     0     0     0     0    32    56     0     3     4     5    38
Pair Stats:
considered 11, unacceptable product size 3, ok 8
primer3 release 0.9
```

Şekil 3.1. Uygun Primer Çiftinin Seçimi

3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov web sayfası açılır ve "blast" tuşuna basılır. "nucleotide blast" içinde "Standard- nucleotide-nucleotide-BLAST (blastn)" tuşuna basılır. Seçilen primer kutu içine yapıştırılır. "chooise database" kısmına nr (nonredundant/genel) tuşu seçilir. Bu bütün canlı organizmalar için seçilmiş anlamındadır. Önce "BLAST" tuşuna, daha sonra da "format" tuşuna basılır (Şekil 3.2). Açılan sayfada homolojilerin olup olmadığı incelenir. Eğer homoloji varsa programın verdiği primere yakın bölgeden yeniden seçim yapılarak, blastlama ile homolojinin olup olmadığı anlaşılır. Yapılan bu işlemler sonucunda D-loop ve ND5 bölgeleri için seçilen primer çiftlerinin başka homolojileri olmadığından rahat bir şekilde kullanılabileceği kanaatine varıldı.



Şekil 3.2. Blastlama İşlemi

Primer seçiminde 3-4 veya daha fazla nükleotidin peşpeşe sıralanması nonspesifik bağlanmaya yol açabileceğinden bundan kaçınmak gerekir.

4. Seçilen primerlerın siparişi;

Kontrol (D-loop) Bölgesi Primerleri;

Primer F1: 5′-CTGCAGTCTCACCATCAACC-3′
Primer R1: 5′-GTGCCTTGCTTTGGGTTAAG-3′

Bu primerler, mitokondriyal DNA üzerinde 15737-16338 ve 1-394 pozisyonları arası 994 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedirler. Bu tüm 910 bç'lik kontrol bölgesi yanında baştaki 54 baz çifti ile sondaki 30 baz çifti yan bölge dizilerini kapsamaktadır.

ND5 (Korunmuş) Bölgesi Primerleri;

Primer F2: 5′-ATG ATG ATA CGG ACG AGC A-3′
Primer R2: 5′-AAC TTG AAG GCG TTT GAG G-3′

Bu primerler, mitokondriyal DNA üzerinde 12111-13931. baz dizileri arasında 1820 baz dizisine sahip ND5 bölgesi içerisinde 12575 ve 13675. baz dizileri arası 1100 bç'lik bir PCR ürünü üretmektedir.

Seçilen primer çiftleri ticari bir firmaya (Sigma) ısmarlanarak PCR amplifikasyonu için kullanılabilir hale getirildi.

3.2.3.2. PCR Amplifikasyonu

D-loop ve ND5 bölgesi amplifikasyonları aynı şartlar altında uygulanmıştır. 50 µl'lik reaksiyon için; her bir primer'dan 2 µl, her bir dNTP'den 2 µl, 2,5 Ü Taq DNA Polimeraz, yaklaşık 500 ng template DNA, 5 µl 10x PCR Buffer, 3 µl $MgCl_2$ ve 50 µl'yi tamamlayacak kadar ddH_2O eklenmiştir. Tüpün üzeri son olarak 15 µl mineral oil ile kaplanmıştır.

Her iki bölgenin PCR amplifikasyonu aşağıda belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiştir;

1	95 ^{o}C→ 5 dk →	1 döngü
2	95 ^{o}C→ 45 sn →	30 döngü
	56 ^{o}C→ 45 sn →	
	72 ^{o}C→ 45 sn →	
3	72 ^{o}C→ 7 dk →	1 döngü

3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Gözlenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için %1'lik agaroz jelde her bir PCR ürünü yürütülmelidir. Bunun için 30 ml'lik 1XTBE tamponu içerisinde 0,30 g agaroz, mikrodalga fırında 500 Watt'da 2 dakika eritilmiştir. İçerisine 6 µl EtBr ilave edilen eriyiğin biraz soğuması beklenmiş ve hazırlanan taraklı jel kabinine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülerek oda sıcaklığında 8-10 dakika polimerize olmaya bırakılmıştır. Tarakları çıkartılarak jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirilmiş ve kuyucuklara 7 µl PCR ürünü ve 2 µl jel yükleme tamponu otomatik pipetler aracılığı ile yüklenerek 80 Volt'da 15 dakika yürütülmüştür. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı UV ışığı ile gözlenmiştir. Amplifikasyonu gerçekleşen ürünlerin bir sonraki işleme kadar -20 ^{o}C'de muhafazası sağlanmıştır. Amplifikasyonu gerçekleşmeyen örnekler için PCR işlemi gerçekleşinceye kadar tekrar edilmiştir.

3.2.4. Restriksiyon Kesim Haritasının Oluşturulması

Dizilim üzerinde mevcut RE kesim yerlerinin tespiti ve hangi enzimlerin alınacağına karar verebilmek için RE'lerinin kesim haritasının çıkarılması gerekmektedir. Bunun için; Sequencher versiyon 4.5 (Gene Codes Corp.) proğramı vasıtasıyla ya da www.in-silico.com adresinden yararlanarak ilgili dizinin çeşitli restriksiyon enzim tanıma bölgelerine ait RFLP'i teorik olarak bize sunulmaktadır. Buradan elde edilen bilgiler doğrultusunda; D-loop bölgesi için: *AluI, HaeIII, HpaII, DdeI, AvaII, DraI, ApaI,*

BamHI, TaqI ve, *HindIII* enzimleri, ND5 bölgesi için; *AluI, HaeIII, BglII, SspI, DdeI, DraI, HpaII, HinfI, StuI* ve *TaqI* enzimleri seçildi ve toplam 14 enzim ilgili firmaya (Sigma) ısmarlanarak RFLP için kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.5. Restriksiyon Enzimleriyle DNA'ların Kesimi

Amplifikasyonu gerçekleşen her bir örnekten 7 µl'lik kısım 0,2 ml'lik steril ependorf tüplere konuldu, üzerine 2,5 Ü restriksiyon enzimi, 2,5 µl RE tamponu, 5 µl ddH_2O ilave edildi ve sonra üzeri 10 µl mineral oil ile kapatıldı. Daha sonra etüve yerleştirilerek *TaqI* enzimi 65 ^oC, kullanılan diğer enzimler için 37 ^oC'de 12 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.2.6. RFLP İçin Agaroz Jel'in Hazırlanması

RE'ler ile DNA'ların kesim işlemleri tamamlandıktan sonra, sonucu gözlemlemek için %1,4-1,8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 130 ml'lik 1XTBE tamponu içerisinde 2,5 g agaroz, mikrodalga fırında 500 Watt'da 4 dakika eritildi. İçerisine 26 µl %1'lik EtBr ilave edilen eriyiğin biraz soğuması beklendi ve hazırlanan taraklı jel kabinine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülerek oda sıcaklığında 8-10 dakika polimerize olmaya bırakıldı.

3.2.7. Örneklerin Jel'e Yüklenmesi ve Yürütme İşlemi

Etüvden çıkarılan restriksiyon kesimi uygulanmış örneklerin her birine 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve mineral oilden arındırılması için otomatik pipet yardımıyla parafilm üzerinde tüm ürün gezdirildi. Daha önce hazırlanmış agaroz jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi ve kuyucuklarına sırasıyla tüm

ürünlerin ayrı ayrı yüklenmeleri sağlandı. DNA fragmentlerinin boyutunu doğru olarak hesaplayabilmek için "P1473 standart DNA" marker olarak kullanıldı. P1473 markerı sırasıyla 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bazlık bantlar vermektedir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 55 Volt'ta 2 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirilen jel alınarak UV ışığı altında incelendi ve fotoğrafı alındı.

Fotoğraflanan jel üzerinde ilgili enzimin kestiği fragment uzunlukları, kesim yerlerinin beklenen ve gözlenen bant sayı ve büyüklükleri kullanılan standart marker (P1473) yardımıyla belirlendi.

3.2.8. DNA Dizi Analizi

Dizileme analizi için Bozırk, Doğu Anadolu Kırmızısı ve Yerli Kara ırklarından 4'er, Güney Anadolu Kırmızı ırkından ise 6 örnek kullanıldı. Dizileme sonuçları ticari çalışan Iontek Limited Şirketi'ne (www.iontek.com.tr) gönderilen her bir hayvana ait D-loop bölgesi PCR sonuçlarından elde edildi.

Dizileme sonuçlarının karşılaştırılmasında National Center for Biotechnology Information (NCBI)'de mevcut AB003793-98; AB065119-31; AB079300-02, 24-27, 45-48, 58-71; AB085918-26; AB117037-38; AF022916; AF034439-42, 46; AF33647438; AF336474-90; AF336576-618; AF336619-30, 37-38, 57-63; AF336711-17, 29-37, 43-44; AF016060-87; AF531383; AY378133-36, 38-42; AY521119-20, 27, 28; AY676865-73; DQ124403-14,16-18; L27720-23, 32, 33, 36, 37; U51806-09,11-15, 20, 21, 30-36; U92230; V00654 GenBank giriş numaralı bulunan yerli ve yabancı sığır ırklarının D-loop bölgesi dizilimleri kullanıldı (NCBI 2005). Burada mevcut dizilimlerden bazılarının sadece 240 bazlık dizilimleri bulunması nedeniyle hem tüm D-loop bölgesine sahip ırklarla, hemde daha fazla sığır ırkı ve sayısını kapsaması nedeniyle 240 bazlık dizilim uzunlukları ele alınarak analizler gerçekleştirildi. Tüm D-

loop bölgesi için 23 ırka ait 93, 240 bazlık kısmi dizilim için 30 ırka ait 267 hayvanın dizilimi kullanıldı.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Elde edilen Restriksiyon Endonükleaz ürünlerine ait verilere; populasyonların genetik yapısı ile ilgili değerlerinin elde edilmesinde ARLEQUİN 3.0 (Excoffier *et al*. 2005) programı kullanıldı. Elde edilen mesafe değerlerinin dendogram çizimi PHYLIP 3.41 paket programı (Felsenstein 1993)'na ekli Neighboor ile NJ (Neighboor-Joining=Komşu Birleştirme) yöntemine (Saitou and Nei 1987) göre yapıldı.

DNA dizilim sonuçlarının değerlendirilmesinde; BİOEDİT version 7.041 programı (Hall, 1999) ile dizilim düzenlendi, ClustalX 1.83 paket programı (Thompson *et al.* 1997) ile dizilim align edildi ve uç kısımlarda kalan boşluklar atılarak analize hazır hale getirildi. Populasyonların genetik yapısı ile ilgili değerler ARLEQUİN 3.0 (Excoffier *et al*. 2005) ve DNAsp 4.10 (Rozas *et al.* 2005) programları vasıtasıyla tahmin edildi, filogenetik analizi için MEGA 3.1 paket programı (Kumar *et al.* 2004) ile Kimura-2 Parametre Modeli'ne göre elde edilen değerlere NJ (Saitou and Nei 1987) metodu kullanılarak dendogramları çizildi.

Haplotip birlikte kalıtım sergileyen markerlar seti olarak tanımlanırken, Haplotip çeşitliliği (Hd) paylaşılan haplotiplerin veya dizilerin oranını ya da frekansını göstermektedir ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (Nei and Tajima, 1981);

$Hd = (1 - \Sigma xi^{2}) \, n / (n - 1),$

n:örnek büyüklüğü ve

x_i: haplotip frekansını göstermektedir.

Nükleotid çeşitliliği ($\hat{\pi}$n) populasyon içerisinde pozisyon başına düşen nükleotid farklılıklarının veya diziler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalaması olup genetik varyasyonun ölçüsü olarak gösterilmektedir (Tajima 1983; Nei 1987).

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^{h}\sum_{j=1}^{h'} x_i x_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

x_i ve x_j: sırasıyla i.ve j. haplotip frekansları

$\hat{d}_{ij}$:i. ve j. haplotipler arasında gözlenen farklılık sayısı

h ve h': haplotip sayıları

L: toplam baz dizisi uzunluğu.

Populasyonlar içerisinde hesaplanan varyasyonun ölçüsü olarak eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması (k) hesaplanmaktadır ve alt populasyonlar içerisindeki genetik farklılığın ölçüsü olarak gösterilmektedir. Ayrıca alt populasyonlar arasındaki eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması olarak genetik farklılık ölçüsü (D) ve net genetik farklılık ölçüsü (D_A) hesaplanmakta ve bu değer alt populasyonlar arasında genetik mesafelerin ölçüsü olarak kullanılabilmektedir (Nei and Li 1979; Wakaley 1996). Bunun için kullanılan formüller ise;

$$k = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} x_i x_j \hat{d}_{ij} \ ,$$

Varyansı (V(k));

$$V(k) = \frac{3n(n+1)k + 2(n^2+n+3)k^2}{11(n^2-7n+6)},$$

Standart Sapması (*SD*); $SD = \sqrt{V(k)}$,

k: alt populasyon içi eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması,

n: alt populasyondaki örnek sayısı,

$\hat{d}_{ij}$: i. ve j. haplotipler arasında gözlenen farklılık sayısını göstermektedir.

$$D = \sum_{i=1}^{h} \sum_{j=1}^{h'} x_{1i} x_{2j} \delta_{ij} ,$$

D: alt populasyonlar arası eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması,

x_{1i}: 1. populasyondaki i. haplotipin frekansı,

x_{2i}: 2. populasyondaki j. haplotipin frekansı,

h ve h': sırasıyla 1. ve 2. populasyonlar için farklı haplotip sayıları,

δ_{ij} :i. ve j. haplotipler arasındaki farklılık sayısını göstermektedir.

Alt populasyonlar arası düzeltilmiş (net) eşleştirilmiş farklılıklar ortalamasının ölçüsü (D_A) ise;

$D_A = D_{12} - \frac{k_1 + k_2}{2}$ şeklinde hesaplanmaktadır.

D_{12}: 1. ve 2. populasyonlar arası eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması
k_1 ve k_2: sırasıyla 1. ve 2. populasyonlara ait eşleştirilmiş farklılıklar ortalamasıdır.

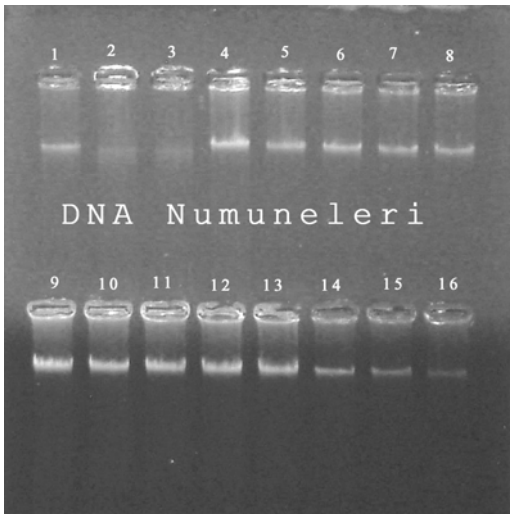
Genetik mesafelerin önemlilik testi, haplotipleri veya populasyonlar arasındaki bireyleri permütasyona tabi tutarak yapılır ve populasyonlar arasında farklılığın önemli olup olmadığı belirlenir. Bunun için permütasyon tekrar sayısı girilerek iki populasyonun birbirinden farklı olup olmadığı test edilir. Çalışmada non-parametrik permütasyon testi için tekar sayısı 1000 girilerek analizler yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA Sonuçlarının Gözlenmesi

Tüm kandan elde edilen genomik DNA örnekleri distile su ile uygun hacimde çözüldükten sonra, spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı.

Şekil 4.1'de 16 adet örnekten 4-13 yoğun, 1, 14, 15 ve 16 orta, 2 ve 3 zayıf DNA konsantrasyonu ile görülmektedir.



Şekil 4.1. Tüm Kandan Elde Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel'de Görünümü (Yürüme yukarıdan aşağıya doğrudur)

4.2. Genomik DNA'dan D-Loop ve ND5 Bölgelerinin PCR ile Amplifikasyonu

Her bir örnekten elde edilen genomik DNA kullanılarak, mtDNA'nın incelenen bölgeleri ayrı ayrı PCR işlemiyle amplifiye edildi ve sonuçlar %1'lik agaroz jelde gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. mtDNA D-loop ve ND5 Bölgeleri PCR Sonuçları (7 no'lu (M) örnek standart marker)

Spektrofotometrik ölçüm sonucu 0,8'lik konsantrasyondan daha düşük seviyede elde edilmiş genomik DNA örneklerinde de mtDNA PCR sonuçlarının gerçekleştiği görüldü. Bununla beraber genomik DNA konsantrasyonu yüksek olan örneklerde daha yüksek konsantrasyonda mtDNA bulunduğu PCR sonuçlarından açık bir şekilde ortaya çıktı.

4.3. PCR-RFLP Sonuçları

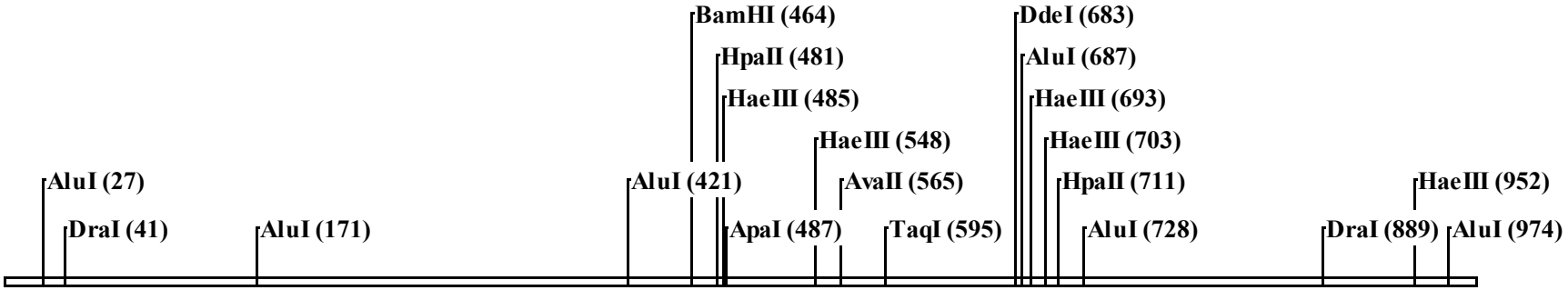
4.3.1. Değişken (Displacement =D-loop) Bölge RE Kesim Haritası

mtDNA'nın toplam 16338 bç'lik dizisi içerisinde yer alan D-loop bölgesi 15792-363 baz aralığını kapsayan 910 bç'lik bir bölge olarak tanımlanmaktadır ve bu bölge 15737-393 bç dizileri arası 994 bazlık PCR ürününün içerisinde kalmaktadır (Şekil 1.2, 3.2).

Çalışmada D-loop bölgesi kesim haritası *AluI, HaeIII, HpaII, DdeI, AvaII, BamHI, DraI, ApaI, HindIII* ve *TaqI* enzimleri ile incelendi. D-loop bölgesinde kullanılan enzimlerin dizi üzerinde tanıma bölgeleri, kesim yeri numaraları ve oluşturdukları parça uzunlukları Çizelge 4.1'de ve bu enzimlerin linear olarak dizi üzerindeki kesim yerleri Şekil 4.3'de görülmektedir. *AluI* enziminin kesim yeri olan 27. ve 975.bç'i ve *DraI* enziminin 41. bç yeri D-loop bölgesi dışında kalırken, *Hind III* enziminin dizi üzerinde beklenen bir kesim yeri bulunmamaktadır.

Çizelge 4.1. D-loop Bölgesine Uygulanan Enzimler, Dizi Tanıma Bölgeleri ve Beklenen Parça Uzunlukları.

	RE	Tanıma Bölgesi (5′→3′)	Dizideki Kesim Yerleri (1→994 bç)	Fragment Büyüklüğü (bç)
1	*AluI*	AG▼CT	27-171-421-687-728-974	266-250-247-144-41-27-20
2	*HaeIII*	GG▼CC	485-548-693-703-952	485-249-145-63-42-10
3	*HpaII*	C▼CGG	481-711	481-283-230
4	*AvaII*	G▼GWCC	565	565-429
5	*DraI*	TTT▼AAA	41-889	848-105-41
6	*ApaI*	GGGCC▼C	487	507-487
7	*DdeI*	C▼TNAG	683	683-311
8	*BamHI*	G▼GATCC	464	530-464
9	*Taq I*	T▼CGA	595	595-399
10	*HindIII*	A▼AGCT T	--	--



Şekil 4.3. D-loop Bölgesi (994 bç) PCR Ürününün Restriksiyon Enzimlerine Göre Beklenen Kesim Haritası

D-loop bölgesinde 4-6 baz tanıma bölgelerine sahip 10 enzimin kullanıldığı çalışmamızda, dizi üzerinde toplam 17 tanıma bölgesiyle 74 baz çiftinin tanındığı, bununla da 910 bazlık bölge içerisinde %8'lik kısmın taranabildiği sonucuna ulaşılabilmektedir. Bölgenin yüksek mutasyon hızı dolayısıyla, dizilim üzerinde yer değişimi, delesyon ya da insersiyon gibi sebeplerle dizilim sırasının değişmesi halinde enzimlerden herhangi biri için yeni tanıma bölgesi oluşacak ya da enzim mevcut kesim yerini kaybederek farklı büyüklüklere sahip fragmentler verecektir.

Enzimlerin örneklere uygulanması sonucu gözlenen kesim tipi, tahmini bant uzunlukları ve bunların ırklara dağılımı Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Anderson *et al.* (1982)'ın tanımladığı dizi üzerinde beklenen kesim şeklinin elde edilmesi A formu olarak bilinmektedir (Çizelge 4.1). Jel üzerinde yürütme sonucunda 50 baz çifti uzunluğundan daha kısa olan fragmentler ile birbirlerine 10-15 baz çifti kadar yakın olan fragmentlerin oluşturduğu bantların sağlıklı okunabilmesi ancak standart marker ile kıyaslanmak suretiyle toplam uzunluk baz alınarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

AluI enzimi; dizimizde 27, 171, 421, 687, 728 ve 974. bazlardan kesim oluşturarak, 266, 250, 246, 144, ve 41 baz çifti uzunluğunda bantlar vermesi beklenmektedir (Çizelge 4.1). 266, 250 ve 246 bç'lik fragmentler birbirine yakın pozisyonda olduklarından jel üzerinde 250 bç civarında tek bantmış gibi görüntü vermektedir. Kesimde yaklaşık 180, 400 ve 490 bç uzunluğunda farklı ilave bantlar tespit edilmiştir. 250, 180 ve 144 bç'in birlikte görüldüğü yapı B, 490, 400, 250, 180 ve 144 bç'lerin beraber görüldükleri heteroplazmik yapı ise C formu olarak adlandırılmaktadır (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). İncelenen tüm ırklarda B ve C formları gözlenmiştir. Irkların tamamı dikkate alındığında %66 ile B formu C formundan daha yüksek oranda bulunmuştur (Çizelge 4.2).

