

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Cihan (TABAK) BAKLACI**

**TÜRKİYE YERLİ SIĞIR IRKLARININ BÜYÜME HORMON GENİ  
POLİMORFİZMİ**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2005**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE YERLİ SIĞIR IRKLARININ BÜYÜME HORMON GENİ  
POLİMORFİZMİ**

**Cihan (TABAK) BAKLACI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez ....../...../..... Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Prof. Dr. Numan ÖZCAN  
DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
ÜYE

Prof. Dr. Tamer KAYAALP  
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Zootekni Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

**Kod No :**

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ  
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.  
Proje No: ZF2003YL62**

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

**ÖZ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRKİYE YERLİ SIĞIR IRKLARINDA BÜYÜME HORMON GENİ  
POLİMORFİZMİ**

**Cihan (TABAK) BAKLACI**

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. Numan ÖZCAN  
Yıl :2005. Sayfa: 62  
Jüri :Prof. Dr. Numan ÖZCAN  
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
Prof. Dr. Tamer KAYAALP

Bu çalışmada PCR-RFLP yöntemi kullanılarak beş Anadolu yerli sığır ırkı ve bir kültür sığır ırkının, büyüme hormonu geni polimorfizmi bakımından gen ve genotipik frekansları belirlendi. Yerli ırklardan Boz Irk (BI), Yerli Kara (YK), Yerli Sarı (YS), Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ve Kilis (Ki) sığırları ile egzotik bir ırk olan Siyah Alaca (SA) sığırlarından olmak üzere toplam 125 genomik DNA örneği alındı ve büyüme hormonu geni polimorfizmi bakımından incelendi. Analizde *Msp I* enzimi kullanıldı. RFLP işlemi sonucunda üç genotip elde edildi. Alleller birbirlerine kodominant olduklarından elde edilen genotipler AA, AB ve BB olarak harflendirildi. Tüm popülasyonlar genelinde AA genotipinin 0.31, AB genotipinin 0.63 ve BB genotipinin 0.06 frekanslarına sahip olduğu bulundu. Irklar düzeyinde ise AB genotipinin frekansının SA'da 0.95, Ki'de 0.85 ve DAK'da 0.72'de görüldü. Beş Anadolu yerli ırkında BB genotipinin varlığına rastlandığı halde SA egzotik ırkında hiç BB genotipine rastlanmadı. Tüm popülasyonlar genelinde A allelinin gen frekansı 0.628, B allelinin gen frekansı 0.372 bulundu. Polimorfik allel (B) bakımından en yüksek frekansa (q) sırasıyla Ki (0.525), SA (0.475) ve DAK(0.417) ırklarının sahip olduğu görüldü. Tüm ırklar için hesaplanan gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ), beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ) değerlerinden yüksek bulundu. Popülasyonların ortalama  $H_o$  değerinin (% 63)  $H_e$  (%47) değerinden yüksek oluşu popülasyonların yüksek genetik çeşitliliğini göstermesi bakımından önemli bulundu. Hardy-Weinberg dengesine göre Ki ve SA popülasyonları dışındaki diğer popülasyonlar dengede bulundu ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.05$ ). Yapılan istatistiksel analizde polimorfik allelin görülme sıklığının tesadüfi değil ırklara göre değiştiği bulundu ( $p = 0.0209$ ). Irkların polimorfik allel dağılımı bakımından birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda Ki-YS, Ki-BI, SA-YS, SA-BI ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.05$ ) ve DAK-BI ( $p < 0.05$ ) ırklarının birbirlerinden farklı oldukları görüldü. Ki ve SA ırkları q allel frekansı bakımından yüksek grupta yer aldı.

Daha önce yapılan çalışmalarda q allelinin *B. indicus*'dan köken aldığı ve yüksek süt veriminden sorumlu olduğu bildirilmiştir. SA'nın ve yerli ırklarımızdan Ki ve DAK'ın diğer ırklara göre daha yüksek oranda *B. indicus* genine sahip oldukları söylenebilir. Ki ve SA'nın diğer Anadolu ırklarına göre yüksek süt verimine sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışma bireysel verim kayıtları ile bGH (sığır büyüme hormonu) genindeki polimorfizmler arasındaki ilişkinin incelenebilir olduğunu gösteren bir ön çalışma niteliindedir.