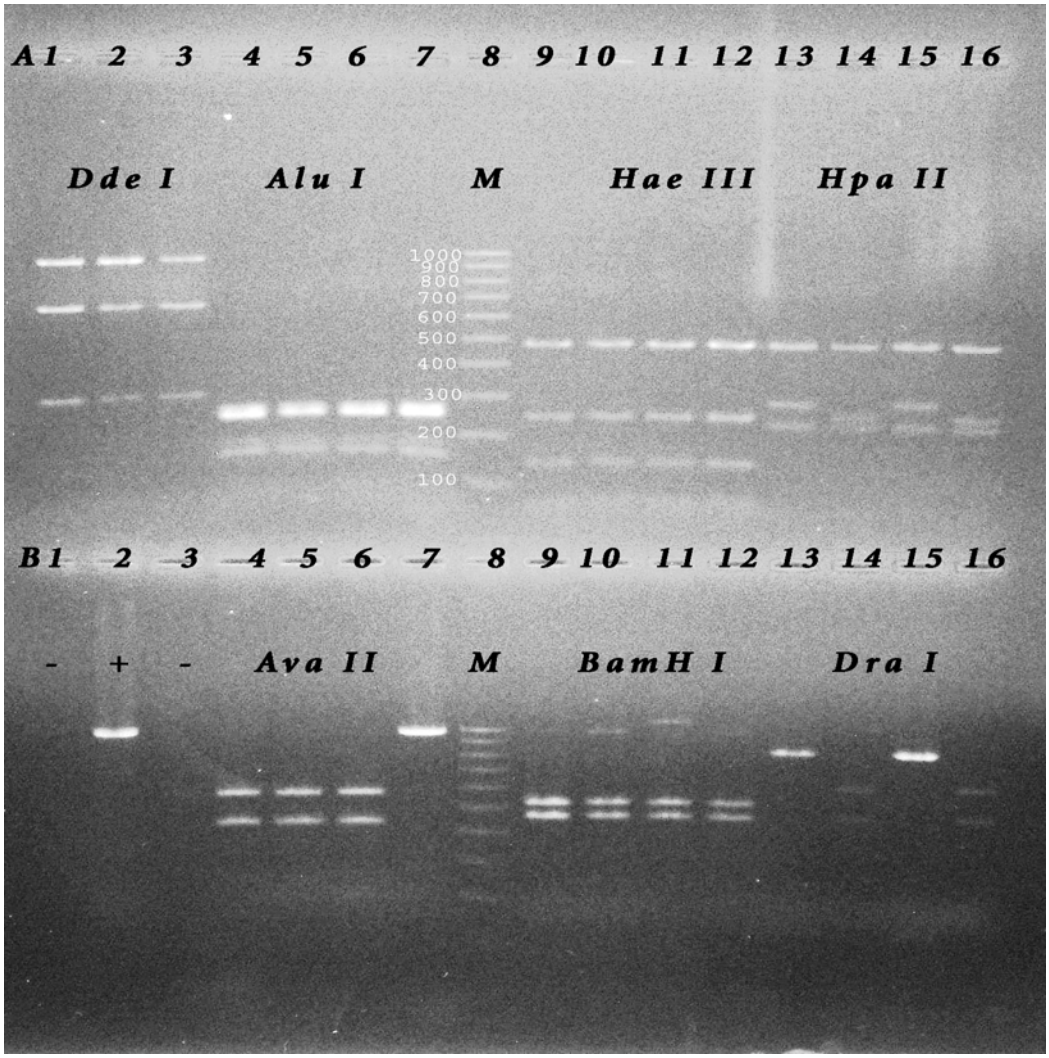
Çizelge 4.2. D-loop Bölgesi PCR-RFLP Sonuçları Üzerinde Restriksiyon Enzimlerinin Oluşturdukları Kesim Tipi, Tahmini Fragment Uzunlukları ve Irklara Dağılımı

RE	Kesim Tipi	Tahmini Fragment Uzunluğu (bç)	Boz Irk		DAK		GAK		Yerli Kara		GENEL	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
AluI	B	250-**180*-144	16	70	11	69	24	75	12	50	63	66
	C	**490-400**-250-**180**-144	7	30	5	31	8	25	12	50	32	34
HaIII	A	485-249-145-60	23	100	16	100	31	97	22	92	92	97
	B	485-**400-300**-249-145-60	-	-	-	-	1	3	1	4	2	2
	C	485-**300**-249-145-60	-	-	-	-	-	-	1	4	1	1
HpaII	A	481-283-230	22	96	16	100	29	91	17	71	84	88
	B	481-**260**-230	-	-	-	-	3	9	3	13	6	6
	C	**730**-481-283-230	-	-	-	-	-	-	3	13	3	3
	D	**510**-481-**260**-230	-	-	-	-	-	-	1	4	1	1
	E	**730**-481-**260**-230	1	4	-	-	-	-	-	-	1	1
AvaII	A	565-429	21	91	16	100	31	97	23	96	91	96
	B	**994**	2	9	-	-	-	-	-	-	2	2
	C	**994**-565-429	-	-	-	-	1	3	1	4	2	2
DraI	A	848-105	23	100	16	100	28	88	21	88	88	93
	B	**580-410**	-	-	-	-	3	9	-	-	3	3
	C	848-**580-410**-105	-	-	-	-	1	3	3	13	4	4
ApaI	A	507-487	22	96	15	94	32	100	24	100	93	98
	B	**994**	-	-	1	6	-	-	-	-	1	1
	C	**994**-507-487	1	4	-	-	-	-	-	-	1	1
DdeI	B	**994**-683-311	23	100	16	100	32	100	24	100	95	100
BamHI	A	530-464	23	100	16	100	32	100	24	100	95	100
TaqI	A	595-399	23	100	16	100	32	100	24	100	95	100
HindIII	A	994	23	100	16	100	32	100	24	100	95	100

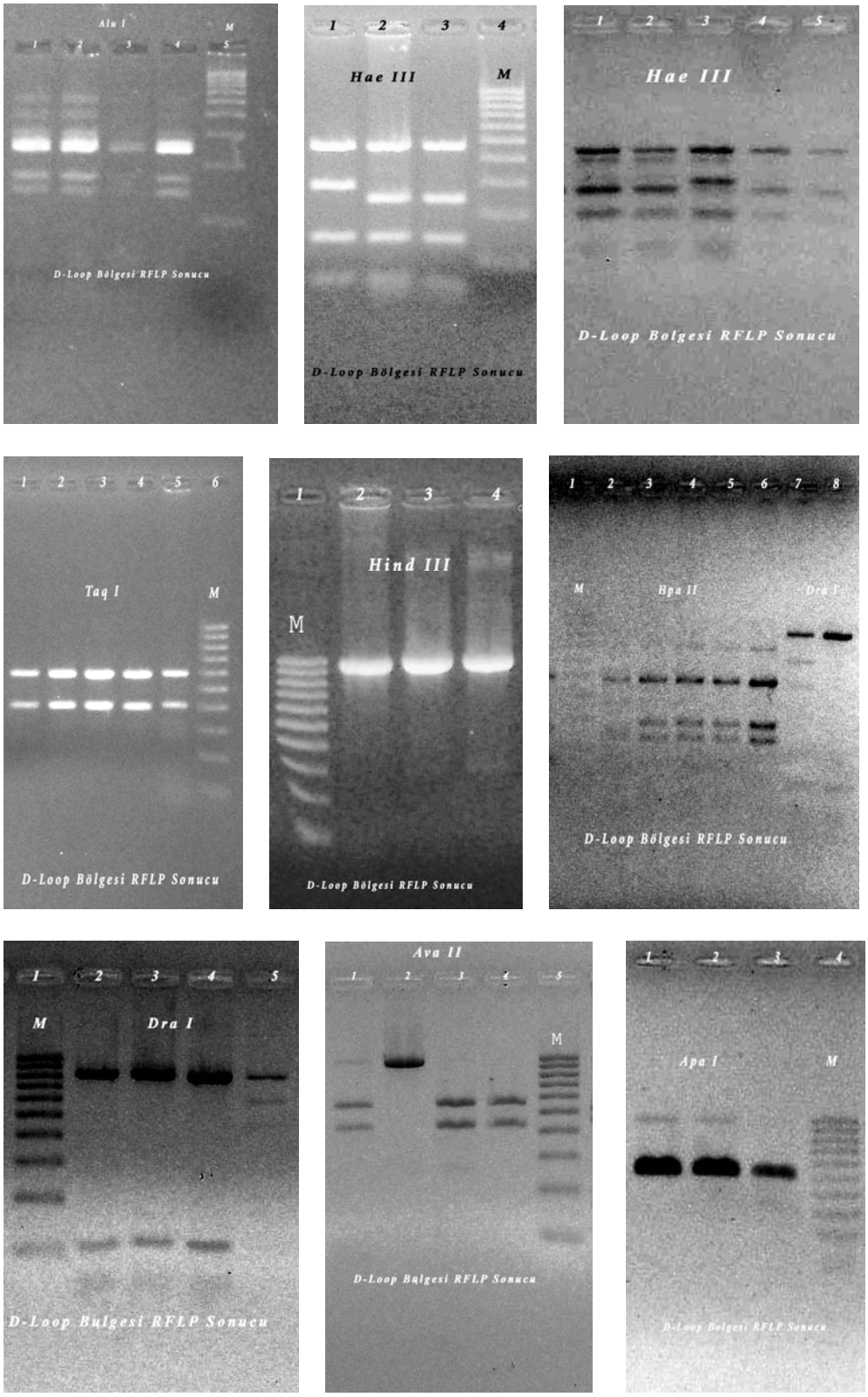
*: Koyu renkle gösterilen rakamlar, gözlenen farklı kesim parça uzunluklarını göstermektedir.



Şekil 4.4. D-Loop Bölgesi PCR-RFLP Sonuçları (7: Marker, 1,8: *AluI*, 2,9: *HaeIII,* 3,10: *HpaII*, 4,11: *AvaII*, 5,12: *DraI,* 6,13: *BamHI*)



Şekil 4.5. Çeşitli RE Enzimleri ile D-Loop Bölgesi RFLP Sonuçları



Şekil 4.6. *AluI*, *HaeIII*, *TaqI*, *HindIII*, *HpaII*, *DraI*, *AvaII* ve *ApaI* RE enzimleri D-Loop Bölgesi RFLP sonuçları (M:Marker)

HaeIII enzimi; dizi üzerinde 485, 548, 693, 703 ve 952 baz noktalarından kesim yapmasıyla 485, 249, 145, 60 ve 10 bç'lik fragmentler beklenmektedir. Jel üzerinde 485, 249, 130 ve 60 bç'lik bantlar standart A formunu, yaklaşık 485, 400, 300, 249, 145 ve 60 bç uzunluğundaki bantlar B, 485, 300, 249, 145 ve 60 uzunluğundaki bantlar ise C formunu oluşturmaktadırlar (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). *Hae III* enzimiyle GAK'larda A ve B formu, Yerli Kara populasyonunda ise A, B ve C formları tespit edilirken buna karşılık geri kalan Bozırk ve DAK ırkları tamamiyle A formundan oluşan monomorfik yapı sergilemişlerdir (Çizelge 4.2).

HpaII enzimi; dizi üzerinde 481 ve 711. bazlarından kesim meydana getirerek 481, 283, 230 bç uzunluğunda fragmentler ile A formu, 283 bazlık bantın görülmediği yaklaşık 481, 260 ve 230 bç uzunluğundaki fragmentler ile B formu, 730, 481, 283 ve 250 bç uzunluğundaki fragmentler ile C formu, 513, 481, 260 ve 230 bç uzunluğundaki fragmentler ile D formu, 730, 481, 260 ve 230 bç uzunluğundaki fragmentler ile E formu gözlenmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). DAK populasyonunda sadece A, Bozırk'da A ve E, GAK'da A ve B, Yerli Kara'da A, B, C ve D formları tespit edilmiştir. Yerli Kara'da gözlenen C ve D ile Bozırk populasyonundaki E formları heteroplazmik yapıyı oluşturmaktadırlar (Çizelge 4.2).

AvaII enzimi; dizinin 565. bazından kesim yapması sonucu 565 ve 429 bç fragment uzunluklarıyla A formu, kesim yerinin kaybı ile söz konusu olan 994 bç uzunluğunda B formu ve belirtilen her iki durumun beraber bulunmasıyla oluşan heteroplazmik yapılı C formunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.4, 4.5). Tüm ırklarda A formu yaygın olarak tespit edilirken, Bozırk populasyonunda B, GAK ve Yerli Kara populasyonlarında ise C formlarına da rastlanılmıştır (Çizelge 4.2).

DraI enzimi; 41 ve 889 nolu baz noktalarından kesim oluşturmasıyla 848 ve 105 bç uzunluğunda bantlara sahip olan standart A formu, 582 ve 412 bç uzunluğunda bantlarla B formu, ve A ve B formlarının beraber bulundukları heteroplazmik yapı sergileyen C formu gözlenmiştir (Şekil 4.4, 4.5). Bozırk ve DAK populasyonlarında sadece A formu,

Yerli Kara populasyonunda A ve C, GAK populasyonunda ise A, B ve C formları tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

ApaI enzimi; dizide tek tanıma bölgesi olan 487. noktadan kesim oluşturarak 507 ve 487 bç uzunluğunda batlarla A formu, kesim yerinin kaybıyla oluşan B formu ve her iki durumun beraber bulundukları durum ile oluşan heteroplazmik yapılı C formu oluşturulmuştur (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). GAK ve Yerli Kara populasyonları sadece A formuyla monomorfik bulunurken, DAK populasyonu A ve B formu ve Bozırk populasyonu ise A ve C formlarıyla polimorfik yapı sergilemişlerdir (Çizelge 4.2).

DdeI enzimi; dizide 683. baz noktasından kesim yaparak 683 ve 311 bç uzunluğundaki fragmentler ile standart A formunu oluşturması beklenirken, kesim bölgesinin kaybıyla tüm populasyon içerisinde B formundan oluşan monomorfik yapı görülmüştür (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). *Dde I* enzim tanıma bölgesi bakımından ırklar arasında herhangi bir farklılık görülememiştir (Çizelge 4.2).

BamHI enzimi; dizi üzerinde 464. bazdan kesim yaparak 530 ve 464 bç uzunluğundaki fragmentler ile standart A formu üretmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). Tüm populasyon genelinde herhangi bir kesim yerinin kaybı veya yeni kesim yerinin oluşması durumlarına rastlanılmamış ve A formundan oluşan monomorfik bir yapı sergilemiştir (Çizelge 4.2).

TaqI enzimi; 595. baz tanıma bölgesinden kesim yaparak 595 ve 399 bç uzunluğundaki fragmentler ile A formunu üretmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). İncelenen tüm ırklarda herhangi bir kesim yerinin kaybı veya yeni kesim yerinin oluşması söz konusu olmadığından monomorfik yapı sergilenmiştir (Çizelge 4.2).

Kesim yerine sahip olmayan *Hind III* enzimi incelenen tüm ırklarda monomorfik bir yapı göstermiştir (Şekil 4.6). İncelenen dizi üzerinde *Hind III* tanıma bölgesi kesim yerinin oluşmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Tüm populasyon genelinde PCR-RFLP ile elde edilen D-loop dizisi üzerine toplam 20 tanıma bölgesine sahip 10 enzim uygulanması sonucu 19 haplotip elde edilmiştir. Ele alınan enzimlerden *BamHI, TaqI* ve *HindIII* sadece A tipi, *DdeI* ise B tipi ile monomorfik bulunurken, geri kalan enzimler beklenenden farklı kesimler de oluşturmak suretiyle polimorfik yapı sergilemişlerdir. (Çizelge 4.2).

D-loop bölgesine uygulanan enzimlerin ırklar genelinde oluşturdukları haplotipler Çizelge 4.3'de görülmektedir. *AluI* enziminin belirleyici olduğu 1 ve 10 nolu haplotipler sırasıyla %58 ve %19 değerleriyle en yüksek oranı oluşturmuşlardır. Gözlenen diğer haplotiplere ait oranlar %1-3 aralığında değişmiştir.

Irklar içerisinde, Bozırk'da 6, DAK'da 3, GAK'da 8 ve Yerli Kara'da 9 haplotip görülmüştür. Bozırk'da 3, 7 ve 19, DAK'da 18, GAK'da 4, 5, 6, 15 ve 16 ve Yerli Kara'da 8, 9, 13, 14 ve 17 nolu görülen bu haplotipler ırka özgün genotipleri oluşturmuşlardır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. D-Loop Bölgesinde Restriksiyon Enzimlerinin Oluşturdukları Haplotipler ve Irklara Göre Dağılımı

Tip	*AluI*	*HaeIII*	*HpaII*	*DdeI*	*AvaII*	*DraI*	*ApaI*	*BamHI*	*TaqI*	*HindIII*	Boz Irk		DAK		GAK		Yerli Kara		GENEL	
											N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	14	61	11	69	20	63	10	42	55	58
2	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	-	-	-	-	1	3	-	-	1	1
3	B	A	A	B	B	A	A	A	A	A	**1***	**4**	-	-	-	-	-	-	1	1
4	B	A	A	B	A	C	A	A	A	A	-		-	-	**1**	**3**	-	-	1	1
5	B	A	B	B	A	B	A	A	A	A	-	-	-	-	**1**	**3**	-	-	1	1
6	B	A	B	B	C	B	A	A	A	A	-	-	-	-	**1**	**3**	-	-	1	1
7	B	A	E	B	A	A	A	A	A	A	**1**	**4**	-	-	-	-		-	1	1
8	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	**1**	**4**	1	1
9	B	C	A	B	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	**1**	**4**	1	1
10	C	A	A	B	A	A	A	A	A	A	5	22	4	25	6	19	3	13	18	19
11	C	A	A	B	A	C	A	A	A	A	-		-	-	-	-	2	8	2	2
12	C	A	B	B	A	A	A	A	A	A	1	4	-	-	-	-	2	8	3	3
13	C	A	C	B	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	**3**	**13**	3	3
14	C	A	D	B	A	C	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	**1**	**4**	1	1
15	C	B	A	B	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	**1**	**3**	-	-	1	1
16	C	A	A	B	B	A	A	A	A	A	-	-	-	-	**1**	**3**	-	-	1	1
17	C	A	A	B	C	A	A	A	A	A	-		-	-	-	-	**1**	**4**	1	1
18	C	A	A	B	A	A	B	A	A	A	-	-	**1**	**6**	-	-	-	-	1	1
19	C	A	A	B	A	A	C	A	A	A	**1**	**4**	-	-	-	-	-	-	1	1

*:Koyu renkle belirtilen rakamlar ırka özgün bulunan haplotipleri göstermektedir.

Tespit edilen kesim sonuçlarına ait verilerden her bir populasyon için polimorfik bölge sayısı, populasyonlar içi eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması ve standart sapmaları Çizelge 4.4'de görülmektedir.

Çizelge 4.4. Irklara Ait Polimorfik Bölge Sayısı, Eşleştirilmiş Farklılıklar Ortalaması ve Standart Sapmaları

Irk	N	S	k ± SD
Bozırk	23	9	1.73123 1.1662
DAK	16	4	1.16667 0.8873
GAK	32	12	2.29032 1.4342
Yerli Kara	24	11	2.71739 1.6665

N:Örnek sayısı,
S: Polimorfik bölge sayısı,
k: Eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması.

Irklar içerisinde kesim sonucu oluşan farklılıklar üzerinden hesaplanan varyasyon değerlerinin en düşük DAK ve en yüksek Yerli Kara populasyonunda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

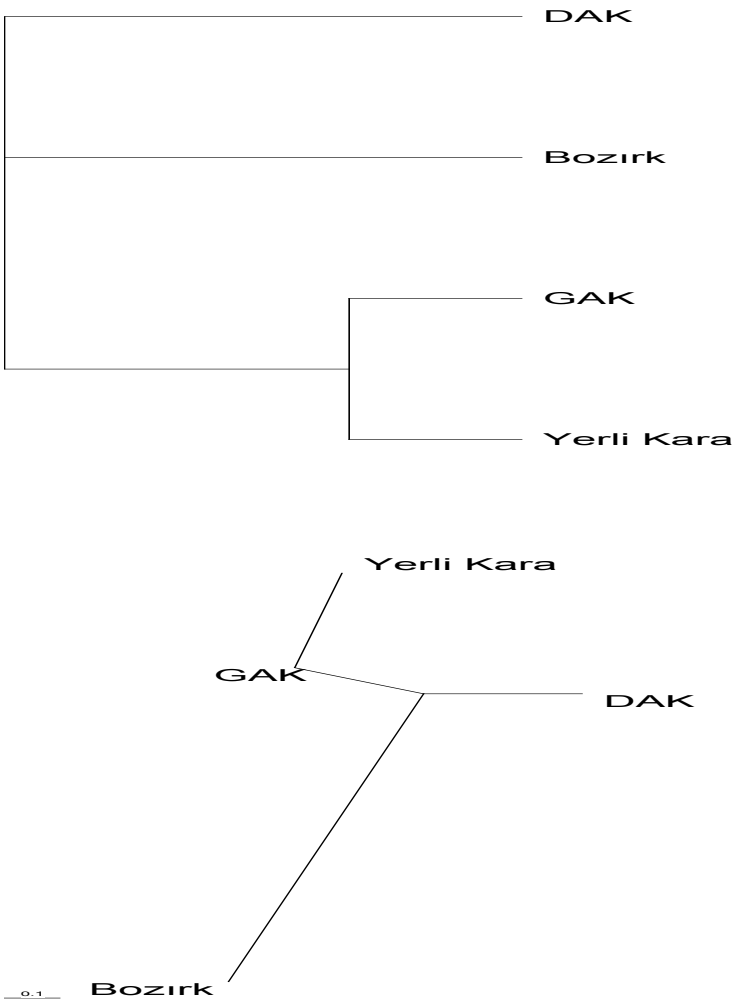
Populasyonlar içi ve populasyonlar arası Eşleştirilmiş farklılıklar ortalamasına ait matriks Çizelge 4.5'da görülmektedir. Yapılan permütasyon testi sonucunda populasyonlar arası farklılıkların önemli olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.5. k, D ve D_A Değerleri ve Önemlilik Durumları

Irklar	Boz Irk	DAK	GAK	Yerli Kara
Boz Irk	1,73123	1,40761	2,02989	2,30435
DAK	-0,04134	1,16667	1,75000	2,04167
GAK	0,01912	0,02151	2,29032	2,59375
Yerli Kara	0,08004	0,09964	0,08989	2,71739

Üst Diyagonal D, Alt Diyagonal D_A ve Diyagonal k değerlerini göstermektedir.

PCR-RFLP sonuçlarına ait D değerleri kullanılarak çizilen dendogram Şekil 4.7'de iki farklı çizim şekli ile görülmektedir.



Şekil 4.7. PCR-RFLP Sonuçlarına Ait Dendogram

GAK ve Yerli Kara populasyonları yakın kümeleri, DAK ve Bozırk populasyonları ise uzak kümeleri teşkil etmişlerdir (Şekil 4.7).

4.3.2. Korunmuş (Constant) ND5 Bölge RE Kesim Haritası

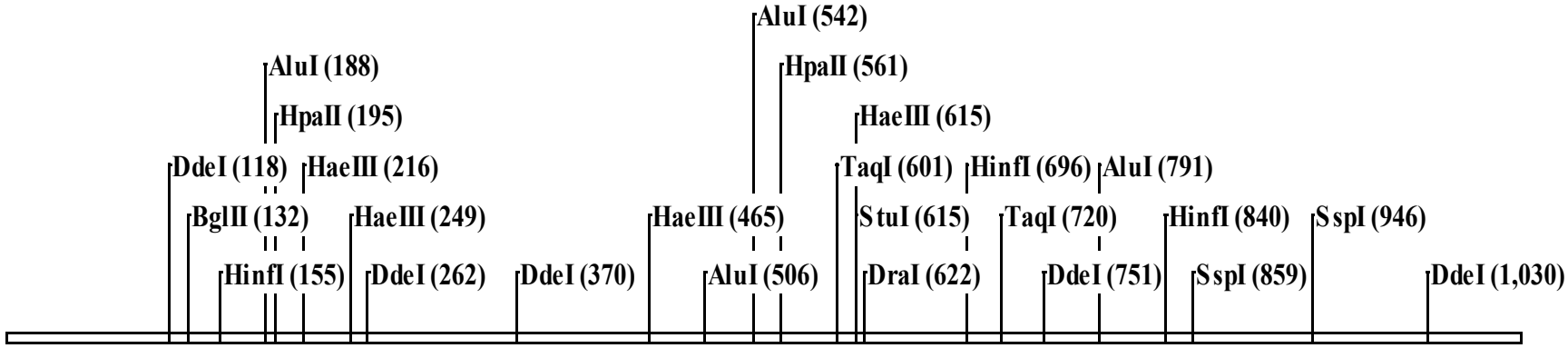
mtDNA'nın toplam 16338 bç'lik dizisi içerisinde 12111-13931. baz pozisyonları arasında 1820 baz dizisine sahip ND5 bölgesi içerisinde 12575 ve 13675. baz pozisyonları arası 1100 bç'lik bir bölge incelemeye alınmıştır. Belirtilen ND5 bölgesi restriksiyon kesim haritası *AluI, HaeIII, BglII, SspI, DdeI, DraI, HpaII, HinfI, StuI* ve

TaqI enzimleri ile çıkartılmıştır. ND5 bölgesinde kullanılan enzimlerin dizi üzerinde tanıma bölgeleri, kesim yeri numaraları ve oluşturdukları parça uzunlukları Çizelge 4.6'da ve bu enzimlerin linear olarak dizi üzerindeki kesim yerleri Şekil 4.8'de görülmektedir.

ND5 bölgesinde 4-6 baz tanıma bölgelerine sahip 10 enzimin kullanıldığı çalışmamızda, dizi üzerinde toplam 25 tanıma bölgesiyle 110 baz çiftinin tanındığı, bununla da 1100 bazlık bölge içerisinde %10'luk kısmın taranabildiği sonucuna ulaşılabilmektedir.

Çizelge 4.6. ND5 Bölgesinde Kullanılan Enzimler Tanıma Bölgeleri ve Beklenen Parça Uzunlukları

	RE	Tanıma Bölgesi (5′→3′)	Dizideki Kesim yerleri (1→1100bç)	Fragment büyüklüğü (bç) (1100bç)
1	*AluI*	AG▼CT	188-506-542-791	318-309-249-188-36
2	*HaeIII*	GG▼CC	216-249-465-615	485-216-216-150-33
3	*BglII*	A▼GATCT	132	968-132
4	*SspI*	AAT▼ATT	859-946	859-154-87
5	*DdeI*	C▼TNAG	118-262-370-751-1030	381-279-144-118-108-70
6	*DraI*	TTT▼AAA	622	622-478
7	*HpaII*	C▼CGG	195-561	539-366-195
8	*HinfI*	G▼ANTC	155-696-840	541-260-155-144
9	*StuI*	AGG▼CCT	615	615-485
10	*TaqI*	T▼CGA	601-720	601-380-119



Şekil 4.8. ND5 Bölgesi (1100 bç) PCR Ürününün Restriksiyon Enzimlerine Göre Beklenen Kesim Haritası

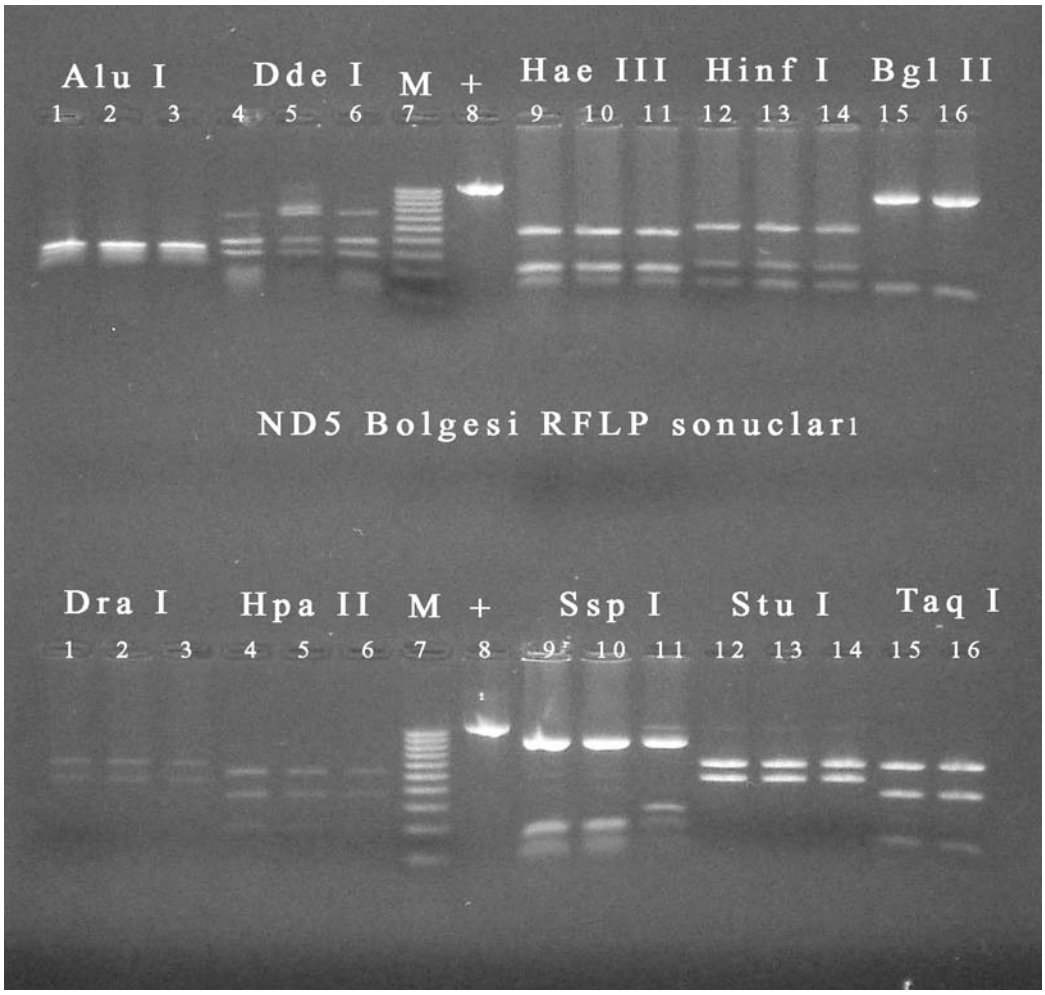
Çizelge 4.7. Restriksiyon Enzimlerinin ND5 Bölgesi Üzerinde Oluşturdukları Kesim Tipi, Tahmini Fragment Uzunlukları ve Irklara Dağılımı

RE	Kesim Tipi	Tahmini Fragment Uzunluğu (bç)	Boz Irk		DAK		GAK		Yerli Kara		GENEL	
			N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
AluI	A	318-309-249-188	10	71	9	60	5	71	11	73	35	69
	B	**500***-318-309-249-188	4	29	6	40	2	29	4	27	16	31
HaeIII	A	485-216-150	14	100	15	100	5	71	15	100	49	96
	B	**650**-485-216	-	-	-	-	2	29	-	-	2	4
BglII	A	968-132	14	100	15	100	7	100	14	93	50	98
	B	968-**750-250-**132	-	-	-	-	-	-	1	7	1	2
SspI	B	859-**280**-154-87	13	93	15	100	7	100	15	100	50	98
	C	859-**280-320-**87	1	7	-	-	-	-	-	-	1	2
DdeI	B	**650-**381-279-144-110-70	14	100	15	100	7	100	15	100	51	100
DraI	A	622-478	14	100	15	100	7	100	15	100	51	100
HpaII	A	539-366-195	14	100	15	100	7	100	15	100	51	100
Hinf I	A	541-260-150	14	100	15	100	7	100	15	100	51	100
StuI	A	615-485	14	100	15	100	7	100	15	100	51	100
TaqI	A	601-380-119	14	100	15	100	7	100	15	100	51	100

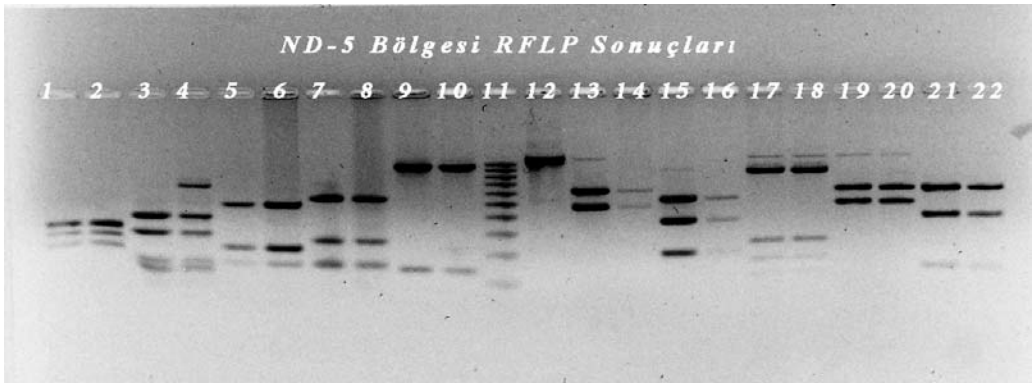
*:Koyu renkle gösterilen rakamlar, gözlenen farklı kesim parça uzunluklarını göstermektedir.

AluI enzimi; dizi üzerinde 188, 506, 542 ve 791. baz noktalarından kesim yaparak 318, 309, 249, 188 ve 36 bç uzunluğunda bantlarla A formu (Çizelge 4.6) ve yaklaşık olarak 500 bç'lik ilave bantın da görüldüğü B formunu oluşturmuştur (Şekil 4.9). İncelenen tüm ırklar A ve B formlarını göstermişlerdir (Çizelge 4.7).

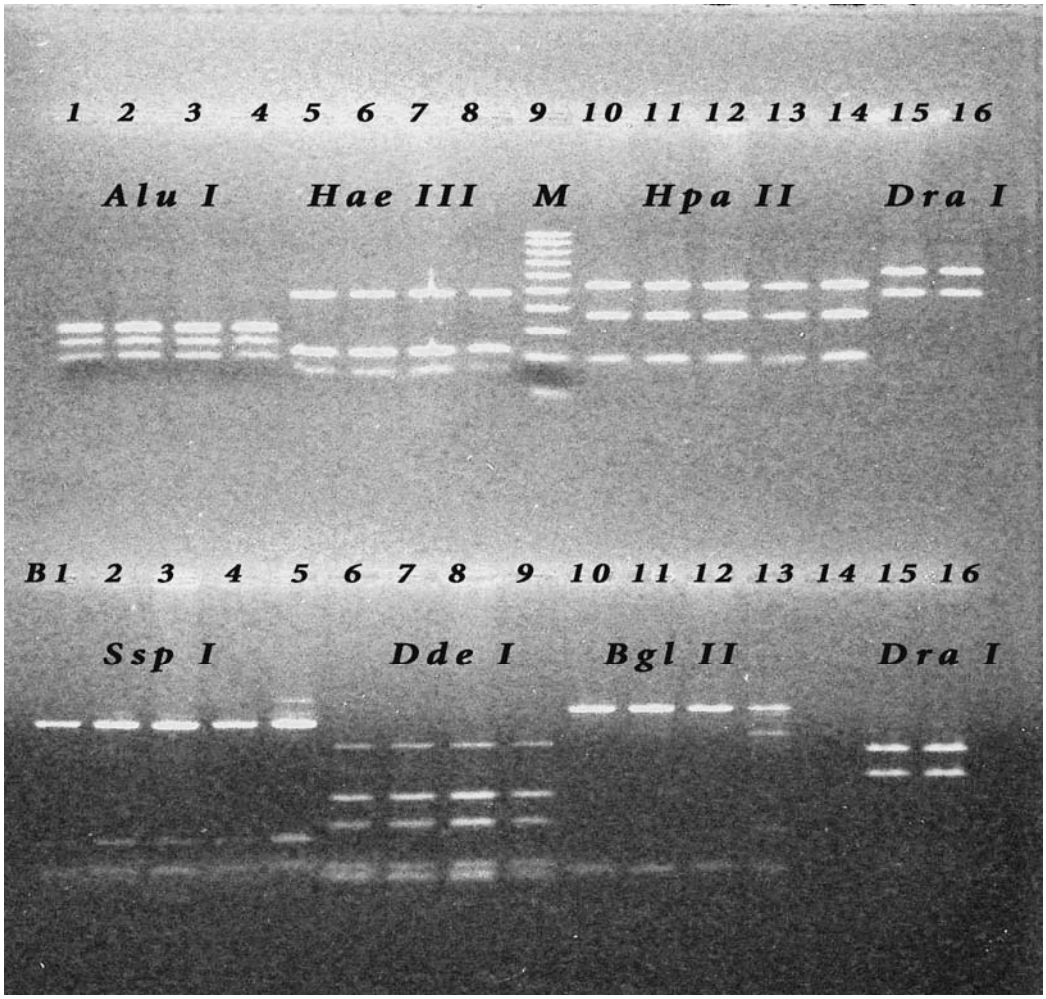
HaeIII enzimi; dizide 216, 249, 465 ve 615. bazlarından kesim oluşturmasıyla 485, 216, 150 ve 33 bç uzunluğunda bantlarla A, tahmini olarak 650, 485 ve 216 bç uzunluğunda bantlarla heteroplazmi yapı sergileyen B formunda gözlenmiştir (Şekil 4.11, 4.12). B formuna sadece GAK populasyonunda rastlanırken diğer populasyonlar A formunda monomorfik olarak bulunmuşlardır (Çizelge 4.7).



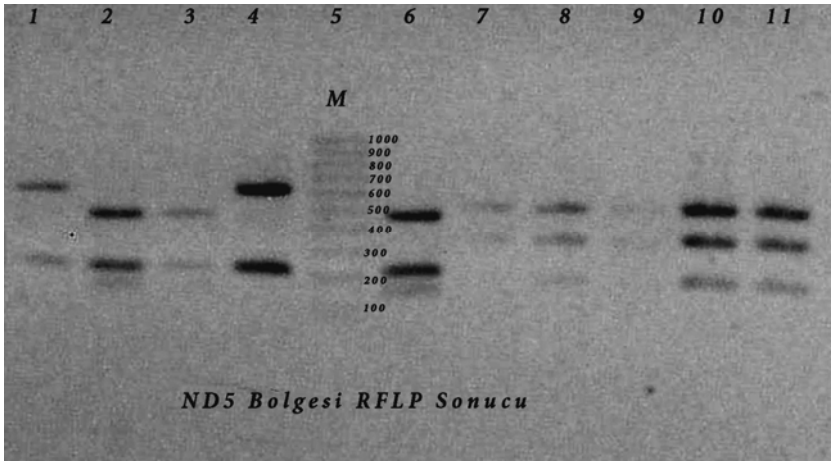
Şekil 4.9. ND-5 Bölgesi PCR-RFLP Sonuçları (M:Marker, +:Pozitif Kontrol)



Şekil 4.10. ND5 Bölgesi PCR-RFLP Sonuçları (1,2:*AluI*, 3,4: *DdeI*, 5,6:*HaeIII*, 7,8:*HinfI*, 9,10:*BglII*, 11:Marker, 12: pozitif kontrol, 13,14: *DraI*, 15,16:*HpaII*, 17,18:*SspI*, 19,20:*StuI*, 21,22:*TaqI*)



Şekil 4.11. ND5 Bölgesi PCR-RFLP Sonuçları (M:Marker)



Şekil 4.12. ND5 Bölgesi PCR-RFLP Sonuçları (1-4 ve 6 *HaeIII*, 5:Marker, 7-11:*HpaII*)

BglII enzimi; 132. bç'inde gösterdiği kesimle 968 ve 132 bç uzunluğunda bantlarla A formuna ilave olarak tahmini 968, 750, 250 ve 132 baz uzunluğundaki bantlarla heteroplazmik yapıya sahip B formu göstermiştir (Şekil 4.9, 4.10, 4.11). Tüm ırklar A formu sergilerken, B formuna sadece Yerli Kara populasyonunda rastlanılmıştır (Çizelge 4.7).

SspI enzimi; dizi üzerinde 859 ve 946. bazlardan kesim oluşturarak 859, 154 ve 87 bç uzunluğunda bantlara sahip A formu sergilemesi beklenirken, 859, 280 ve 154 baz uzunluğunda bantlarla B formu (Şekil 4.9, 4.10), 859, 320 ve 280 baz uzunluğunda bantlarla heteroplazmik yapıya sahip C formu göstermiştir. Bozırk populasyonu B ve C formu sergilerken, diğer ırklar B formunda monomorfik yapıda görülmüşlerdir (Çizelge 4.7).

DdeI enzimi; dizide 118, 262, 370, 751 ve 1030. baz noktalarında yaptığı kesimlerle 381, 279, 144, 110 ve 70 baz uzunluğundaki bantlarla A formu sergilemesi beklenirken, tahmini olarak 650 baz uzunluğunda (Şekil 4.10, 4.11) gözlenen ilave bantla tüm ırklarımız heteroplazmi yapı sergileyen B formunda monomorfik olarak bulunmuşlardır (Çizelge 4.7).

DraI enzimi; dizideki tek kesim yeri olan 622. bazdan kesim yaparak 622 ve 478 baz uzunluğunda bantlarla beklenilen A formunu sergilemiştir (Şekil 4.11). İncelenen ırklar içerisinde *DraI* enzimi tanıma bölgesi bakımından herhangi bir kesim farklılığı gözlenmemiştir (Çizelge 4.7).

HpaII enzimi; 195 ve 561. bazlardan kesim oluşturarak 539, 366 ve 195 baz uzunluğunda bantlarla A formunda gözlenmiştir (Şekil 4.12). İncelenen ırklar içerisinde *HpaII* enzimi tanıma bölgesi bakımından herhangi bir kesim farklılığı bulunmamıştır (Çizelge 4.7).

HinfI enzimi; 155, 696 ve 840. baz noktalarından kesim yaparak 541, 260, 155 ve 144 baz uzunluğundaki bantlarla A formunda gözlenmiştir (Şekil 4.10). İncelenen ırklar içerisinde *HinfI* enzimi tanıma bölgesi bakımından herhangi bir kesim farklılığı gözlenmemiştir (Çizelge 4.7).

StuI enzimi; dizideki 615. baz noktasından yaptığı tek kesimle 615 ve 485 baz uzunluğundaki bantlara sahip A formu sergilemiştir (Şekil 4.9). İncelenen ırklar içerisinde *StuI* enzimi tanıma bölgesi bakımından herhangi bir kesim farklılığı gözlenmemiştir (Çizelge 4.7).

TaqI enzimi; 601 ve 720. bazlardan kesim meydana getirerek 601, 380 ve 119 baz uzunluğuna sahip bantlarla A formunda gözlenmiştir (Şekil 4.9). İncelenen ırklar içerisinde *TaqI* enzimi tanıma bölgesi bakımından herhangi bir kesim farklılığı oluşmamıştır (Çizelge 4.7).

AluI, HaeIII, BglII, DraI, HpaII, HinfI, StuI ve *TaqI* enzimleri gösterdikleri A formlarıyla homoplazmik bulunurken, *AluI, HaeIII, BglII* ve *DdeI* enzimleri B

formunda, *SspI* enzimi B ve C formlarında heteroplazmik yapı sergilemişlerdir (Çizelge 4.7).

Tüm populasyon genelinde PCR-RFLP ile elde edilen dizi üzerinde toplam 25 tanıma bölgesine sahip 10 enzim uygulanması sonucu 6 haplotip elde edilmiştir. Bu haplotiplerin ırklara dağılımı, Bozırk'da 3, DAK'da 2, GAK'da 4 ve Yerli Kara'da 3 şeklinde olmuştur (Çizelge 4.8). *AluI* enziminin belirleyici olduğu 1 ve 4 nolu haplotipler sırasıyla %65, %27 değerleriyle en yüksek oranı oluştururken, gözlenen diğer haplotipler %2 oranında görülmüşlerdir (Çizelge 4.8). Irklar içerisinde de *AluI* enziminin oluşturduğu haplotipler tüm ırklarda ve yaygın olarak gözlenirken, *SspI* enziminin belirleyici olduğu 5 nolu haplotip Bozırk, *BglII* enziminin belirleyici olduğu 2 nolu haplotip Yerli Kara, *HaeIII* enziminin belirleyici olduğu 3 nolu ve *AluI* ve *HaeIII* enzimlerinin birlikte belirleyici oldukları 6 nolu haplotipler GAK populasyonuna özgün genotipleri oluştururken, DAK populasyonuna özgün haplotip gözlenmemiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. ND5 Bölgesinde Restriksiyon Enzimlerinin Oluşturdukları Haplotipler ve Irklara Göre Dağılımı

Tip	*AluI*	*HaeIII*	*HpaII*	*DdeI*	*Dra I*	*BglII*	*HinfI*	*TaqI*	*SspI*	*StuI*	Boz Irk		DAK		GAK		Yerli Kara		GENEL	
											N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	A	A	A	B	A	A	A	A	B	A	10	71	9	60	4	57	10	0.67	33	65
2	A	A	A	B	A	B	A	A	B	A	-	-	-	-	-	-	**1***	**7**	1	2
3	A	B	A	B	A	A	A	A	B	A	-	-	-	-	**1**	**14**	-	-	1	2
4	B	A	A	B	A	A	A	A	B	A	3	21	6	40	1	14	4	27	14	27
5	B	A	A	B	A	A	A	A	C	A	**1**	**7**	-	-	-	-	-	-	1	2
6	B	B	A	B	A	A	A	A	B	A	-	-	-	-	**1**	**4**	-	-	1	2

*:Koyu renkle belirtilen rakamlar ırka özgün bulunan haplotipleri göstermektedir.

Irklar içerisinde kesim sonucu oluşan farklılıklar üzerinden hesaplanan varyasyon değerlerinin en düşük DAK ve en yüksek GAK populasyonunda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9)

Çizelge 4.9. Irklara Ait polimorfik Bölge Sayısı, Eşleştirilmiş Farklılıklar Ortalaması ve Standart Sapmaları

Irk	N	S	k ± SD
Bozırk	14	3	0,72528 0,6448
DAK	15	1	0,51429 0,5137
GAK	7	3	1,42857 1,1278
Yerli Kara	15	3	0,68571 0,6182

N: Örnek sayısı.
S: Polimorfik bölge sayısı.
k: Eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması

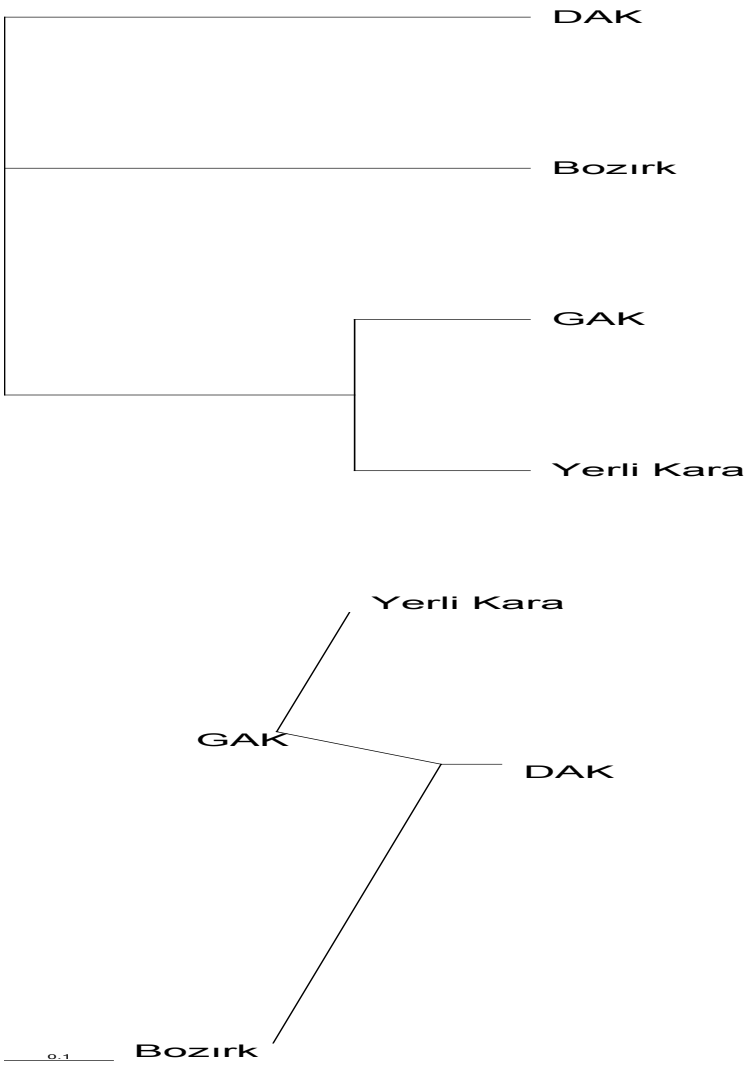
Populasyonlar içi ve populasyonlar arası Eşleştirilmiş farklılıklar ortalamasına ait matriks Çizelge 4.10'da görülmektedir. Yapılan permütasyon testi sonucunda populasyonlar arası farklılıkların önemli olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.10. k, D ve D_A Değerleri ve Önemlilik Durumları

Irklar	Bozırk	DAK	GAK	Yerli Kara
Bozırk	0,72527	0,60000	1,12245	0,67619
DAK	-0,01978	0,51429	1,02857	0,58667
GAK	0,04553	0,05714	1,42857	1,10476
Yerli Kara	-0,02930	-0,01333	0,04762	0,68571

Üst Diyagonal D, Alt Diyagonal D_A ve Diyagonal k değerlerini göstermektedir.

PCR-RFLP sonuçlarına ait D değerleri kullanılarak çizilen dendogram Şekil 4.13'de iki farklı çizim şekli ile görülmektedir.



Şekil 4.13. PCR-RFLP Sonuçlarına Ait Dendogram

GAK ve Yerli Kara populasyonları yakın kümeleri teşkil ederken, DAK ve Bozırk populasyonlarının mevcut gruba uzak kaldığı görülmektedir.

4.4. Dizi Analiz (mtDNA D-loop Baz Dizilimi) Sonuçları

mtDNA Dizi analizi için Bozırk, DAK ve Yerli Kara ırklarından 4'er, GAK ırkından 6 örnek olmak üzere tarafımızca elde edilen 18 örnek yanında NCBI'de belirtilen 75 örnekle birlikte toplam 93 bireye sahip 23 ırkın 910 bç'lik D-loop bölgesi tüm dizilim

sonuçları incelenmiştir. Bunun yanında, NCBI'de 240 bç'lik D-loop dizilim bölgesinin verildiği ve 11 Bozırkı, 12 Yerli Kara, 9 DAK ve 11 GAK ırkı bireylerinde dahil olduğu 249 örneğe tarafımızca oluşturulan 18 bireyinde eklenmesiyle oluşturulan toplam 267 bireye ait dizilim verileri kullanılmıştır.

Verilerin analizinde belirtilen paket programlar vasıtasıyla populasyonlar içi ve populasyonlar arasına ait ilgili genetik değerler elde edilmiş ve ilgili değerlerden, esası transisyon ve transversiyon oranı farklılığına dayanan Kimura-2 parametre yöntemine göre hesaplanan mesafe değerlerinden faydalanılarak dendogram oluşturulmuştur. Populasyonlar arası genetik farklılık değerlerinin önemlilik durumları 1000 tekrarlı permütasyon testiyle incelenmiştir.

4.4.1. Kontrol Bölgesi 910 bç'lik Dizi Analiz Sonuçları

İncelenen yerli ırklara ait 910 bç'lik dizilimin, Anderson *et al.* (1982)'un bildirdiği dizilim referans alınmak suretiyle oluşan genetik varyasyon bölgeleri Çizelge 4.11'de verilmiştir. Bozırk ve DAK ırkına ait birer birey aynı haplotipi paylaşırlarken, diğer bireyler özgün haplotip sergilemişlerdir (Çizelge 4.11).

Araştırmamızda kullanılan ırklara ait 910 bç dizilimlerin oluşturduğu genetik varyasyon özet tablosu Çizelge 4.12'de verilmiştir. İncelediğimiz dizilim üzerinde 26 farklı bölgede toplam 68 nükleotid faklılığı gözlenirken, bu görülen farklılıkların 47'sini transisyon, 5'ini transversiyon ve 16'sını insersiyon oluşturmuş, delesyon'a ise rastlanılmamıştır (Çizelge 4.12). İnsersiyonlar 215. bç'inde +T ve 216-223 bç'lerindeki C serisi içerisinde +C olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4.11. D-loop Bölgesinde Tespit Edilen 18 Yerli Sığıra Ait Dizi Varyasyonu

IRKLAR	mtDNA Dizisi Baz Sıra Numaraları																									
	15953	15966	16055	16057	16073	16085	16112	16119	16133	16135	16138	16140	16143	16185	16247	16248	16255	16260	16300	16302	8	163	169	203	215	216-223
Reference*	C	G	T	G	A	T	T	T	T	T	T	C	A	G	C	C	T	C	A	G	G	A	A	T	+	+
Boz ırk 1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	-	-
Boz Irk 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	-	C
Boz Irk 3[a]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C
Boz Irk 4	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	-	C
DAK1	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	T	.	.	.	.	G	.	-	C
DAK2	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	-	C
DAK3	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	-	C
DAK4[a]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	C
GAK1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	-	-
GAK2	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	-	C
GAK3	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	-	C
GAK4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	G	.	-	C
GAK5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	A	.	.	G	.	T	C
GAK6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	A	.	.	G	.	T	C
Yerli Kara 1	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	-	C
Yerli Kara 2	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
Yerli Kara 3	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	G	.	-	-
Yerli Kara 4	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	G	C	-	C

*Reference: V00654 GenBank giriş numaralı (Anderson et al. 1982) referans dizisi.
Nokta (.) referans ile ortak dizilimi göstermektedir.
a: Ortak dizilime sahip aynı haplotipi paylaşmaktadırlar.

Tespit edilen mutasyonlardan; Bozırk'da 6 transisyon ve 3 insersiyon ile toplam 9 mutasyon 6 bölgede, DAK ırkında 12 transisyon, 3 transversiyon ve 4 insersiyon ile toplam 19 mutasyon 10 bölgede, GAK ırkında 18 transisyon, 1 transversiyon ve 7 insersiyon ile toplam 26 mutasyon 13 bölgede, Yerli Kara ırkında 11 transisyon, 1 transversiyon ve 2 insersiyon ile toplam 14 mutasyon 11 bölgede görülmüştür (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Gözlenen Mutasyonlar, Bölge Sayıları ve Irklara Dağılımı

Irklar	Bozırk		DAK		GAK		Yerli Kara		Genel	
Mutasyon	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S
T-C[a]	2	2	4	2	5	4	5	5	16	9
C-T[a]	-	-	2	2	2	1	1	1	5	4
A-G[a]	3	2	3	1	8	3	4	2	18	5
G-A[a]	1	1	3	2	3	2	1	1	8	4
G-C[b]	-	-	2	1	1	1	1	1	4	1
C-G[b]	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1
T[+]	-	-	-	-	2	1	-	-	2	1
C[+]	3	1	4	1	5	1	2	1	14	1
Toplam	9	6	19	10	26	13	14	11	68	26

N: Gözlenen Mutasyon Sayısı.
S: Polimorfik Bölge Sayısı.
a: Transisyon, b: Transversiyon, +:İnsersiyon

İncelenen yerli ırklarımıza ait 910 bç'lik dizi içerisinde polimorfik bölge sayısı 26 ve haplotip sayısı 17 olarak tespit edilirken, haplotip çeşitliliği 0,990, nükleotid çeşitliliği 0,00478 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 4,275 olarak elde edilmiştir. Irk içi varyasyon değerleri 2,685 ile 5,046 arasında değişirken, en düşük varyasyon Bozırk populasyonunda, en yüksek varyasyon ise Yerli Kara populasyonunda görülmüştür (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. 910 bç Dizi Analizi Sonuçlarına Ait Irk İçi Parametreler

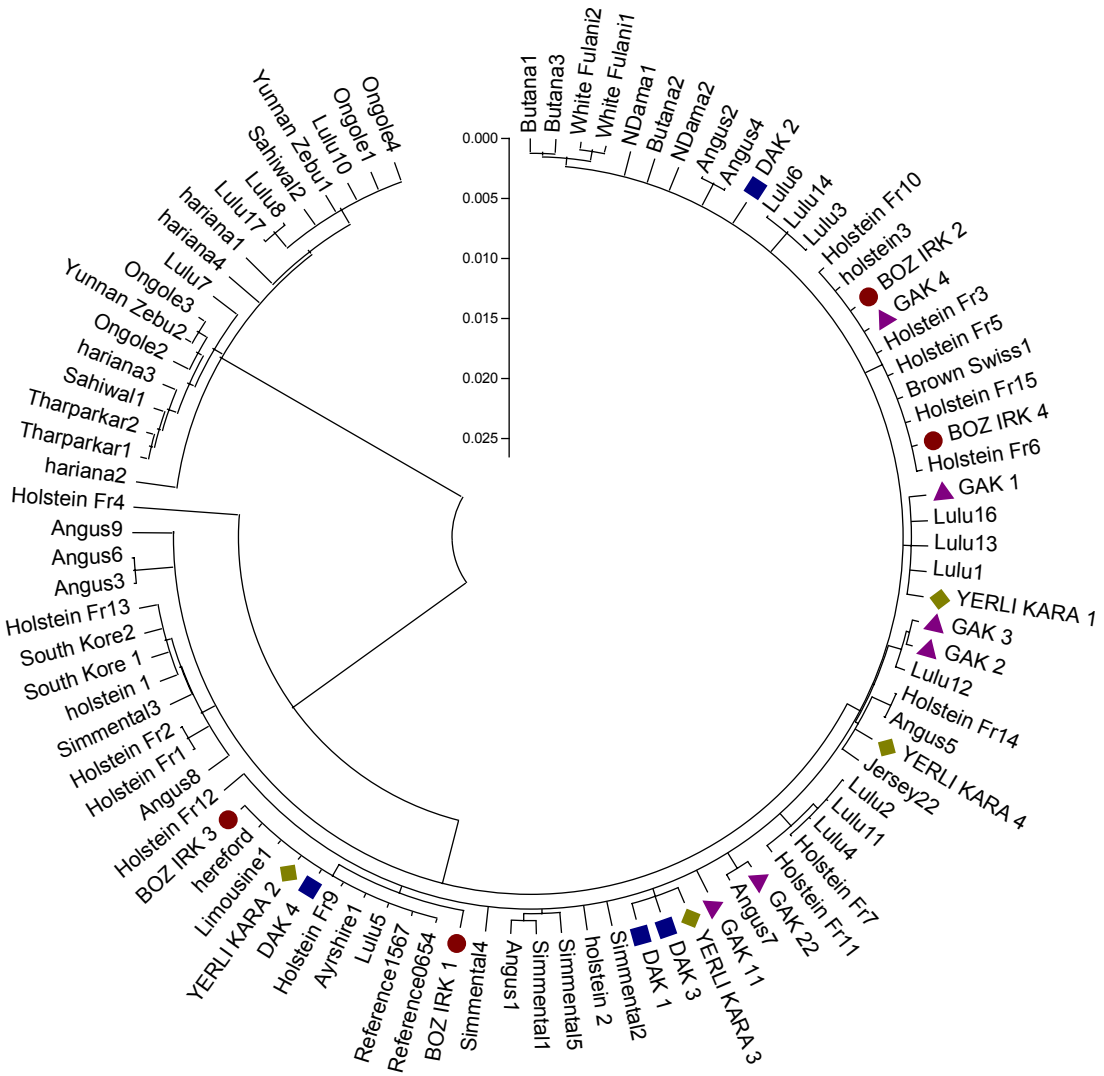
Irklar	N	S	h	Hd	k	π_n
Bozırk	4	6	4	1,00	2,685	0,00298
DAK	4	10	4	1,00	4,872	0,00540
GAK	6	13	6	1,00	3,961	0,00439
Yerli Kara	4	11	4	1,00	5,046	0,00560
GENEL	18	26	17*	0,990	4,275	0,00478
GENEL**	93	99	76	0,992	17,361	0,01966

S: Polimorfik Bölge Sayıları,
h:Haplotip Sayıları,
Hd:Haplotip Çeşitliliği,
k:Eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması,
π_n :Nükleotid Çeşitliliği
*:Bozırk ve DAK ırkları bir adet ortak haplotipe sahiptir.
**: 93 bireyin dahil olduğu değerler

NCBI'dan alınan çeşitli ırklara ait 910 bç'lik dizilim verilerininde kullanılmasıyla daha anlamlı analiz sonuçları elde edebilmek ve aynı zamanda diğer sığır ırkları arasında yerli sığır ırklarımızın pozisyonunu görmek açısından GenBank giriş numarası bildirilen sığırlara ait D-loop dizilimleri analizlere dahil edilerek karşılaştırmalara imkan tanınmıştır.

23 ırka ait 93 bireyin dizisinin kullanıldığı analizler sonucunda polimorfik bölge sayısı 99 ve haplotip sayısı 76 olarak tespit edilmiş, haplotip çeşitliliği 0,992, nükleotid çeşitliliği 0,01966 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 17,361 olarak elde edilmiştir.

Populasyon içi Kimura-2 Parametre yöntemine göre elde edilen mesafelere ait çizilen dendogram'a bakıldığında ırklarımızın yüksek varyasyon göstererek dağılım gösterdikleri, Avrupa ırkları ile aynı grupta bulunurlarken aynı zamanda Afrika grubu ırklar ile de yakın ilişki içerisinde olduğu, Uzak Doğu ırklarından Lulu sığırların yerli ırklarımızla yakın ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 910 bç Bireysel Dizi Analizi Verilerine Ait Dendogram

Populasyonlar arası Kimura-2 yöntemine göre elde edilen eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması (k; diyagonal, D ve D_A; üst ve alt diyagonal) değerleri ve populasyonlar arası önemlilik durumları Çizelge 4.14'de sunulmuştur. Tespit edilen D_A değerlerine ait permütasyon testi sonuçları bakımından ırklarımız arasında önemlilik tespit edilememiştir. Irklarımızla diğer ırklar arasında hesaplanan permütasyon testi önemlilik değerlerine bakıldığında genelde Hindistan (Bos Indicus) ırkları ile Afrika kökenli (Butana, NDama, White Fulani) ırklardan oldukça önemli farklılıklar bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. 910 bç k, D ve D_A Değerleri ve Önemlilik Durumları

Irklar	N	Reference	Boz Irk	DAK	GAK	YerliKara	Holstein	Hereford	Angus	Limousine	Jersey	B.Swiss	Ayrshire	Simmental
Reference	1	**0,0000**	1,5089	3,7806	3,1878	3,0240	2,5548	3,0235	3,0217	2,0098	4,0187	2,0112	0,0000	3,4275
Boz Irk	4	0,1665	**2,6849**	4,5387	3,6093	3,7813	3,5055	4,5409	4,0896	3,5232	4,5243	2,5162	1,5089	4,2361
DAK	4	1,3448	0,7605	**4,8716**	5,0412*	4,7923	5,5460	6,8245	5,7508	5,8026	6,2930	4,2834	3,7806	6,0585
GAK	6	1,2073	0,2862	0,6248	**3,9612**	4,4525	4,5260	6,2283	5,2321	5,2069	5,1977	3,1873	3,1878	5,0423
Yerli Kara	4	0,5008	-0,0844	-0,1667	-0,0513	**5,0464**	4,7276	6,0662	5,1316	5,0415	5,0291	3,5256	3,0240	5,2485
Holstein	17	0,4351	0,0433	0,9904**	0,4257*	0,0847	**4,2395**	5,5924	4,7411	4,5717	5,2755	3,5057	2,5548	4,9341
Hereford	1	3,0235	3,1984	4,3887	4,2477	3,5430	3,4727	**0,0000**	6,0618	5,0400	7,0557	5,0448	3,0235	6,4701
Angus	9	0,4691	0,1945	0,7624	0,6988*	0,0558	0,0687	3,5092	**5,1053**	5,0414	5,9314	4,1453	3,0217	5,3844
Limousine	1	2,0098	2,1807	3,3668	3,2263	2,5183	2,4520	5,0400	2,4888	**0,0000**	6,0369	4,0277	2,0098	5,4468
Jersey	1	4,0187	3,1818	3,8572	3,2171	2,5059	3,1557	7,0557	3,3888	6,0369	**0,0000**	4,0187	4,0187	6,0428
B. Swiss	1	2,0112	1,1737	1,8476	1,2067	1,0025	1,3860	5,0448	1,5927	4,0277	4,0187	**0,0000**	2,0112	4,0317
Ayrshire	1	0,0000	0,1665	1,3448	1,2073	0,5008	0,4351	3,0235	0,4691	2,0098	4,0187	2,0112	**0,0000**	3,4275
Simmental	5	0,5498	0,0160	0,7450	0,1841	-0,1523	-0,0633	3,5924	-0,0459	2,5692	3,1651	1,1541	0,5498	**5,7553**
Tharparkar	2	44,1889	43,3738	44,7512	43,8180*	43,5799	42,6150**	47,5174	42,1939*	46,2982	45,1383	46,3504	44,1889	42,7990
Yun. Zebu	2	41,1957	40,3810	41,4816	40,6405*	40,5887*	39,6858**	44,5283	39,3238*	43,3064	42,1444	43,3592	41,1957	39,8069*
Hariana	4	41,0946	40,2853*	41,3839*	40,7307**	40,4862*	39,5927**	44,4180	39,1735**	43,2147	42,0568	43,2662	41,0946	39,7133**
Ongole	4	43,921	43,1079*	44,2166*	43,3696**	43,3223*	42,3487**	47,2696	41,6773**	46,0374	44,8675	46,0926	43,9214	42,5395**
Sahiwal	2	42,215	41,4002	42,5009	41,6597*	41,6080	40,6411**	45,5475	39,9731*	44,3256	43,1636	44,3784	42,2150	40,8261*
Lulu	15	3,783	3,0192*	3,6622*	2,8862	2,8140	2,8799**	6,9044	2,8427*	5,8270	5,5068	4,4947	3,7827	2,8514
Butana	3	3,7082	2,8737*	2,0287*	2,9098**	2,0301*	3,0524**	6,7670	2,6246*	5,7339	5,0404	3,7056	3,7082	2,8637*
NDama	2	3,0343	2,2003	1,3551	2,2359*	1,2730	2,2384*	6,0971	1,8393*	5,0616	5,0435	3,0314	3,0343	1,9871
W. Fulani	2	4,0404	3,2038	2,1043	3,0679*	2,5303	3,4201**	7,0945	3,1771*	6,0603	6,0456	4,0353	4,0404	3,1904*
S. Kore	2	4,0427	3,2064	3,8885	2,5614*	3,0443	1,9852**	7,1038	2,7292	6,0638	6,0547	4,0359	4,0427	1,9753

Üst Diyagonal D, Alt Diyagonal D_A ve Diyagonal k değerlerini göstermektedir. *:P<0,05, **:P<0,01.

Çizelge 4.14. (devamı)

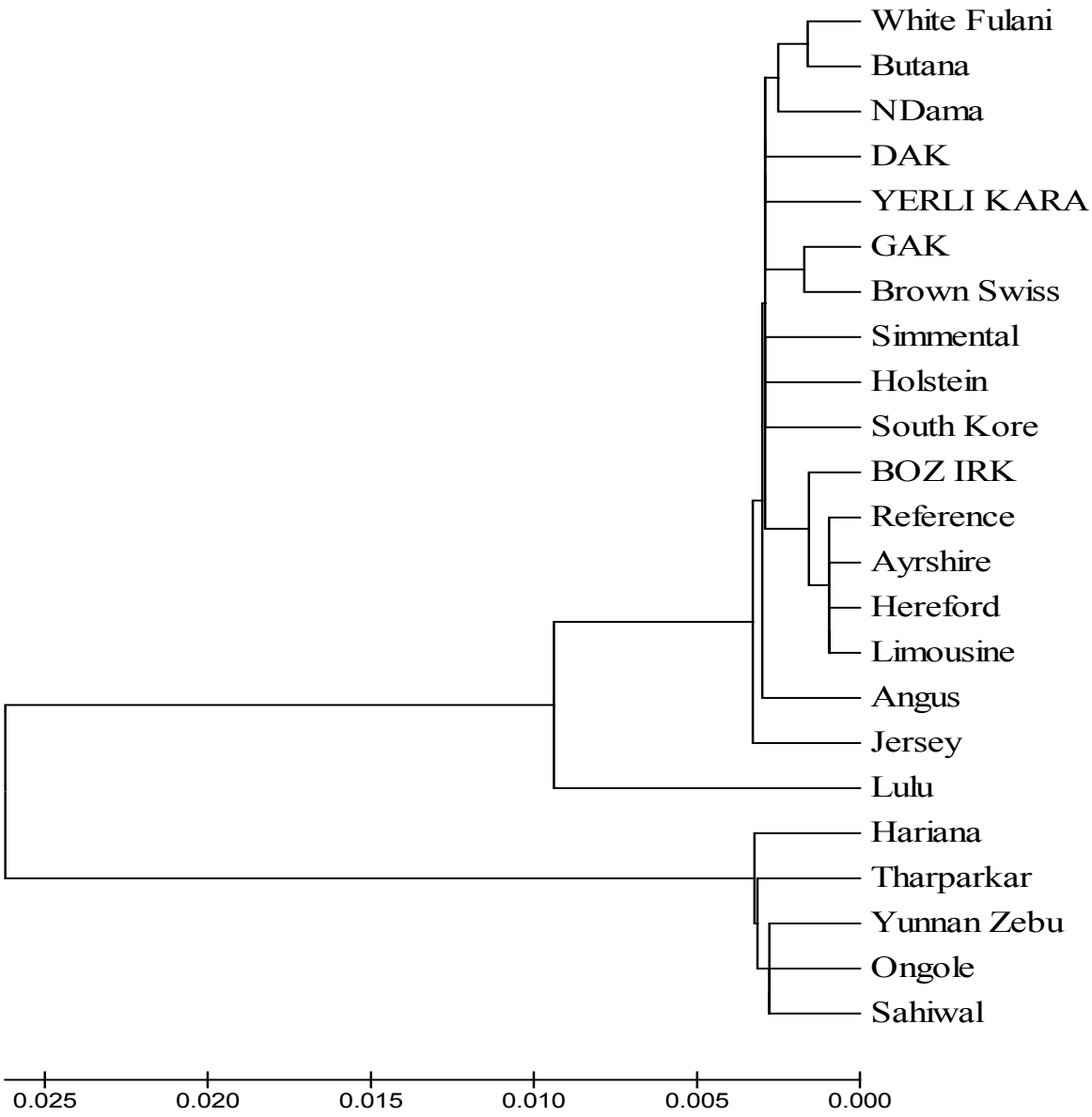
Irklar	Tharparkar	Yun.Zebu	Hariana	Ongole	Sahiwal	Lulu	Butana	NDama	W.Fulani	S.Kore
Reference	44,6912	45,2452	44,1310	47,4637	45,2452	14,7927	5,7235	6,0645	4,5431	**6,0606**
Boz Irk	45,2185	45,7729	44,6641*	47,9926*	45,7729	15,3716	6,2314*	6,5730	5,0491	**6,5668**
DAK	47,6892	47,9669	46,8561*	50,1946*	47,9669	17,1080	6,4798*	6,8212*	5,0429	**8,3423**
GAK	46,3008*	46,6706*	45,7477**	48,8926**	46,6706*	15,8767	6,9057**	7,2468*	5,5513	**6,5599***
Yerli Kara	46,6053	47,1614*	46,0458*	49,3877*	47,1614	16,3471	6,5686*	6,8265	5,5563	**7,5853**
Holstein	45,2370*	45,8551**	44,7489**	48,0107**	45,7911**	16,0097*	7,1874	7,3885	6,0426*	**6,1229**
Hereford	48,0196	48,5778	47,4544	50,8119	48,5778	17,9144	8,7823	9,1274	7,5973	**9,1217**
Angus	45,2488*	45,9260*	44,7625**	47,7221**	45,5560*	16,4054	7,1925*	7,4222**	6,2325*	**7,2997***
Limousine	46,8004	47,3558	46,2511	49,5796	47,3558	16,8370	7,7491	8,0919	6,5631	**8,0817**
Jersey	45,6405	46,1939	45,0932	48,4097	46,1939	16,5168	7,0557	8,0738	6,5484	**8,0726**
B. Swiss	46,8526	47,4087	46,3026	49,6348	47,4087	15,5047	5,7209	6,0617	4,5381	**6,0538**
Ayrshire	44,6912	45,2452	44,1310	47,4637	45,2452	14,7927	5,7235	6,0645	4,5431	**6,0606**
Simmental	46,1789	46,7341*	45,6273**	48,9594**	46,7341*	16,7390	7,7566*	7,8950	6,5708	**6,8709**
Tharparkar	**1,0045**	5,5573	5,0559	6,5798	4,5483	34,9980	46,8731	47,4354	47,4635	**51,3125**
Yun. Zebu	1,0055	**8,0990**	5,8127	5,3092	4,5455	34,7046	46,6976	46,3283	46,3554	**51,3132**
Hariana	1,5172	-1,2732	**6,0728**	6,9583	5,0525	34,0621*	46,5062*	46,0461	46,3424	**50,4617**
Ongole	2,5353	-2,2825	0,3796	**7,0845**	5,3070	36,4649**	48,9146*	48,2681	48,5709	**53,2905**
Sahiwal	1,0158	-2,5343	-1,0142	-1,2656	**6,0606**	34,4332	47,8034	46,8824	47,4635	**51,3132**
Lulu	23,4858*	19,6452	20,0156*	21,9127**	20,3929	**22,0200**	18,1945	17,8439	17,0886	**19,2223**
Butana	44,3556	40,6328	41,4545*	43,3570*	42,7579	5,1692	**4,0306**	5,3830	2,8531	**9,7955**
NDama	43,9029	39,2486	39,9794	41,6955	40,8218	3,8036	0,3375	**6,0606**	3,5277	**9,6308**
W. Fulani	46,4585	41,8031	42,8032	44,5259	43,9304	5,5758	0,3350	-0,0054	**1,0056**	**8,6103**
S. Kore	**48,7923**	**45,2458**	**45,4074**	**47,7304**	**46,2650**	**6,1944**	**5,7623**	**4,5826**	**6,0896**	4,0358

Üst Diyagonal D, Alt Diyagonal D_A ve Diyagonal k değerlerini göstermektedir. *:P<0,05, **:P<0,01.

Populasyonlar arası Kimura-2 yöntemine göre elde edilen genetik mesafeler Çizelge 4.15'de sunulmuştur. Irklarımız arasında genetik mesafe değerlerinin 0,0055 ile 0,0039 arasında değişirken en uzak genetik mesafe değerinin GAK-DAK, en yakın genetik mesafe değerinin ise GAK-Bozırk populasyonları arasında olduğu görülmüştür. Bu mesafelere ait çizilen dendogram ise Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. 910 bç Dizi Analizi Sonuçlarına Ait Genetik Mesafeler (Alt diyagonal) ve Standart Hataları (Üst Diyagonal) (MEGA 3.0 Programı ile)

	Ref	B.Irk	DAK	GAK	Y.Ka	Hols	Jers	Here	Sim	Ang	B.Sw	Lim	Ayr	W.F	But	Lulu	NDa	S.Ko	Y.Z.	Ong	Har	Sah	Thar
Reference		0,0008	0,0015	0,0014	0,0012	0,0009	0,0022	0,0019	0,0010	0,0017	0,0000	0,0013	0,0016	0,0024	0,0024	0,0025	0,0026	0,0024	0,0074	0,0074	0,0072	0,0075	0,0073
Boz Irk	0,0017		0,0014	0,0011	0,0010	0,0020	0,0021	0,0021	0,0011	0,0018	0,0008	0,0012	0,0013	0,0023	0,0023	0,0023	0,0024	0,0024	0,0074	0,0073	0,0072	0,0075	0,0073
DAK	0,0043	0,0051		0,0015	0,0013	0,0015	0,0023	0,0024	0,0015	0,0022	0,0015	0,0016	0,0017	0,0020	0,0021	0,0026	0,0026	0,0026	0,0075	0,0074	0,0073	0,0076	0,0074
GAK	0,0034	0,0039	0,0055		0,0012	0,0011	0,0020	0,0024	0,0013	0,0021	0,0014	0,0013	0,0013	0,0023	0,0023	0,0024	0,0021	0,0024	0,0074	0,0074	0,0073	0,0075	0,0073
Yerli Kara	0,0034	0,0043	0,0054	0,0048		0,0012	0,0019	0,0023	0,0013	0,0020	0,0012	0,0014	0,0014	0,0021	0,0022	0,0021	0,0024	0,0024	0,0074	0,0073	0,0071	0,0075	0,0073
Holstein	0,0029	0,0040	0,0063	0,0049	0,0053		0,0020	0,0021	0,0012	0,0018	0,0009	0,0013	0,0013	0,0023	0,0023	0,0023	0,0020	0,0025	0,0074	0,0073	0,0072	0,0075	0,0073
Jersey	0,0045	0,0051	0,0071	0,0057	0,0057	0,0060		0,0030	0,0021	0,0027	0,0022	0,0022	0,0020	0,0028	0,0027	0,0028	0,0030	0,0026	0,0074	0,0073	0,0072	0,0075	0,0073
Hereford	0,0034	0,0051	0,0077	0,0068	0,0068	0,0063	0,0080		0,0021	0,0026	0,0019	0,0023	0,0025	0,0032	0,0031	0,0032	0,0032	0,0031	0,0077	0,0077	0,0075	0,0078	0,0077
Simmental	0,0034	0,0046	0,0065	0,0057	0,0058	0,0054	0,0067	0,0068		0,0019	0,0010	0,0014	0,0015	0,0023	0,0023	0,0023	0,0023	0,0025	0,0073	0,0072	0,0071	0,0074	0,0072
Angus	0,0023	0,0040	0,0066	0,0057	0,0057	0,0052	0,0068	0,0057	0,0057		0,0017	0,0021	0,0022	0,0030	0,0029	0,0030	0,0030	0,0029	0,0076	0,0075	0,0074	0,0077	0,0075
Brown Swiss	0,0000	0,0017	0,0043	0,0034	0,0034	0,0029	0,0045	0,0034	0,0034	0,0023		0,0013	0,0016	0,0024	0,0024	0,0025	0,0026	0,0024	0,0074	0,0074	0,0072	0,0075	0,0073
Limousine	0,0039	0,0048	0,0068	0,0055	0,0059	0,0056	0,0068	0,0073	0,0061	0,0062	0,0039		0,0015	0,0024	0,0024	0,0024	0,0021	0,0026	0,0074	0,0074	0,0072	0,0075	0,0073
Ayrshire	0,0023	0,0028	0,0048	0,0034	0,0040	0,0040	0,0045	0,0057	0,0047	0,0045	0,0023	0,0046		0,0024	0,0024	0,0024	0,0024	0,0026	0,0077	0,0076	0,0075	0,0078	0,0076
White Fulani	0,0051	0,0057	0,0057	0,0061	0,0063	0,0068	0,0074	0,0086	0,0070	0,0074	0,0051	0,0074	0,0051		0,0012	0,0015	0,0033	0,0029	0,0077	0,0076	0,0074	0,0077	0,0075
Butana	0,0065	0,0070	0,0073	0,0076	0,0074	0,0081	0,0080	0,0099	0,0081	0,0088	0,0065	0,0088	0,0065	0,0032		0,0018	0,0033	0,0029	0,0075	0,0076	0,0074	0,0077	0,0075
Lulu	0,0068	0,0074	0,0077	0,0080	0,0077	0,0083	0,0091	0,0103	0,0084	0,0091	0,0068	0,0089	0,0068	0,0040	0,0061		0,0033	0,0028	0,0075	0,0074	0,0072	0,0075	0,0073
NDama	0,0068	0,0074	0,0094	0,0072	0,0086	0,0069	0,0091	0,0103	0,0082	0,0091	0,0068	0,0078	0,0068	0,0097	0,0111	0,0109		0,0033	0,0082	0,0081	0,0080	0,0082	0,0081
South Kore	0,0167	0,0174	0,0194	0,0177	0,0185	0,0181	0,0184	0,0203	0,0186	0,0191	0,0167	0,0189	0,0176	0,0193	0,0205	0,0202	0,0218		0,0055	0,0054	0,0053	0,0056	0,0054
Yunan Zebu	0,0505	0,0512	0,0540	0,0520	0,0527	0,0512	0,0505	0,0543	0,0512	0,0530	0,0505	0,0523	0,0531	0,0537	0,0526	0,0537	0,0581	0,0396		0,0019	0,0018	0,0022	0,0021
Ongole	0,0512	0,0518	0,0543	0,0524	0,0524	0,0519	0,0511	0,0550	0,0516	0,0536	0,0512	0,0529	0,0537	0,0537	0,0537	0,0531	0,0581	0,0390	0,0051		0,0017	0,0017	0,0017
Hariana	0,0499	0,0506	0,0531	0,0514	0,0521	0,0507	0,0499	0,0537	0,0507	0,0524	0,0499	0,0517	0,0524	0,0524	0,0522	0,0521	0,0572	0,0386	0,0057	0,0057		0,0020	0,0019
Sahiwal	0,0537	0,0543	0,0568	0,0549	0,0559	0,0544	0,0536	0,0575	0,0541	0,0561	0,0537	0,0554	0,0562	0,0549	0,0550	0,0546	0,0603	0,0413	0,0074	0,0060	0,0079		0,0018
Tharparkar	0,0512	0,0518	0,0543	0,0524	0,0534	0,0519	0,0511	0,0550	0,0520	0,0536	0,0512	0,0529	0,0537	0,0524	0,0524	0,0524	0,0581	0,0393	0,0063	0,0051	0,0066	0,0060	



Şekil 4.15. 910 bç Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Sığır Irkları Arasındaki Filogenetik İlişki.

Şekil 4.15'da görüldüğü gibi Bos taurus ve Bos indicus ırkı sığırlar önce iki büyük ana kümeye ayrılmaktadırlar. Yerli ırklarımızın tamamı Bos taurus kümesi içerisinde bulunurken, Bozırk referansın içerisinde bulunduğu Avrupa ırklarına yakın bulunmuş, GAK, Yerli Kara ve DAK belirtilen sırayla N'Dama, Butana ve White Fulani gibi Afrika orijinli ırkların oluşturdukları alt grup ile Avrupa ırkları arasında bir pozisyon sergilemişlerdir.

4.4.2. Kontrol Bölgesi 240 bç'lik Dizi Analiz Sonuçları

NCBI'de bildirilen çeşitli sığır ırklarına ait D-loop bölgesi dizilimleri çeşitli yazarlar tarafından tam 910 bazlık bölgeyi kapsamadığından 240 baz dizilimine sahip ortak bölge baz alınarak analizlere toplam 267 bireyin katılımı sağlanmıştır. Ayrıca burada mevcut 11'i Bozırk, 12'si Yerli Kara, 9'u DAK ve 11'i GAK olmak üzere 43 bireyin de diziliminin kullanılmasıyla ülkemiz yerli ırklarına ait 61 birey analize dahil edilmiştir.

İncelenen 61 bireye ait 240 bç'lik dizi içerisinde polimorfik bölge sayısı 37 ve haplotip sayısı 39 olarak tespit edilirken, haplotip çeşitliliği 0,957, nükleotid çeşitliliği 0,0140 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 3,364 olarak elde edilmiştir. Yerli ırklarımız içerisinde varyasyon değerleri 2,107 ile 4,323 arasında değişirken en düşük varyasyon Bozırk populasyonunda, en yüksek ise Yerli Kara populasyonunda görülmüştür (Çizelge 4.16).

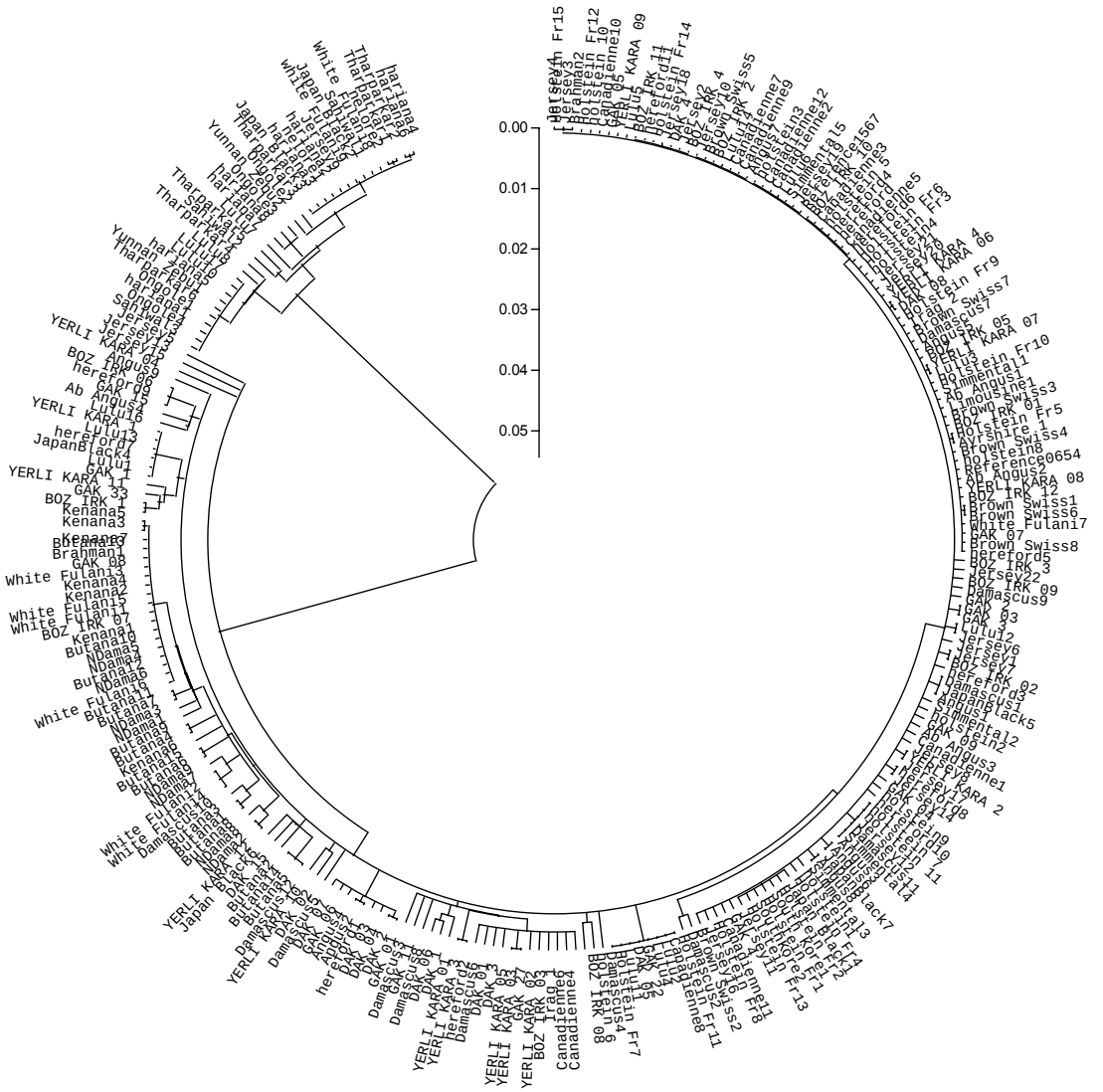
Çizelge 4.16. 240 bç Dizileme Sonuçlarına Ait Irk İçi Parametreler.

Irklar	N	S	h	Hd	k	π_n
Bozırk	15	13	11	0,905	2,107	0,0087
DAK	13	12	9	0,949	3,309	0,0137
GAK	17	16	14	0,971	3,467	0,0143
Yerli Kara	16	16	12	0,967	4,323	0,0179
GENEL *	61	37	39	0,957	3,364	0,0140
GENEL	267	75	113	0,932	7,342	0,0323

*:Yerli ırklarımıza ait ortalamalar olup Bozırk ve DAK ırkları bir adet ortak haplotipe sahiptirler.
S: Polimorfik Bölge Sayıları,
h:Haplotip Sayıları,
Hd:Haplotip Çeşitliliği,
k:Eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması,
π_n :Nükleotid Çeşitliliği.

30 ırktan 267 bireye ait dizisinin kullanıldığı analizde, polimorfik bölge sayısı 78 ve haplotip sayısı 69 olarak tespit edilirken, haplotip çeşitliliği 0,932, nükleotid çeşitliliği 0,0323 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması ırklarımız genelinde 3,364 ve tüm populasyon genelinde 7,342 olarak elde edilmiştir.

Populasyon içi Kimura-2 yöntemine göre elde edilen mesafelere ait çizilen dendogram Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Dendogram'a bakıldığında ırklarımızın yüksek varyasyon göstererek dağılım gösterdikleri, Avrupa ırkları ile karışım halinde bulunurlarken aynı zamanda Afrika grubu ırklar ile de yakın ilişki içerisinde olduğu görülmektedir. Aynı gruba ait bireylerin yer yer bir arada bulunmalarını ancak ortak genotip benzerliğine sahip olmaları ile açıklamak mümkün olmaktadır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 240 bç Bireysel Dizi Analizi Verilerine Ait Dendogram

Populasyonlar arası Kimura-2 yöntemine göre elde edilen eşleştirilmiş farklılıklar ortalaması (k; diyagonal, D ve D_A; üst ve alt diyagonal) değerleri ve populasyonlar arası önemlilik durumları Çizelge 4.17'de sunulmuştur. Tespit edilen D_A değerlerine ait permütasyon testi sonuçları DAK-Bozırk ve DAK-GAK populasyonları arasında önemli ($P<0.05$) bulunmuş, diğer ırklarımız arasında önemlilik tespit edilememiştir. Irklarımızla diğer ırklar arasında hesaplanan permütasyon testi önemlilik değerlerine bakıldığında genelde Hindistan (Bos Indicus) ırkları ile Afrika kökenli (Butana, NDama, White Fulani) ırklardan oldukça önemli farklılıklar bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. 240 bç k, D ve D_A Değerleri ve Önemlilik Durumları

	N	Ref	Boz Irk	DAK	GAK	Yerli Kara	Hereford	Holstein	Angus	Canadien.	Br.Swiss	Hariana	Ongole	Tharparkar	Sahiwal	Yun..Zebu
Reference	1	**0,0000**	1,0840	2,4351	1,8582	2,6248	0,8448	0,9386	1,4093	1,3673	0,6350	26,7222*	27,8510	26,4634*	27,3038	26,8814
Boz Irk	15	0,0304	**2,1072**	3,0803*	2,7421	3,3992	1,7981	2,0204	2,3890	2,3094	1,6905	27,2627**	28,3521**	27,0443**	27,8886**	27,3815**
DAK	13	0,7807	0,3722*	**3,3089**	3,6665*	3,9555	2,8965*	3,3489**	3,5758**	3,2983*	3,0620	28,4878**	29,5783**	28,3078**	29,0936**	28,6000*
GAK	17	0,1247	-0,0449	0,2786*	**3,4669**	4,0220	2,5368	2,7782**	3,1661	3,0158	2,4722	27,0786**	28,2800**	26,9674**	27,7101**	27,3114**
Yerli Kara	16	0,4636	0,1843	0,1398	0,1273	**4,3225**	3,1705	3,5681**	3,8110	3,5966	3,2232	27,9171**	29,0870**	27,8006**	28,3268**	28,1966**
Hereford	12	0,0212	-0,0791	0,4185**	-0,0202	0,1857	**1,6471**	1,7764	2,1178	2,0884	1,4838	26,8117**	27,9397**	26,5528**	27,3933**	26,9709*
Holstein	26	0,0694	0,0976**	0,8253**	0,1755**	0,5376**	0,0836	**1,7383**	2,2237	2,2884	1,5786	27,3312**	28,4899**	27,0790**	27,9562**	27,5155**
Angus	13	0,1111	0,0372	0,6231**	0,1344*	0,3515*	-0,0040	0,0564	**2,5964**	2,6952	2,0316	27,1867**	28,2416**	26,9183**	27,6294**	27,2713*
Canadienne	12	0,0599	-0,0516	0,3364*	-0,0250	0,1280	-0,0426	0,1118*	0,0896	**2,6148**	2,0082	27,8036**	28,9665**	27,5696**	28,4161**	27,9906**
Br. Swiss	8	0,0354	0,0373	0,8080**	0,1391	0,4623*	0,0607*	0,1099*	0,1338	0,1012	**1,1992**	27,2362**	28,1683**	26,9905**	27,5725*	27,2786*
Hariana	8	24,9012*	24,388**	25,0123**	23,5241**	23,9349**	24,1671**	24,6410**	24,0675**	24,6752**	24,8156**	**3,6420**	4,1861	3,6429	3,8212	3,6024
Ongole	4	25,3542	24,8025**	25,4279**	24,0506**	24,4298**	24,6202**	25,1247**	24,4475**	25,1632**	25,0728**	-0,1308	**4,9919**	4,3874	4,2088	3,6084
Tharparkar	6	24,4736*	24,0008**	24,6635**	23,2441**	23,6495**	23,7394**	24,2200**	23,6302**	24,2723**	24,4011**	-0,1680	-0,0983	**3,9797**	4,0111	3,7707
Sahiwal	3	25,2483	24,7794**	25,3837**	23,9211**	24,1100**	24,5142**	25,0315**	24,2757**	25,0532**	24,9173*	-0,0553	-0,3426	-0,0343	**4,1110**	3,7843
Yunn. Zebu	2	23,7782	23,2246**	23,8421*	22,4747**	22,9321**	23,0441*	23,5431*	22,8698*	23,5800**	23,5758*	-1,3218	-1,9908	-1,3224	-1,3744	**6,2065**
Nelore	2	25,6275	25,1509**	25,8715*	24,3968**	24,6908**	24,8933*	25,3375**	24,9121**	25,4202**	25,8108*	0,3578	1,3667	0,3974	1,3776	-0,0354
Lulu	15	1,9460	1,8078**	2,3304**	1,5153*	1,8714**	1,7087*	1,8848**	1,7433*	1,8489*	1,8328*	12,2069**	12,3204*	11,8658**	12,0577*	10,9408
W.Fulani	9	2,2924	1,7692**	1,7431**	1,5231**	1,7749**	1,8150**	2,3018**	2,0350**	2,0789**	2,2868**	14,2482**	14,3955**	14,4330**	15,0726*	12,8748
Butana	15	2,6887*	2,0466**	1,6594**	1,9145**	2,0483**	2,1656**	2,7546**	2,4400**	2,3823**	2,6763**	23,7419**	23,7214**	23,9919**	24,8346**	22,1731**
Kenana	7	3,1256*	2,4925**	2,1468**	2,4052**	2,6020**	2,6491**	3,2009**	2,9577**	2,8378**	3,1806**	25,3684**	25,1777**	25,5629**	26,3491**	23,6284*
NDama	9	2,7076*	2,1046**	1,7744**	1,9804**	2,1242**	2,2311**	2,7881**	2,5216**	2,4448**	2,6459**	24,5312**	24,2691**	24,6573**	25,1578**	22,8573*
Japan Black	7	1,4230	1,2190*	1,8184**	1,0709*	1,3395*	1,1372	1,2281*	1,0832	1,3657*	1,5060**	11,4316**	11,9538*	11,2263**	12,0637*	10,4287
Damascus	12	0,3200	0,0307	0,0116	0,0412	-0,0122	0,0220	0,3771**	0,1580	0,0747	0,3435**	24,1282**	24,4782**	23,7507**	24,3907**	22,9531*
Iraq	2	0,0000	-0,3373	-0,6287	-0,4050	-0,6500	-0,3564	0,0795	-0,1135	-0,4499	0,0422	24,5731*	25,0352	24,1434	24,9248	23,4513
Jersey	22	0,1238	0,0960	0,8546**	0,1098*	0,4958**	0,0846	0,1002*	0,0966	0,1688*	0,1734*	21,7480**	22,2425**	21,3716**	22,1631**	20,6714**
Limousine	1	0,0000	0,0304	0,7807	0,1247	0,4636	0,0212	0,0695	0,1111	0,0599	0,0354	24,9012	25,3542	24,4736	25,2483	23,7782
Ayrshire	1	0,0000	0,0304	0,7807	0,1247	0,4636	0,0212	0,0696	0,1111	0,0599	0,0354	24,9012	25,3542	24,4736	25,2483	23,7782
Brahman	2	0,0000	-0,3006	-0,0749	-0,2783	-0,0272	-0,2271	0,0858	-0,0263	-0,0999	0,0464	23,8006*	23,9335	23,6853*	24,4690	22,3674
Simmental	5	-0,0119	-0,0072	0,7386**	0,1028	0,3434	-0,0653	-0,1361	-0,1366	0,0293	0,0333	23,8065**	24,2668**	23,3772**	24,1573*	22,6845*
S.Kore	2	2,0510	2,1133**	2,9012*	2,2295**	2,4532*	2,0953**	1,3472**	1,7199*	2,1449*	1,9741**	27,5088*	27,3439	26,9648*	26,9015	26,0648

Üst Diyagonal D, Alt Diyagonal D_A ve Diyagonal k değerlerini göstermektedir. *:P<0,05, **:P<0,01.

Çizelge 4.17.(devamı)

	Nelore	Lulu	W.Fulani	Butana	Kenana	NDama	Jap. Black	Damascus	Iraq	Jersey	Limous.	Ayrshire	Brahman	Simmental	Sou. Kore
Refeence	25,6275	8,1636	8,1941	4,3213	3,6570*	3,6415*	8,3371	1,8706	1,5269	2,6052	0,0000	0,0000	2,0510	1,8381	3,5828
Boz Irk	26,2045**	**9,0789****	8,7246**	4,7328**	4,0775**	4,0921**	9,1868*	2,6350	2,2432	3,6310	1,0840	1,0840	2,8040	2,8965	4,6986**
DAK	27,5259*	10,2023*	9,**2993****	4,9465**	4,3327**	4,3628**	10,3870**	3,2167	2,5526	4,9904	2,4351	2,4351	3,6307	4,2431*	6,0874*
GAK	26,1303**	9,4663*	9,1583**	5,**2805****	4,6700**	4,6478**	9,7185	3,3253	2,8554	4,3246	1,8582	1,8582	3,5062	3,6862	5,4947*
Yerli Kara	26,8521**	10,2502**	9,8378**	5,8422**	5,2947**	5,2194**	10,4150	3,6997	3,0381	5,1385	2,6248	2,6248	4,1851	4,3546	6,1461**
Hereford	25,7168*	8,7498	8,5403**	4,6217**	4,0041**	3,**9885****	8,8750*	2,3961	1,9940	3,3896	0,8448	0,8448	2,6475	2,6083	4,4506**
Holstein	26,2067**	8,9714**	9,0727**	5,2564**	4,6015**	4,5911**	9,**0115****	2,7969**	2,4756	3,4507**	0,9386	0,9386	3,0060	2,5831	3,7481**
Angus	26,2102**	9,2590*	9,2349**	5,3708**	4,7873**	4,7537**	9,2955	3,**0068**	2,7116	3,8761	1,4093	1,4093	3,3230	3,0117	4,5498*
Canadienne	26,7276**	9,3738	9,2880**	5,3222**	4,6766**	4,6861**	9,5873*	2,9327	2,3844	3,9576	1,3673	1,3673	3,2585	3,1868	4,9840
Br.Swiss	26,4104*	8,6499	8,7881	4,9085**	4,3116**	4,1794**	9,0198**	2,4938	2,1687	3,2544	0,6350	0,6350	2,6971	2,4830	4,1055**
Hariana	2,1789	20,2454**	21,9710**	27,1955**	27,7208**	27,2861**	20,1668**	27,4999**	27,9210	26,0504**	26,7222	26,7222	27,6726*	27,4776**	30,8615*
Ongole	3,8627	21,0338**	22,7932**	27,8500**	28,2051**	27,6989**	21,3639*	28,5247**	29,0580	27,2198**	27,8501	27,8501	28,4805	28,6127**	31,3716
Tharparkar	2,3872	20,0731**	22,3246**	27,6143**	28,0841**	27,5810**	20,1303**	27,2912**	27,6601	25,8428**	26,4634	26,4634	27,7262*	27,2171**	30,4863*
Sahiwal	3,4331	20,3308*	23,0298*	28,5227**	28,9360**	28,1472**	21,0333*	27,9969**	28,5072	26,7000**	27,3038	27,3038	28,5755	28,0628*	30,4887
Yunn. Zebu	3,0679	20,2616	21,8798	26,9089**	27,2631*	26,8944*	20,4462	27,6070*	28,0814	26,2560**	26,8814	26,8814	27,5217	27,6378*	30,6998
Nelore	**0,0000**	19,4897	21,3229	26,7112**	27,2369*	27,0164*	18,8473	26,4507**	26,8176	24,8594*	25,6275	25,6275	26,8814	26,3759*	30,0527
Lulu	13,2722*	**12,4350**	12,6496	11,3896**	11,0776	10,8295	12,2151	9,6301	9,5292	9,8470*	8,1636	8,1636	9,9367	9,7263	11,6676
W.Fulani	15,4211	0,5304	**11,8034**	7,9637	7,3038	7,4442	12,4813	8,9162**	8,9726	9,8812*	8,1941	8,1941	8,0190	9,8291	12,0403
Butana	25,0786**	3,5395**	0,4293	**3,2652**	2,3146	2,6592	11,1126**	4,8219**	4,7649	6,6645**	4,3213	4,3213	3,5580	6,1687**	8,0367*
Kenana	26,7055*	4,3287**	0,8706	0,1506	**1,0628**	1,5989	10,8465**	4,1791**	4,1705*	6,0227	3,6570	3,6570	2,6265	5,5523**	7,3514*
NDama	26,0825*	3,6781*	0,6086	0,0927	0,1336	**1,8678**	10,8375**	4,1635**	4,1550*	5,9655	3,6415	3,6415	2,8390	5,4418**	7,0996*
Jap. Black	11,9331**	-0,9166	-0,3346	2,5658**	3,4009**	2,9894**	**13,8283**	9,7015	9,6303	9,8605	8,3371	8,3371	9,8800	9,7008	11,3010
Damascus	24,9001	1,8620*	1,4638**	1,6387**	2,0970**	1,6790**	1,2367	**3,1012**	2,4667	4,3773	1,8706	1,8706	3,2482	3,6320	5,4208*
Iraq	25,2907*	1,7848	1,5440	1,6054*	2,1122*	1,6942*	1,1892	-0,6109	**3,05374**	4,1077	1,5269	1,5269	3,0717	3,2787	5,1484
Jersey	22,3780	1,1481*	1,4981*	2,5506**	3,0100**	2,5502**	0,4649	0,3453**	0,0995	**4,9627**	2,6052	2,6052	4,5492	4,2423	5,8823
Limousine	25,6275	1,9460**	2,2924	2,6887	3,1256	2,7076	1,4298	0,3200	0,0000	0,1238	**0,0000**	0,0000	2,0510	1,8381	3,5828
Ayrshire	25,6275	1,9460**	2,2924	2,6887	3,1256	2,7076	1,4298	0,3200	0,0000	0,1238	0,0000	**0,0000**	2,0510	1,8381	3,5828
Brahman	24,8304	1,6681	0,0662	-0,1256	0,0440	-0,1459	0,9148	-0,3535	-0,5062	0,0168	0,0000	0,0000	**4,1021**	3,9213	5,6966
Simmental	24,5259*	1,6588	2,0773	2,6860**	3,1708**	2,6578**	0,9366	0,2314	-0,0982	-0,0891	-0,0119	-0,0119	0,0202	**3,7001**	4,6314
S.Kore	28,5209	3,9184*	4,6068*	4,8724*	5,2883*	4,6340*	2,8551	2,3385*	2,0898	1,8693*	2,0510	2,0510	2,1138	1,2496	**3,0635**

Üst Diyagonal D, Alt Diyagonal D_A ve Diyagonal k değerlerini göstermektedir. *:P<0,05, **:P<0,01.

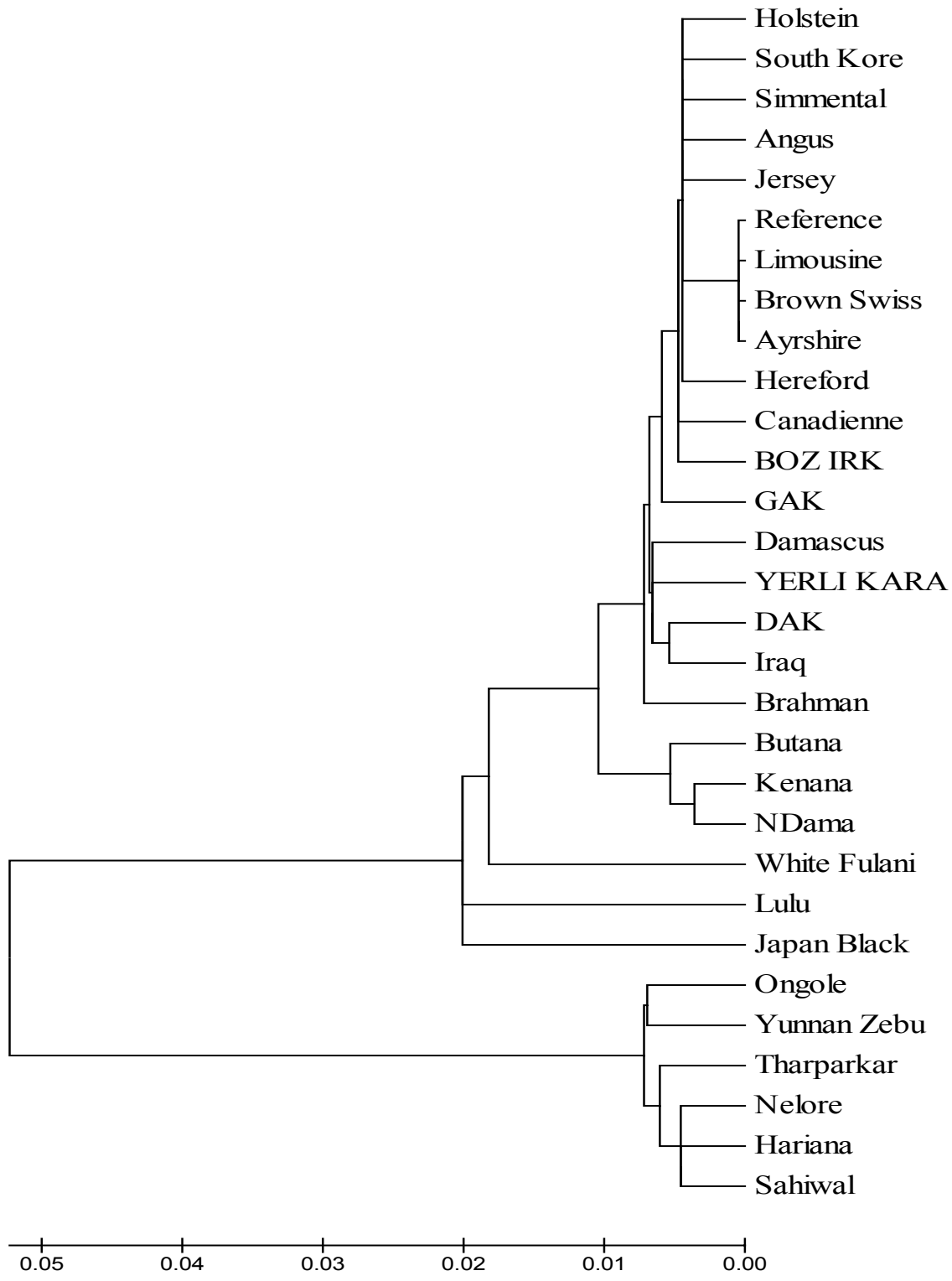
Populasyonlar arası Kimura-2 yöntemine göre elde edilen genetik mesafeler Çizelge 4.18'de sunulmuştur. Irklarımız arasında genetik mesafe değerlerinin 0,0166 ile 0,0115 arasında değişirken en uzak genetik mesafe değerinin GAK-Yerli Kara, en yakın genetik mesafe değerinin ise GAK-Bozırk populasyonları arasında olduğu görülmüştür. Bu mesafelere ait çizilen dendogram ise Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. 240 bç Dizi Analizi Sonuçlarına Ait Genetik Mesafeler (Alt diyagonal) ve Standart Hataları (Üst Diyagonal) (MEGA 3,0 programı ile)

Irklar	Ref.	Boz ırk	DAK	GAK	Y.Kara	H.ford	Holst.	Angus	Jersey	B.Swi.	Simm.	Lim.	Ayr.	Dams.	Iraq
Reference		0,0014	0,0042	0,0020	0,0035	0,0014	0,0013	0,0018	0,0022	0,0014	0,0025	0,0000	0,0000	0,0029	0,0039
Boz Irk	0,0047		0,0041	0,0028	0,0038	0,0023	0,0019	0,0025	0,0027	0,0021	0,0029	0,0014	0,0014	0,0033	0,0041
DAK	0,0103	0,0131		0,0042	0,0043	0,0042	0,0044	0,0043	0,0048	0,0045	0,0049	0,0042	0,0042	0,0039	0,0041
GAK	0,0076	0,0115	0,0152		0,0041	0,0027	0,0024	0,0029	0,0032	0,0025	0,0033	0,0020	0,0020	0,0035	0,0041
Yerli Kara	0,0109	0,0143	0,0164	0,0166		0,0038	0,0036	0,0040	0,0041	0,0038	0,0043	0,0035	0,0035	0,0042	0,0044
Hereford	0,0037	0,0079	0,0123	0,0106	0,0133		0,0019	0,0025	0,0027	0,0020	0,0029	0,0014	0,0014	0,0034	0,0041
Holstein	0,0038	0,0085	0,0140	0,0113	0,0147	0,0074		0,0024	0,0027	0,0020	0,0031	0,0013	0,0013	0,0032	0,0041
Angus	0,0055	0,0097	0,0146	0,0126	0,0154	0,0086	0,0087		0,0030	0,0023	0,0033	0,0018	0,0018	0,0035	0,0043
Jersey	0,0109	0,0154	0,0211	0,0180	0,0215	0,0144	0,0143	0,0158		0,0026	0,0035	0,0022	0,0022	0,0038	0,0045
Brown Swiss	0,0028	0,0074	0,0130	0,0103	0,0135	0,0065	0,0066	0,0083	0,0138		0,0029	0,0014	0,0014	0,0033	0,0042
Simmental	0,0080	0,0127	0,0182	0,0156	0,0185	0,0114	0,0109	0,0125	0,0181	0,0109		0,0025	0,0025	0,0039	0,0047
Limousine	0,0000	0,0047	0,0103	0,0076	0,0109	0,0037	0,0038	0,0055	0,0109	0,0028	0,0080		0,0000	0,0029	0,0039
Ayrshire	0,0000	0,0047	0,0103	0,0076	0,0109	0,0037	0,0038	0,0055	0,0109	0,0028	0,0080	0,0000		0,0029	0,0039
Damascus	0,0078	0,0111	0,0133	0,0136	0,0152	0,0101	0,0115	0,0121	0,0184	0,0105	0,0155	0,0078	0,0078		0,0041
Iraq	0,0067	0,0098	0,0108	0,0120	0,0127	0,0087	0,0105	0,0112	0,0175	0,0095	0,0143	0,0067	0,0067	0,0104	
Canadienne	0,0056	0,0097	0,0138	0,0123	0,0148	0,0088	0,0093	0,0107	0,0165	0,0084	0,0136	0,0056	0,0056	0,0121	0,0100
Brahman	0,0090	0,0123	0,0155	0,0148	0,0177	0,0116	0,0128	0,0138	0,0195	0,0118	0,0172	0,0090	0,0090	0,0138	0,0134
Lulu	0,0311	0,0351	0,0399	0,0366	0,0400	0,0337	0,0345	0,0355	0,0383	0,0333	0,0379	0,0311	0,0311	0,0373	0,0370
Japan Black	0,0337	0,0374	0,0424	0,0394	0,0425	0,0360	0,0364	0,0371	0,0401	0,0366	0,0396	0,0337	0,0337	0,0395	0,0393
South Kore	0,0157	0,0206	0,0263	0,0235	0,0263	0,0195	0,0160	0,0192	0,0253	0,0180	0,0203	0,0157	0,0157	0,0233	0,0225
White Fulani	0,0337	0,0360	0,0382	0,0375	0,0406	0,0352	0,0372	0,0375	0,0408	0,0363	0,0408	0,0337	0,0337	0,0366	0,0371
Butana	0,0183	0,0201	0,0207	0,0220	0,0245	0,0196	0,0220	0,0222	0,0282	0,0209	0,0264	0,0183	0,0183	0,0201	0,0202
Kenana	0,0160	0,0178	0,0186	0,0199	0,0226	0,0175	0,0198	0,0202	0,0259	0,0189	0,0243	0,0160	0,0160	0,0179	0,0182
NDama	0,0159	0,0179	0,0187	0,0198	0,0223	0,0174	0,0197	0,0201	0,0257	0,0183	0,0238	0,0159	0,0159	0,0178	0,0182
Tharparkar	0,1041	0,1066	0,1121	0,1066	0,1106	0,1046	0,1068	0,1058	0,1019	0,1066	0,1074	0,1041	0,1041	0,1082	0,1093
Sahiwal	0,1059	0,1085	0,1137	0,1080	0,1111	0,1064	0,1088	0,1076	0,1038	0,1076	0,1092	0,1059	0,1059	0,1094	0,1112
Ongole	0,1092	0,1114	0,1167	0,1114	0,1153	0,1096	0,1120	0,1109	0,1069	0,1109	0,1125	0,1092	0,1092	0,1126	0,1144
Nelore	0,1023	0,1048	0,1106	0,1048	0,1083	0,1027	0,1048	0,1040	0,0994	0,1057	0,1056	0,1023	0,1023	0,1063	0,1075
Hariana	0,1064	0,1087	0,1141	0,1083	0,1123	0,1068	0,1090	0,1080	0,1039	0,1088	0,1097	0,1064	0,1064	0,1101	0,1116
Yunan Zebu	0,1050	0,1072	0,1125	0,1072	0,1114	0,1054	0,1078	0,1067	0,1028	0,1071	0,1083	0,1050	0,1050	0,1086	0,1102

Çizelge 4.18. (devamı)

Irklar	Canad.	Brahm.	Lulu	J.Black	S.Kore	W.Fula.	Butana	Kenana	NDama	Tharp	Sahiwal	Ongole	Nelore	Hariana	Y.Zebu
Reference	0,0019	0,0045	0,0070	0,0070	0,0072	0,0076	0,0075	0,0080	0,0075	0,0230	0,0235	0,0238	0,0236	0,0234	0,0232
Boz Irk	0,0027	0,0046	0,0071	0,0072	0,0073	0,0074	0,0068	0,0073	0,0068	0,0227	0,0231	0,0235	0,0233	0,0230	0,0229
DAK	0,0044	0,0051	0,0079	0,0080	0,0082	0,0078	0,0063	0,0068	0,0063	0,0230	0,0234	0,0238	0,0236	0,0233	0,0232
GAK	0,0030	0,0048	0,0073	0,0074	0,0074	0,0075	0,0068	0,0071	0,0067	0,0224	0,0227	0,0232	0,0229	0,0227	0,0226
Yerli Kara	0,0041	0,0053	0,0077	0,0078	0,0078	0,0080	0,0070	0,0074	0,0070	0,0228	0,0230	0,0236	0,0233	0,0231	0,0231
Hereford	0,0026	0,0046	0,0071	0,0072	0,0072	0,0075	0,0071	0,0074	0,0069	0,0226	0,0230	0,0234	0,0232	0,0229	0,0228
Holstein	0,0022	0,0047	0,0070	0,0072	0,0062	0,0077	0,0076	0,0081	0,0076	0,0228	0,0233	0,0237	0,0234	0,0232	0,0231
Angus	0,0028	0,0048	0,0072	0,0073	0,0067	0,0077	0,0073	0,0078	0,0073	0,0225	0,0230	0,0234	0,0231	0,0229	0,0228
Jersey	0,0028	0,0049	0,0077	0,0077	0,0069	0,0079	0,0075	0,0079	0,0074	0,0215	0,0219	0,0223	0,0219	0,0218	0,0217
Brown Swiss	0,0024	0,0048	0,0072	0,0072	0,0074	0,0078	0,0077	0,0082	0,0077	0,0232	0,0235	0,0238	0,0238	0,0235	0,0233
Simmental	0,0031	0,0051	0,0074	0,0076	0,0065	0,0081	0,0079	0,0084	0,0079	0,0226	0,0230	0,0234	0,0232	0,0230	0,0229
Limousine	0,0019	0,0045	0,0070	0,0070	0,0072	0,0076	0,0075	0,0080	0,0075	0,0230	0,0235	0,0238	0,0236	0,0234	0,0232
Ayrshire	0,0019	0,0045	0,0070	0,0070	0,0072	0,0076	0,0075	0,0080	0,0075	0,0230	0,0235	0,0238	0,0236	0,0234	0,0232
Damascus	0,0035	0,0048	0,0075	0,0076	0,0076	0,0075	0,0062	0,0066	0,0061	0,0227	0,0230	0,0235	0,0232	0,0230	0,0229
Iraq	0,0042	0,0055	0,0079	0,0080	0,0082	0,0080	0,0070	0,0075	0,0070	0,0231	0,0235	0,0239	0,0237	0,0235	0,0233
Canadienne		0,0049	0,0071	0,0073	0,0073	0,0078	0,0073	0,0079	0,0073	0,0229	0,0234	0,0237	0,0235	0,0233	0,0231
Brahman	0,0139		0,0079	0,0080	0,0084	0,0067	0,0048	0,0047	0,0047	0,0227	0,0231	0,0235	0,0233	0,0231	0,0229
Lulu	0,0362	0,0388		0,0097	0,0098	0,0100	0,0094	0,0095	0,0093	0,0167	0,0169	0,0173	0,0171	0,0170	0,0169
Japan Black	0,0389	0,0404	0,0478		0,0093	0,0100	0,0091	0,0092	0,0090	0,0163	0,0169	0,0172	0,0165	0,0166	0,0166
South Kore	0,0214	0,0249	0,0464	0,0466		0,0103	0,0102	0,0106	0,0101	0,0245	0,0245	0,0249	0,0254	0,0250	0,0246
White Fulani	0,0381	0,0329	0,0499	0,0509	0,0505		0,0061	0,0057	0,0060	0,0180	0,0184	0,0185	0,0182	0,0181	0,0180
Butana	0,0223	0,0149	0,0449	0,0456	0,0345	0,0323		0,0027	0,0030	0,0222	0,0227	0,0227	0,0226	0,0223	0,0221
Kenana	0,0201	0,0115	0,0438	0,0446	0,0322	0,0298	0,0095		0,0024	0,0227	0,0231	0,0231	0,0233	0,0228	0,0225
NDama	0,0201	0,0124	0,0427	0,0446	0,0311	0,0304	0,0110	0,0070		0,0227	0,0229	0,0230	0,0232	0,0229	0,0226
Tharparkar	0,1089	0,1096	0,0786	0,0793	0,1216	0,0882	0,1098	0,1112	0,1090		0,0051	0,0055	0,0033	0,0042	0,0050
Sahiwal	0,1108	0,1114	0,0786	0,0815	0,1197	0,0895	0,1119	0,1130	0,1096	0,0150		0,0053	0,0054	0,0049	0,0051
Ongole	0,1141	0,1119	0,0822	0,0838	0,1245	0,0894	0,1099	0,1107	0,1085	0,0169	0,0161		0,0057	0,0055	0,0051
Nelore	0,1071	0,1078	0,0772	0,0754	0,1216	0,0856	0,1077	0,1093	0,1083	0,0089	0,0120	0,0146		0,0030	0,0047
Hariana	0,1111	0,1105	0,0199	0,0802	0,1244	0,0875	0,1092	0,1107	0,1088	0,0134	0,0135	0,0154	0,0078		0,0049
Yunan Zebu	0,1098	0,1078	0,0788	0,0798	0,1216	0,0854	0,1058	0,1066	0,1051	0,0142	0,0142	0,0135	0,0111	0,0129	



Şekil 4.17. 240 bç Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Sığır Irkları Arasındaki Filogenetik İlişki

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi sığır ırkları öncelikle 910 bç filogeni sonucuna benzer şekilde Bos taurus ve Bos indicus olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Bos taurus grubu içerisinde bulunan yerli ırklarımız, evciltme merkezine en yakın ırkların oluşturduğu Yakın Doğu (Iraq ve Damascus ırkları) populasyonlarına oldukça yakın bulundukları tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvanlarda çeşitli verim özellikleri bakımından başarılı bir ıslah çalışması yapılabilmesi, öncelikle genetik yapılarının iyi bir şekilde ortaya konması ile mümkün olabilir. Genetik yapının belirlenmesi çalışmalarında son yıllarda doğrudan DNA üzerinde yapılan teknikler ile önemli mesafeler alınmaya başlanmıştır. Bir çok ülkede çoğu araştırıcı, ülkelerine ait ırkların hem ıslahı, hem de yerli gen kaynağı olarak korunmasına yardımcı olmak üzere moleküler düzeyde teknikleri kullanarak DNA seviyesinde yapılan çalışmalarla çeşitli ırklara ait genetik yapı hakkında detaylı sayılabilecek sonuçlar ortaya koymuşlardır.

Polimorfizmler, mutasyonlardan farklı olarak organizmada işlev bozukluğu yapmazlar ve bir patolojiye sebep olmazlar. Mutasyon, DNA'da kalıcı değişiklik olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklik, DNA'nın tertibinde veya nükleotid zincirinde oluşan farklı bir yapılanmadır. Sığır genomunda polimorfizmler yüksek boyutta olduklarından, bu polimorfik yapıların boyutları ve nitelikleri doğru ve detaylı olarak yetiştiricilik açısından öncelikle saptanmak zorundadır.

mtDNA ile ilgili çalışmalar öncelikle mitokondrinin hücrede ve vücuttaki fonksiyonları üzerineyken, daha sonra DNA'sı üzerine yoğunlaşmıştır. Aynı şekilde hayvancılık alanında önce sitoplazmik etkiler araştırılırken, daha sonra mtDNA'sında görülen mutasyonlar farklı tekniklerle araştırılmış ve bu bulunan farklı tiplerin marker olabilme yönleri incelenmiştir.

Farklı populasyonlarda genetik varyasyonun ortaya konmasında mtDNA'yı kullanmanın en önemli nedeni; mtDNA'nın maternal kalıtım sergilemesi, rekombinasyon göstermemesi, yüksek mutasyon hızı ve bu mutasyonların belirli populasyonlarda özgün kalmasıdır.

mtDNA mutasyonları hakkında detaylı bilgi ancak RFLP ya da DNA sekans analizi yöntemleriyle sağlanabilmekte ve bu da mtDNA'nın sahip olduğu özelliklerinden faydalanılarak filogenetik analiz yapabilme imkanını sunmaktadır.

D-loop dizi analizi çalışmaları ile maternal hattı ortak bireyler arasında oluşan ve paralel mutasyonlarla açıklanamayan farklı yapıda mtDNA sergileyen haplotiplerin ortaya çıkmasında mutasyon, rastgele dağılım ve maternal geçiş gibi nedenler hakkında açıklayıcı bilgiler ortaya konması mümkün olabilmektedir.

Çalışmada D-loop bölgesinde toplam 17 tanıma bölgesine sahip 10 farklı enzim, ND5 bölgesine toplam 25 tanıma bölgesine sahip 10 farklı enzim uygulanmıştır. Uygulanan enzimlerden 6'sının her iki bölgede de kesim bölgesinin olması sebebiyle ortak kullanılmıştır.

D-loop bölgesinde 4-6 baz tanıma bölgelerine sahip 10 enzimin kullanıldığı çalışmamızda, dizi üzerinde toplam 17 tanıma bölgesiyle 74 baz çiftinin tanındığı, bununla da 910 bazlık bölge içerisinde %8'lik kısmın taranabildiği sonucuna ulaşılabilmektedir. Bölgenin yüksek mutasyon hızı dolayısıyla, dizilim üzerinde substitisyon, delesyon ya da insersiyon gibi sebeplerle dizilim sırasının değişmesi halinde enzimlerden herhangi biri için yeni tanıma bölgesi oluşacak ya da enzim mevcut kesim yerini kaybederek farklı büyüklüklere sahip fragmentler verecektir.

AluI enzimi ile incelenen tüm ırklarda B ve C formları gözlenmiştir. *HaeIII* enzimi ile GAK'larda A ve B, Yerli Kara populasyonunda A, B ve C formları, Bozırk ve DAK ırklarında ise tamamiyle A formundan oluşan monomorfik yapı görülmüştür. *HpaII* enzimi DAK populasyonunda sadece A, Bozırk'da A ve E, GAK'da A ve B, Yerli Kara'da A, B, C ve D formlarını gösterirken, Yerli Kara'da gözlenen C ve D ile Bozırk populasyonundaki E formları heteroplazmik yapı sergilemişlerdir. *AvaII* enzimi tüm ırklarda A formuna ilaveten Bozırk populasyonunda B, GAK ve Yerli Kara populasyonlarında ise C formlarını da göstermiştir. *DraI* enzimi ile Bozırk ve DAK populasyonlarında sadece A formu, Yerli Kara populasyonunda A ve C, GAK

populasyonunda ise A, B ve C formları tespit edilmiştir. *ApaI* enzimi ile GAK ve Yerli Kara populasyonları sadece A formuyla monomorfik bulunurken, DAK populasyonu A ve B formu ve Bozırk populasyonu ise A ve C formlarıyla polimorfik yapı sergilemişlerdir. *DdeI, BamHI, TaqI* enzimleri ve kesim yerine sahip olmayan *HindIII* enzimi ırklar arasında herhangi bir farklılık göstermemiştir.

Tüm populasyon genelinde D-loop bölgesi PCR-RFLP ile elde edilen ürün dizisi üzerinde toplam 20 tanıma bölgesine sahip 10 enzim ile 19 haplotip elde edilmiştir. Ele alınan enzimlerden *BamHI, TaqI* ve *HindIII* sadece A tipi, *DdeI* ise B tipi ile monomorfik bulunurken, geri kalan enzimler beklenenden farklı kesimler de oluşturmak suretiyle polimorfik yapı sergilemişlerdir.

Irklar içerisinde, Bozırk'da 6, DAK'da 3, GAK'da 8 ve Yerli Kara'da 9 haplotip görülmüştür. Bozırk'da 3, 7 ve 19, DAK'da 18, GAK'da 4, 5, 6, 15 ve 16 ve Yerli Kara'da 8, 9, 13, 14 ve 17 nolu görülen bu haplotipler ırka özgün genotipleri oluşturmuşlardır.

ND5 bölgesinde 4-6 baz tanıma bölgelerine sahip *AluI, HaeIII, BglII, SspI, DdeI, DraI, HpaII, HinfI, StuI* ve *TaqI* enzimleri kullanılmış ve dizi üzerinde 25 tanıma bölgesinin oluşturduğu toplam 110 bç'ini taraması ile 1100 bazlık bölge içerisinde %10'luk kısım incelenmiştir.

AluI enzimi incelenen tüm ırklarda A ve B formlarını sergilemiştir. *HaeIII* enzimi ile elde edilen B formu sadece GAK populasyonunda görülmüş, diğer populasyonlar A formunda monomorfik yapı sergilemişlerdir. *BglII* enzimi ile tüm ırklarda A formu sergilenirken, B formuna sadece Yerli Kara populasyonunda rastlanılmıştır. *SspI* enzimi ile Bozırk populasyonu B ve C formu sergilemiş, diğer ırklar ise B formunda monomorfik yapı göstermişlerdir. *DdeI* enzimi ile tüm ırklarımız heteroplazmik yapı oluşturarak B formunda monomorfik yapı sergilemiştir. *DraI*, *HpaII, HinfI, StuI, TaqI*

enzimleri tanıma bölgesi bakımından ırklar arasında herhangi bir kesim farklılığı oluşturmamışlardır.

AluI, HaeIII, BglII, DraI, HpaII, HinfI, StuI ve *TaqI* enzimleri gösterdikleri A formlarıyla homoplazmik bulunurken, *AluI, HaeIII, BglII* ve *DdeI* enzimleri B formunda, *SspI* enzimi B ve C formlarında heteroplazmik yapı sergilemişlerdir .

Tüm populasyon genelinde PCR-RFLP ile elde edilen ND5 dizisi üzerinde toplam 25 tanıma bölgesine sahip 10 enzim uygulanması ile 6 haplotip elde edilmiştir. Bu haplotiplerin ırklara dağılımı, Bozırk'da 3, DAK'da 2, GAK'da 4 ve Yerli Kara'da 3 adet şeklinde olmuştur. Irklar içerisinde *AluI* enziminin oluşturduğu haplotipler tüm ırklarda ve yaygın olarak gözlenirken, *SspI* enziminin belirleyici olduğu 5 nolu haplotip Bozırk, *BglII* enziminin belirleyici olduğu 2 nolu haplotip Yerli Kara, *HaeIII* enziminin belirleyici olduğu 3 nolu ve *AluI* ve *HaeIII* enzimlerinin birlikte belirleyici oldukları 6 nolu haplotipler GAK populasyonuna özgün genotipleri oluşturmuş, DAK populasyonuna ait özgün haplotip görülmemiştir.

Sığır mtDNA'sı üzerinde bir çok araştırıcı gerek tüm mtDNA'yı gerekse kısmi bölümleri üzerinde çeşitli RE enzimleri kullanarak mevcut polimorfizmi ortaya koymaya çalışmışlardır.

Watanable *et al.* (1985), Japon Shorthorn'u, Japon yerli ve Holstein ineklerine ait tüm mtDNA'ya 17 RE enziminin uygulandığı RFLP çalışmasında, *HindIII* enziminin yeni kesim yeri oluşturması ile polimorfizm bildirmişlerdir. Bhat *et al.* (1990), Holstein'da *AvaII, BamHI, BglII, HindIII, HpaI* ve *PstI* enzimleri, Bufalo'da ise *Bst I* enzimi ile polimorfizm tespit etmişlerdir. Suzuki *et al.* (1993), N'Dama, Kenyan Boran, Kenyan Zebu ve Holstein ırklarında PCR-RFLP ile yaptıkları çalışmalarında; tüm D-loop bölgesinde *ApaI, AvaII, BamHI, BstXI ve EcoNI* polimorfizm gösterirken, *AseI, DraI, HpaII, NsiI, PstI*, *SspI ve TaqI* enzimleri ise farklılık oluşturmamıştır. Enzimlerden

EcoNI N'Dama'da, *BstXI* Kenyan Boran'da, *BamHI* ve *ApaI* Kenyan Zebu'da ve *AvaII* Holstein'da polimorfik yapı sergilemişlerdir. Ayrıca inceledikleri ND5 bölgesinin 453 bç'lik kısmında 54 nükleotid dizisini tanıma kapasitesine sahip 7 enzimden *EcoRI,* sadece Holstein'larda sahip olduğu tek kesim yerinin kaybolması şeklinde polimorfizm göstermiş, *BstXI, DraI, HindIII, SnaBI*, *SpeI* ve *SspI* enzimleri ise populasyonlarda herhangi bir farklılık göstermemiştir. Loftus *et al.* (1994b), Afrika, Avrupa ve Asya'dan 13 ırk üzerinde yaptıkları çalışmalarında, *BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, HpaI* ve *StyI* RE'leri polimorfik yapı sergilerken toplam 16 haplotip bildirmişlerdir. Chen and Leibenguth (1995), Alman Siyah-Alaca ve Kırmızı-Alaca sığır ırklarından elde edilen mtDNA'lar üzerinde *HindIII, BglII, EcoRI, EcoRV ve BamHI* enzimlerinin uygulandığı çalışmada, ırklar ve aynı ırkın bireyleri arasında polimorfik bölge tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Parfitt and Huisman (1998), Afrikaner, Nguni, Brahman ve Jersey sığırlarının D-loop bölgesi üzerinde *AvaII, AspHI, BarnHI, HaeIII, MspI, PstI, SaeI, TaqI ve XbaI* enzimleri ile polimorfizm belirleyememişlerdir. Yu *et al.* (1999), 11 Çin yerli sığır ırkı mtDNA'larında, *BglII* ve *EcoRI* enzimleri ile herhangi bir kesim farklılığı bulamazlarken, *AvaI, BamHI, EcoRV, HindIII*, *HpaI, PstI, PvuII* ve *SalI* enzimlerinin ortaya çıkardığı 23 farklı kesim bölgesinin oluşturduğu 5 haplotip bildirmişlerdir. Tu *et al.* (2002), Yak mtDNA'sı üzerinde 20 RE kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *AvaI*, *AvaII, BglII, EcoRI, HindIII* ve *HpaI* enzimlerinin ortaya koyduğu polimorfizm ile 4 haplotip tanımlamışlardır. Tsuji *et al.* (2004) Holstein ve yerli sığırlar üzerinde *RsaI* enzimiyle 3 haplotip tespit etmişlerdir.

mtDNA molekülünün toplam büyüklüğü, gen transkripsiyon ve translasyon ürünlerinin varlığı ve mitokondriyal oksidatif enerji transdüksiyonunun tamamı mtDNA'daki varyasyonlar tarafından etkilenebilmektedir. Verim özellikleri üzerine olan sitoplazmik etkilerin varlığını doğru bir şekilde hesaplayabilmek için sitoplazmik genetik varyasyonu en iyi şekilde ortaya koyabilecek moleküler markerlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple büyük populasyonlarda sitoplazmik genetik etkiler moleküler analizlerle ortaya konmalı ve verim varyansı üzerine etkileri açıklanmalıdır.

Sitoplazmik varyasyondan faydalanabilmek ve aynı zamanda seleksiyonda isabet derecesini yükseltmek amacıyla, sığırlarda çeşitli verim özelliklerini nitelik ve nicelik olarak daha yükseklere çekebilmek amacıyla dünyada çeşitli ırklar üzerinde yapılan çalışmalar (Tess *et al.* 1985; Brown *et al.* 1989; Kashi *et al.* 1990; Schutz *et al.* 1993, 1994; Edwards and Page 1994; Bishop *et al.* 1995; Boettcher *et al.* 1996; Brenneman *et al.* 1996), dikkate alındığında amaçlanan hedefe ulaşmada dikkate değer sonuçların ortaya çıktığı görülmektedir. Önemli sitoplazmik etkiler mevcut yapılan hayvan yetiştiriciliğinde her ne kadar ihmal edilse de gelecekte embriyo transferi, embriyo bölme, dış dölleme vs. gibi teknikler yaygınlık kazandığında ayrı bir yer teşkil edecektir.

Çalışmamızda, ırklar genelinde yüksek frekansta görülen ve *AluI* enziminin belirleyici olduğu, D-loop bölgesinde 1 ve 10 ile ND5 bölgesinde 1 ve 4 nolu haplotiplerin verim özellikleri ile ilişkileri ve dolayısıyla ıslah amaçlı çalışmalarda marker olabilme yönleri araştırılmalıdır.

PCR-RFLP ile ortaya konulamayan aynı zamanda nükleotid seviyesindeki farklılıkları test etme imkanı sunması nedeniyle en değişken bölgeyi oluşturan D-loop bölgesi DNA dizi analizinden faydalanılmıştır. İncelediğimiz 910 bç dizilim üzerinde 26 farklı bölgede toplam 68 nükleotid faklılığı gözlenirken, bu görülen farklılıkların 47'sini transisyon, 5'ini transversiyon ve 16'sını insersiyon oluşturmuş, delesyon'a ise rastlanılmamıştır. Insersiyonlar 215. bç'nde +T ve 216-223 bç'lerindeki C serisi içerisinde +C olarak gözlenmiştir. İncelenen dizilimlerin oluşturduğu bu farklılıklar ile toplam 17 haplotip belirlenmiştir. Mevcut dizilim incelendiğinde D-loop bölgesinin orta kısmında uç kısımlara göre daha fazla mutasyon gerçekleştiği görülmektedir.

Tespit ettiğimiz mutasyonlar; Bozırk'da 6 transisyon ve 3 insersiyon ile toplam 9 mutasyon 6 bölgede, DAK ırkında 12 transisyon, 3 transversiyon ve 4 insersiyon ile toplam 19 mutasyon 10 bölgede, GAK ırkında 18 transisyon, 1 transversiyon ve 7 insersiyon ile toplam 26 mutasyon 13 bölgede, Yerli Kara ırkında 11 transisyon, 1 transversiyon ve 2 insersiyon ile toplam 14 mutasyon 11 bölgede görülmüştür.

Steinborn *et al.* (1998), 32 Avusturya sığırı D-loop bölgesi üzerinde 43 nükleotid farklılığı gözlerken, bunların 33 adetini transisyon, 5'i transversiyon, 1'ini delesyon ve 4'ünü 221 sıralı sitozin serisindeki insersiyon olarak bildirmişlerdir. Cymbron *et al.* (1999), 6 Portekiz yerli ırkını temsil eden toplam 49 sığırda D-loop bölgesinin 240 bç'lik dizi varyasyonunu inceledikleri çalışmalarında, 30 transisyon, 1 transversiyon ve 1 delesyondan oluşan 32 polimorfik bölgenin ortaya çıkardığı 26 haplotip bildirmektedirler.

Mirol *et al.* (2003), 169. bölgede gerçekleşen A→ G mutasyonunun Yakın Doğu orjinli ırkları karakterize ettiğini ve bir çok Avrupa ve Asya ırklarında G substitisyonunun tanımlandığını, 16200. bölgedeki A insersiyonunun sadece Hint orjinli ırklarda bulunduğunu, 16255. bç'deki T→C transisyonunun ise Afrika orjinli ırkları temsil ettiğini ve Afrika orjinli ırkların sahip olduğu C'nin Avrupa ve Afrika sığırlarını ayırıcı nitelik taşıdığını bildirmişlerdir. Bildirilen bu mutasyonlardan 169. bç transisyonu tüm ırklarımızda yaygın görülürken, 16255. bç transisyonunu sadece DAK ve Yerli Kara populasyonlarında tespit edilmiştir.

Çalışmamızda 910 bç'lik dizi içerisinde polimorfik bölge sayısı 26 ve haplotip sayısı 17, haplotip çeşitliliği 0,990, nükleotid çeşitliliği 0,00478 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 4,275 olarak elde edilmiştir. Irk içi varyasyon değerleri 2,685 ile 5,046 arasında değişirken, en düşük varyasyon Bozırk populasyonunda, en yüksek varyasyon ise Yerli Kara populasyonunda görülmüştür. NCBI'de bildirilenlerle beraber toplam 93 bireyin D-loop bölgesi 910 bç'lik dizisinin kullanıldığı analizler sonucunda polimorfik bölge sayısı 99 ve haplotip sayısı 76 olarak tespit edilmiş, haplotip çeşitliliği 0,992, nükleotid çeşitliliği 0,01966 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 17,361 olarak elde edilmiştir. Populasyonlar arası genetik farklılık değerlerine ait permütasyon testi sonuçları DAK ve GAK populasyonları arasında önemli ($P<0.05$) bulunurken diğer ırklar arasında herhangi bir önemlilik tespit edilememiştir.

910 bç'lik dizi üzerinden yapılan kümeleme analiz sonucunda, Bos taurus ve Bos indicus ırkı sığırlar önce iki büyük ana kümeye ayrılmaktadırlar. Yerli ırklarımızın tamamı Bos taurus kümesi içerisinde bulunurken, Bozırk referansın içerisinde bulunduğu Avrupa ırklarına yakın bulunmuş, GAK, Yerli Kara ve DAK belirtilen sırayla NDama, Butana ve White Fulani gibi Afrika orjinli ırkların oluşturdukları alt grup ile Avrupa ırkları arasında bir pozisyon sergilemişlerdir.

Mannen *et al.* (1998), 32 Japon yerli sığırının D-loop bölgesi dizilimini inceledikleri çalışmalarında 18 haplotip tespit ederlerken, diğer ırklarla oluşturdukları filogenetik analiz sonucunda Avrupa, Afrika ve Japon grubu olmak üzere üç ayrı kümenin oluştuğu ve birkaç yerli Japon sığır ırkının Avrupa ve Afrika ırkları ile aynı gruplar içerisinde bulunduğunu ve ayrı küme oluşturan diğer Japon yerli sığırlarına ait Japon grubunun Doğu Asya'ya getirilen ilk evcil sığırların kanıtı sayılabileceğini bildirmişlerdir.

Yerli ırklarımıza ait D-loop bölgesi 240 bç'lik dizilimin analizi sonucunda polimorfik bölge sayısı 37 ve haplotip sayısı 39, haplotip çeşitliliği 0,957, nükleotid çeşitliliği 0,014 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 3,364 olarak elde edilmiştir. Yerli ırklarımıza ait varyasyon değerleri 2,107 ile 4,323 arasında değişirken en düşük varyasyon Bozırk populasyonunda, en yüksek ise Yerli Kara populasyonunda görülmüştür. NCBI'de bildirilen 30 ırka ait 267 bireyin dizisinin kullanıldığı analizde, polimorfik bölge sayısı 68 ve haplotip sayısı 69, haplotip çeşitliliği 0,932, nükleotid çeşitliliği 0,0323 ve eşleştirilmiş faklılıklar ortalaması 7,342 olarak elde edilmiştir. Yerli ırklarımızın diğer Bos taurus populasyonlarıyla karşılaştırıldığında yüksek varyasyon değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Populasyonlar arası genetik farklılık değerlerine ait permütasyon testi sonucunda DAK-Bozırk ve DAK-GAK populasyonları önemli derecede ($P<0.05$) farklı bulunurken, GAK-Bozırk, Bozırk-Yerli Kara, GAK-Yerli Kara ve DAK-Yerli Kara arasında herhangi bir önemlilik tespit edilememiştir.

Irklarımız arasında en yakın genetik mesafe değerinin GAK-Bozırk populasyonları arasında olduğu görülmüştür. Bozırk ve GAK populasyonları incelenen Avrupa ırklarına daha yakın değerler sergilerken, DAK ve Yerli Kara populasyonları Avrupa ve

Afrika orjinli ırklar arasında yer teşkil etmişlerdir. Avrupa ırklarına uzaklık değerleri göz önüne alındığında sıralamanın sırasıyla Yerli Kara, DAK, GAK ve Bozırk şeklinde olduğu görülmüştür. Bu sonucun iki nedeni olabilir; ilki Yerli Kara ve DAK populasyonlarının daha geniş bir çevreye yayılım göstermeleri ve bu ırklarla ilgili geçmişten bu güne kadar etkili bir seleksiyon ve melezleme gibi çalışmaların yapılmadığı sonucuna varılabilir. Ancak Bozırk ve GAK populasyonlarının üzerlerinde geçmişte az da olsa seleksiyon yapılma ihtimali taşıdıkları söylenebilir. İkinci neden ise, Bozırk ve GAK populasyonlarının Avrupa ırklarına atalık ettikleri ve o ırkların oluşmasında etkilerinin olabileceği, Yerli Kara ve DAK populasyonlarının da ayrıca Afrika ırklarına yakın bulunmaları dolayısıyla bu ırkların anneleri olabileceği izlenimini vermektedir.

240 bç'lik dizi üzerinden yapılan kümeleme analiz sonucunda 910 bç filogeni sonucuna benzer şekilde Bos taurus ve Bos indicus olmak üzere iki büyük gruba ayrılmaktadırlar. Bos taurus grubu içerisinde bulunan yerli ırklarımız, evciltme merkezine en yakın ırkların oluşturduğu Yakın Doğu (Iraq ve Damascus) populasyonlarına oldukça yakın bulundukları görülmüştür. Afrika orijinli ırkların (Butana, White Fulani, Kenana) Bos indicus ve Bos taurus ırkları arasında yer alarak hibrit oldukları Loftus *et al.* (1999), Troy *et al.* (2001) ve Bruford *et al.* (2003) gibi araştırmacıların bildirdiği şekilde bir kez daha ortaya konmuştur. Bos indicus populasyonları (Tharparkar, Yunan Zebu, Ongole, Hariana, Sahiwal, Nelore) diğer bir grubu oluştururken, yerli ırklarımıza oldukça uzak durdukları tespit edilmiştir.

Troy *et al.* (2001), 383 Bos taurus'a ait 240 D-loop dizisini inceledikleri çalışmalarında, 77 polimorfik bölgeye sahip 152 haplotip tespit etmişler ve Avrupa sığırlarının Yakın Doğu orjinli olduklarını belirlemişlerdir. Orijinal bir merkezden gelen genetik lokusların daha fazla atasal varyansa ulaşması ve daha yüksek haplotip ve nükleotid çeşitliliği göstermesi beklenmesi gerektiğini, nitekim Orta Doğu ve Anadolu orjinli ırkların incelenen diğer ırklar içerisinde en yüksek çeşitliliğe sahip olduklarını bildirmektedirler. Eşleştirilmiş farklılıklar ortalamasını; Orta Doğu ırklarında 3,97, Anadolu ırklarında

3,49, Afrika'da 2,09 ve Avrupa ırkları için ise Orta Avrupa'da 1,92, Britanya'da 2,68 ve Batı Avrupa'da 1,47 olarak bulunmuştur.

Araştırmada PCR-RFLP ve DNA dizi analizi ile yerli sığır ırklarına ait mtDNA üzerinde yüksek sayıda polimorfik bölge tespit edilmiştir. Bunun en önemli nedeni ülkemizin çoğrafi konum itibariyle evciltme merkezlerinden biri olan Yakın Doğu (Mezopotamya) bölgesine (Loftus *et al.* 1994a) komşu olması gösterilebilir. En azından çalışmada kullanılan maternal hatların oluşturduğu varyasyonun yüksek değer göstermesi ilgili ırkların mtDNA polimorfizmi bakımından seleksiyon ve melezleme gibi klasik ıslah metodlarından henüz fazla etkilenmediğini göstermektedir. Bununla beraber mtDNA gibi kendine has kalıtsal özellikler taşıyan bir unsura dayalı yapılabilecek çalışmalar, her geçen gün azalan gen kaynaklarına ait örnekleme yapılmasındaki artan zorluklar sebebiyle sağlıklı bir çalışma yapılamamasını ve dolayısıyla güvenilir sonuçlar elde etmeyi riske atmaktadır.

Populasyonlara ait en doğru filogeni mtDNA, Y-kromozomu ve otozomal varyasyonların (Mikrosatellit, Single Nucleotide Polymorphism vs.) birlikte incelenebildiği analizlerle elde edilebilir. Çünkü hem nükleer DNA hem de maternal kalıtım sergileyen mtDNA kendilerine özgü bir takım avantajlara sahiptirler ve bilgileri beraber kullanıldığı taktirde en doğru sonucu sunacaklardır.

Bir taraftan çiftlik hayvanları ürünlerine artan talep, bir taraftan özellikle alt gelir gruplarının ucuza üretebileceği, çevreye uyumlu özel genetik yapıya erişmiş yerli ırkların hızla yok olması, çok acil olarak yerli ırklar için koruma planlarının oluşturulması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Çalışmada tespit edilen polimorfik yapıların daha sonraki çalışmalarda nötral olup olmadıklarının ya da haplotiplerin hayvanların çeşitli verim yönlerinde ıslahı amacıyla kullanılabilme yönleri araştırılabilir, yerli gen kaynaklarının korunmasında genetik varyasyondan yararlanma imkanları için öncülük edebilir sonuçlar ortaya koymuştur.

Bu çalışma, Türkiye'de, Türkiye yerli sığır ırklarında mtDNA bazında yapılmış moleküler çalışmalardan ilkidir. İncelenen PCR-RFLP yöntemiyle iki genetik bölgede ve D-loop bölgesine uygulanan sekans analizleri ile genetik varyasyonun oldukça yüksek bulunduğu ve mevcut verilerin genetik çeşitlilik için beklenen bir model yapı sergilediği ifade edilebilir. Elde edilen sonuçlar, bölgelerde mevcut populasyonlardaki polimorfizmin boyutlarını ortaya koyması yönünden yeterli sayılabilir. Bu ve benzeri çalışmalara mtDNA yanında nükleer DNA varyasyonlarının da ortaya konulduğu çalışmalarla istatistiksel açıdan tam güvenilirlik düzeyine ulaşıncaya kadar devam edilmesi ve yerli ırklarımıza ait genetik veri tabanının genişletilmesi gerektiği önerilebilir.

KAYNAKLAR

Akın, O., 2002. Evcil Hayvan Genetik Kaynakları Koruma Projesi; Proğram Değerlendirme Toplantısı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Hayvancılık ve Su Ürünleri Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara.

Altınalan A., 2005. Türkiye'deki Yerli Sığır Irklarının Mikrosatellit DNA Markerlarla Genetik Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Dokrora Tezi. Adana.

Anderson, S., De Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. and Young, I.G., 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. J. Mol. Biol. 156, 683-717.

Anonim, (2005). http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=73 (10.11.2005)

Anonymous, 1993. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 1st Ed.. FAO, Rome.

Anonymous, 1995. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 2nd Ed. FAO. Rome.

Avise, J.C., 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution promted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. Annual Rev. Genetic. 25:45-69.

Bell, B.R., McDaniel, B.T. and Robinson, O.V., 1985. Effects of cytoplasmic inheritance on production traits in dairy cattle. J. Dairy Sci. 68:2038-2051.

Benedictis, G.D., rose, G., Carrieri, G., De Luca, M., Falcone, E., Passarino, G., Bonafe, M., Monti, D., Baggio, G., Bertoloni, S., mari, D., Mattace, R. and Franceschi, C., 1999. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with succesful aging and longevity in humans. The FASEB Journal. 13:1532-1536.

Berkman, C.C., 2001. Ras1, Rag1, Rag3' and IGF2 RFLP Analysis of Some Hatchery Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Populations in Turkey. A Thesis Submitted to Graduade School Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. Ankara.

Bhat, P.P., mishra, B.P. and Bhat, P.N., 1990. Polymorphism og mitochondrial DNA (mtDNA) in cattle and buffaloes. Biochem. Genet. 28:311.

Bishop, M.D., Hawkins, G.A., and Keener, C.L., 1995. Use of DNA markers in animal selection. Theriogenology, 43:61.

Boettcher, P.J., Stevering, D.W.B., Beitz, D.C., Freeman, A.E. and McDaniel, B.T. 1996. Multiple herd evaluation of the effects of material lineage on yield traits of Holstein cattle. J. Dairy Sci. 79:655.

Bogenhagen D. F., 1999. Repair of mtDNA in vertebrates. Am.J.Hum.Genet. 64: 1276-1281.

Brenneman, R.A., Davis, S.K., Sanders, J.O., Burns, B.M., Wheeler, T.C., Turner, J.W. and Taylor, J.F., 1996. The polled locus maps to BTA1 in a Bos indicusx Bos Taurus cross. J. Hered. 87:156.

Brown, D.R., DeNise, S.K. and McDaniel, R.G., 1988. Mitochondrial respiratory metabolism and performance of cattle. J. Anim. Sci. 66:1347.

Brown, W.M., George, M.JR and Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci.USA 76, 1967-71.

Brown, W.M., Koehler, C.M., Lindberg, G.L., Freeman, A.E., Mayfield, J.E., Myers, A.M., Scutz, M.M. and Beitz, D.C., 1989. Molecular analysis of cytoplasmic genetic variation in Holstein cows. J. Anim. Sci. 67: 1926-32.

Bruford, M. W., Bradley, D.G., and Luikart, G. 2003. DNA Markers Reveal The Complexity of Livestock Domestication. Nature Review Genetics 4: 900-910.

Cann, R. L., Stoneking, M. and Wilson, A.C., 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature, 325:31-36.

Carracedo, A., Bar, W., Lincoln, P., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P., Budowle, B., Brinkman, B., gill, P., Holland, M., Tully, G. and Wilson, M., 2000. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Science İnternational. 110: 79-85.

Carvajal-Carmona, L.G., Bermudez, N., Olivera-Angel, M., Estrada, L., Ossa, J., Bedoya, G. and Ruiz-Linares, Andres., 2003. Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in colombian Criollo cattle (Bos taurus). Genetics, 165:1457-1463.

Chen, H. and Leibenguth, F., 1995. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of three farm animal species: cattle, sheep and goat. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 111B, 4: 643-649.

Cummins, J., 1998. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. Reviews of Reproduction, 3:172-182.

Cunningham, P., 2003. Gene based tecnologies for the livestock industries in the third millennium. İnternational Symposium on Applications of Gene-based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries, 6-10 October 2003, Vienna.

Cymbron, T., loftus, R.T., Malheiro, M.I. and Bradley, D.G., 1999. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Porteguese cattle. Proc. Royal Soc. Lond. Biol. Sci., 266: 597-603. (Abst).

Danan, C., Sternberg, D., Van-Steirteghem, A., Cazaneuve, C., Duguesnoy, P., Besmond, C., Gossens, M., Lissens, W. and Amselem, S., 1999. Evaluation of paternal mitochondrial inheritance in neonates born after intracytoplasmic sperm injection. American J. Human Genet. 65:463-473.

Doğru, Ü., 1994, Esmer, Siyah-Alaca, Sarı-Alaca ve Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırklarının bazı polimorfik kan ve süt proteinleri bakımından genetik yapısı ve bazı verim özelliklerine göre bunların farklılıkları. Doktora tezi, Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Zootekni Bölümü, Erzurum.

Edwards, M.D. and Page, N.J., 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. Theor. Appl. Genet. 88:376.

Epstein, H., 1971. The origin of the domestic animals of Africa. Vol.1. Africana Publishing Corp. New York.

Epstein, H. and Mason, I.L., 1984. Cattle. In: Evolution of Domesticated Animals. 6-7. Longman, New York.

Ertuğrul, M., Akman, N., Dellal, G., Goncagül, T. 2000. Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması ve Türkiye Hayvan gen Kaynakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi. 17-21 Ocak 2000 Ankara.sayfa:285-300.

Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An İntegrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Evolutionary Bioinformatics Online.

Felsentein, J., 1993. PHYLIP. Phylogeny inference package. Version 3.5c. department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle, WA.

Freeman, A.E., 1995. Overview of Dairy Cattle Breeding. Web site: www.extension.iastate.edu/pages/dairy/reports95/breeding/dsl-22.pdf (12.02.2003)

Gardner, E.J., Simmons, M.J., and Snustad, D.P., 1991. population and Evolutionary Genetics: Principles of Genetics, 8th, Edt. John Wiley and Sons, Inc. United States.

Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C. and Irvin, K.M., 2002. Identification of genetic markers for growth and carcass traits in beef cattle. The Ohio State University Department of Animal Sciences. http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170_5.html. (25.02.2004).

Gene Codes Corporation. (1999) Sequencher: A Genetic Analysis Software Release 4.5 Gene Codes Corporation: Ann Arbor.

Hall, S.J.G. and Bradley, D.G., 1995. Conserving Livestock Breed Diversity. Trends in Ecology and Evolution. 10(7):267-270.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hauswirth, W.W. and Laipis, P.J., 1982. Mitochondrial DNA polymorphism in material lineages of Holstein cows. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4686-90.

Hecht, W., 1990. Studies on mitochondrial DNAin farm animals. In genome Analysis in Domestic Animals, 259-268.

Henkes, L.E., Silva Jr, W.A., Moraes, J.C.F. and Weimer, T.A., 2005. Mitochondrial control region genetic diversity and maternal ancestry of a Brangus-Ibage cattle populations. Genetics and Molecular Biology, 28(1): 60-66.

Hiendleder, S., Kaupe, B., Wassmuthic, R., Janke, A. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep are derived from two ancestral maternal sources:no evidence for contributions from urial and argali sheep. Journal of Heredity. 89: 113-120.

Huizinga, H.A., Korver, S., McDaniel, B.T. and Politiek, R. 1986. Material effects due to cytoplasmic inheritance in dairy cattle. Influence on milk production and reproductive traits. Livest. Prod. Sci.15:11.

Hwank, U-W. and Kim, W., 1999. general properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. Korean Journal of Parasitology, 37 (4): 215-228.

Iontek Ltd. Şti. Meridyen İş Merkezi, Ali Rıza Gürcan Cad.Çırpıcı Yolu No 1/410, Merter 34010. İstanbul .www.iontek.com.tr (24.04.2005).

Jones, D.H. and Rosano, T.G. 1972. Studies of mitochondrial development prior to lactogenesis in the mouse mammary gland. Arch. Bioche. Biophys. 153:130.

Kaneda, H., Hayashi, J.I., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K.F. and Yonekawa, H., 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92 4542–4546.

Kashi, Y., Hallerman, E. and Soller, M., 1990. Marker-asisted selection of candidate bulls for progeny testing program. Anim. Prod. 51:63.

Kennedy, B.W., 1986. A furter look at evidence for cytoplasmic inheritance of production traits in dairy cattle. J. Dairy Sci.69 (12) 3099-3105.

Kim, K., Lee, J.H., Lee, S.S. and Yang, Y.H., 2003. Phylogenetic relationships of Northeast Asian cattle to other cattle populations determined using Mitochondrial DNA D-Loop sequence polymorphism. Biochemical genetics, (41) ¾, 91-98.

Kumar, S., Tamura, K, and Nei, M., 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.

Küfrevioğlu, İ., Şahin, F., Pirim, İ., Çiftci, M., Polat, M.F., Oral, B., Özmen, İ. and Adıgüzel, A., 2000. Atatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, 15-20 Mayıs 2000.

Lai, S.J., Liu, P.Y., Liu, X.Y., Li, W.X. and Yao, G.Y., 2005. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. Molecular Phylogenetics and Evolution. (article in press: www.elsevier.com/locate/ympev).

Lan, H. and Shi, L., 1993. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in Southwest China: an approach from mitochondrial DNA polymorphism. Biochemical Genetics, 31:1/2, 51-60.

Lightowlers, R.N., Chinnery, P.F., Turnbell, D.M. and Howell, N., 1997. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. TIG 13: 450-455.

Lin, C.Y., McAllister, A.J., Batra, T.R., Lee, A.J., Roy, G.L., Vesely, J.A. and Winter, K.A., 1982. Comparison of purebred and crssbred heifer reproduction and disposal. J. Dairy Sci. 65(Suppl.1) :91.

Loftus, R.T., Machugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M. and Cunningham, P., 1994a. Evidence for Two Independent Domestications of cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2557-2761.

Loftus, R.T., Machugh, D.E., Ngere, L.O., Balain, D.S., Badi, A.M., Bradley, D.G and Cunningham, P., 1994b. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. Anita. Genet. 25, 265.

Loftus, R. T., Ertugrul, O., Harba, A. H., El-Barody, M. A. A., Machugh, D. E., Park, S. D. E., Bradley, D. G., 1999. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. Molecular Ecology 8: 2015–2022.

Luikart, G., Gielly, L., Excoffier, L., Vigne, J.D., Bouvet, J. And Taberlet, P., 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. PNAS Vol. 98 (10) 5929. Web site: (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas. 091591198) (25.02.2004)

MacHugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., Bradley, D.G. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurin and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos Indicus*). Genetics 146: 1076-1086.

Manfredi, G., Thyagarajan, D., Papadopoulou, L.C., Pallotti, F. And Schon, E.A., 1997. The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. Am. J. Hum. Genet. 61:953-960.

Mannen, H., Morimoto, M., Oyama, K., Mukai, F. and Tsuji, S., 2003. Identification of mitochondrial DNA substitions related to meat quality in Japanese Black cattle. J. Anim. Sci. 81:68-73.

Mannen, H., Tsuji, S., Loftus, R.T. and Bradley, D.G., 1998. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese Black cattle. Genetics (150) 1169-1175.

Meghen, C., Machugh, D.E. and Bradley, D.G., 2002. Genetic characterization and West African cattle. Web site:(www.fao.org/docrep/t1300t/genetic%20characterization e html (16.01.2004).

Mirol, P.M., Giovambattista, G., Liron, J.P. and Dulout, F.N., 2003. African and European mitochondrial haplotypes in South American Creole cattle. Heredity (91) 248-254.

NCBI, 2005. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (14.11.2005).

Nei M. and Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. 76:5269-5273.

Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, USA.

Özhan, M., Tüzemen, N. and Yanar, M., 2004. Büyükbaş Hayvan Yetiştirme. Atatürk Üniversitesi Ziraat fakültesi Ofset tesisi, Erzurum.

Özkan, E., 2005. Türkiye'de Yetiştirilen Yerli ve Kültür Sığır Irklarının Genetik Yapılarının Mikrosatelitler ile İncelenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Doktora Tezi. Tekirdağ.

Öztaş, S. ve Yakan, B., 2000. Mitokondriyon ve Mitokondriyal DNA Patolojileri. Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Ofset tesisleri, 1-75. Erzurum.

Parfitt, S.C. and Huisman, H.H., 1998. Mitochondrial DNA Analysis of Two Southern African Indigenious Cattle Breeds. South African Journal of Animal Science, Vol.28, Issue 2.

Pfeiffer, I., Voelkel, I. and Breing, B., 2005. Phylogenetics of the European Dahomey miniature cattle based on mitochondrial D-loop region DNA sequence.İnternational Society for Animal genetics, Anim. Genet. 36;179-181.

Poulton, J., Macaulay V. and Marchington D.R., 1998. Is the bottleneck cracked? Am. J. Hum. Genet. 62:752-757.

Reed, P.D., and VanVleck, L.D., 1987. Lack of evidence of cytoplasmic inheritance in milk production traits of dairy cattle. J. Dairy Sci. 70:837-841.

Richter, C., 1988. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? FEBS lett 241:1-5.

Robison, O.W., McDaniel, B.T. and Rincon, E.J., 1981. Estimation of direct and maternal additive and heterotic effects from crossbreeding experiments in animals. J. Anim. Sci. 52:44.

Rokas, A., Ladoukakis, E. and Zouros, E., 2003. Animal mitochondrial recombination revisited. TRENDS in Ecology and Evolution, 18 (8):411-417.

Ron, M., Yoffe, O. and Weller, J.I., 1993. Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. Animal Genetics (24) 183-186.

Rosano, T.G., Lee, S.K. and Jones, D.H., 1976. Developmental changes in mitochondria during the transition into lactation in the mouse mammary gland.

II. Membrane marker enzymes and membrane ultra-structure. J. Cell Biol. 69:581.

Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R., 2005. DNAsp. DNA Sequence Polymorphism, version 4.10. Barcelona 08071, Spain.

Saara, F., 1999. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA: Detection of mutations in patients with occipital stroke. Oulu University Library, Finland.

Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol.Biol.Evol. 4:406-425.

Sarma, M.H., 1975. A study of mitochondrial DNA replication during the biogenesis of mitochondria in the developing mouse mammary gland. Diss. Abstr. Int. 36:215.

Schutz, M.M., Freeman, A.E., Beitz, D.C. and Mayfield, J.E., 1992. The importance of maternal lineages on milk yield traits of dairy cattle. J. Dairy Sci. 75:1331-1341.

Schutz, M.M., Freeman, A.E., Lindberg, G.L. and Beitz, D.C., 1993. Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. J. Dairy Sci. 76, 621-9.

Schutz, M.M., Freeman, A.E., Lindberg, G.L.,Koehler, C.M. and Beitz, D.C., 1994. The effect of mitochondrial DNA on milk production and healt of dairy cattle. Livest. Prod. Sci. 37, 283-95.

Silva, E.P. and Russo, C.A.M., 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. Hydrobiologia, 120: 119-135.

Siminiar, H., Marti, S.B., Gibson, J., Hanotte, O., Rege, J.E.O., 2003. An approach to the optimal allocation of conservation funds to minimize loss of genetic diversity in livestock breeds. Ecological Economics 45: 377-392.

Smith, L.C. and Alcivar, A.A., 1993. Cytoplasmic inheritance of its effects on development and performance. J. Reprod. Fertil. 48:31-43.

Solak, M., Bağcı, H., Şengil, A.Z. and Öztaş, S., 2000.Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel Bilgiler). Afyon Kocatepe Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı, Yayın No:5, Afyon.

Soysal, İ.M., 2004. Türkiye Yerli Hayvan Genetik Kaynaklarımız. Autochthonous Breeds of Domestic Animals in Turkey. Tekirdağ.

Soysal, M.İ., Togan, İ., Nizamlıoğlu, M., Ergüven, A., Altunok, V., Tuna, Y.T., Özkan, E., Gürcan, K., Bulut, Z. and Koban, E., 2001. Türkiye yerli ve melez koyun ırklarının genetik yapılarının mikrosatellitlerle incelenmesi. VHAG-1553, TÜBİTAK.

Steinborn, R, Müler, M. and Brem, G. 1998. Genetic variation in functionally important domains of the bovine mtDNA control region. Biochimica et Biophysica Acta. 1397:295-304.

Sutarno, J.M., Cummins, J. Greefff., Lymbery, A.J., 2002. Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef cattle. Theriogenology, 57, 1603-10.

Suzuki, R., Kemp, S.J. and Teale, A.J., 1993. Polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA polymorphism in N'Dama and Zebu Cattle. Anita. Genet. 24: 339-343.

Şahin, F., Çiftci, M. and Pirim, İ., 2000. Atatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, 15-20 Mayıs:18-26.

Tajima, F. 1983 Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. Genetics 105: 437-460.

Takeda, K., Satoh, M., Neopane P., Kuwar, B.S., Joshi, H.D., Shrestha, N.P., Fujise, H., Tasai, M., Tagami, T. and Hanada, H., 2004. Mitochondrial DNA analysis of nepalese domestic dwarf cattle Lulu. Anim. Sci. J. 75:103-110.

Tess, M.W., Reodecha, C. and Robison, O.W., 1987. Cytoplasmic genetic effects on preweaning growth and milk yield in Hereford cattle. J.Anim.Sci. 65:675-684.

Tess, M.W. and Robison, O.W., 1990. Evaluation of cytoplasmic genetic effects in beef cattle using an animal model. J.Anim.Sci. 68:1899-1909.

Tess, M.W. and MacNeil, M.D., 1994. Evaluation of cytoplasmic genetic effects in Miles City Line 1 Hereford cattle. J.Anim.Sci. 72:851-856.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997. The Clustal X Windows İnterface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24:4876-4882.

Troy, C.S., MacHugh, D.E., Balley, J.F., Magee, D.A., Loftus, T.R., Cunningham, P., Chamberlain, A.T., Sykes, B.C., Bradley, D. G. 2001. Genetic evidance for Near-Eastern origins of European cattle. Nature. 410: 1088-1091.

Tsuji S., Mannen H. Mukai F. Shojo M. Oyama K. Kojima T. Kano C. Kinoshita Y. and yamaguchi E. 2004. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by Mitochondrial DNA sequence polymorphism. J.Dairy Sci. 87:3071-3075.

Tu, Z.C., Qiu, H. and Zhang, Y.P., 2002. Polymorphism in mitochondrial DNA (mtDNA) of Yak (Bos Grunniens). Biochemical Genetics, 40: 5/6;187-193.

Uphold, W.B. and Dawid, I.B., 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop region. Cell, 11:571-583.

Wallace, D.C., 1994. Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. J.Bioenerg Biomembr 26:241-250.

Wallace, D.C., 1995. Mitochondrial DNA variations in human evolution and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:8739-8746.

Watanable, T., Hayashi, Y., Semba, R. and Ogasawara, N., 1985. Bovine mitochondrial DNA polymorphism in restriction endonuclease cleavage patterns and the location of the polymorphic sites. Biochem. Genet. 23, 947-957.

Yu, Y., Nie, L., He, Z.Q., Wen, J.K., Jian, C.S. and Zhang, Y.P., 1999. Mitochondrial DNA variation in cattle of South China: origin and introgression. Animal genetics, (30) 245-250.

Zhang, Y.P. and Shi, L.M., 1992. Mitochondrial DNA polymorphisms in animals: a review. Zoological Research 13:3, 289-98

ÖZGEÇMİŞ

01.08.1976'da Adıyaman ili Gölbaşı ilçesinde doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Belören İlköğretim okulunda, Lise öğrenimini Gölbaşı Lise'sinde tamamladı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümünden 1998 yılında başarıyla mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimine başladı. Aynı Anabilim Dalında yapılan Araştırma Görevliliği sınavını kazanarak Ocak 1999'da göreve başladı. Halen aynı anabilim dalında görevini sürdürmektedir.