Bu çalışma Anadolu yerli sığır ırklarının ve egzotik bir ırk olan SA ırkının bGH gen lokusu bakımından genetik çeşitliliğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Büyüme hormonu geni polimorfizmi, Anadolu yerli sığır ırkları, PCR-RFLP.

**ABSTRACT**  
**MSc THESIS**

**BOVINE GROWTH HORMONE GENE POLYMORPHISM IN  
TURKISH INDIGENOUS BREEDS**

**Cihan (TABAK) BAKLACI**

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor :Prof. Dr. Numan ÖZCAN  
Year :2005, Pages: 62  
Jury :Prof. Dr. Numan ÖZCAN  
Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
Prof. Dr. Tamer KAYAALP

In the present study it was determined that genotype and allele frequencies for bovine growth hormone gene polymorphisms of five Turkish indigenous breeds and one exotic breed by PCR-RFLP methodology. A total of 125 genomic DNA isolated from five Anatolian breeds (YK-Anatolian Black, BI-Anatolian Grey, Ki- Kilis, AS- Anatolian Yellow, DAK- East Anatolian Red) and one exotic breed (SA-Siyah Alaca) were genotyped for bGH gene polymorphism. Three genotypes were obtained to the result of Msp I digestion. Both alleles were codominant so genotypes were entitled as AA, AB and BB. AB genotype was predominant when considered whole populations mean (0.63). Three breeds had higher frequency with regard to AB genotype (SA (0.95), Ki (0.85) and DAK (0.72)). BB genotype had the lowest frequency among populations (0.06). Although all the Anatolian breeds had BB genotype, it was absent in SA population. Overall allele frequencies of A and B were 0.628 and 0.372, respectively. The frequency of allele q in Ki (0.525), SA (0.475) and DAK (0.417) breeds was higher than other breeds. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) was higher than the expected heterozygosity ( $H_e$ ) for all of the breeds and for the population as a whole,  $H_o$  was above  $H_e$  (with a mean of 63 versus 47 %), reflecting the elevated genetic variability in those populations. All of the populations were in accordance with HWE, except Ki and SA ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ). Statistical results showed that gene frequency of allele B was dependent on breeds ( $p = 0.0209$ ). There was a significant association between polymorphic allele (B) frequency and breeds. There were differences between Ki-AS, Ki-BI, SA-AS, SA-BI ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ ) and DAK-BI ( $p < 0.05$ ) breeds when they were compared for polymorphism. Ki and SA were differed from other breeds and took place in with high frequency group according to comparison result.

In the previously studies, it was shown that B allele was originated from *B. indicus* and responsible for high milk production. It could be said that those three breeds (Ki, SA and DAK) had higher proportion of *B. indicus* genes than others. It was known that Ki and SA breeds had higher milk production than others, as well. That study showed that it was worth to research association between milk traits and bGH locus polymorphism in another study.

The present study showed that genetic variations of five Anatolian indigenous breeds and one exotic breed (SA) for bGH gene polymorphism.

**Key Words:** Bovine growth hormone gene polymorphism, Anatolian indigenous breeds, PCR-RFLP.

## **TEŞEKKÜR**

Öncelikle bana kazandırdığı değerli bilgiler, verdiği emek ve gösterdiği hoşgörüden dolayı sayın hocam Prof. Dr. Numan Özcan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin şekillenmesinde değerli bilgileri ile katkıda bulunan tez jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a ve sayın Prof. Dr. Tamer KAYAALP'e yürekten teşekkür ederim.

Çalışmamda beni değerli bilgi ve tecrübelerinden mahrum bırakmayan, dostluklarından güç aldığım sayın Dr. Adem ALTINALAN ve Dr. Devrim ÖZCAN'a, manevi katkılarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencilerinden Müge SAYICI'ya ve Su Ürünleri Fakültesi Araş. Gör. Makbule BAYLAN'a, bana verdiği fikirler için Araş. Gör. Soner ÇANKAYA'ya, ayrıca aynı laboratuarda çalıştığımız Araş.Gör. Meltem AŞAN'a ve diğer öğrenci arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim. Yapılan projeler ile bu tez çalışmasına maddi olarak destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne de teşekkür etmek isterim.

Ayrıca kızları olmaktan gurur duyduğum anne ve babam Zübeyde-Mahmut TABAK'a, sevgili eşim, en büyük destekçim Nuh BAKLACI'ya ve eğitimim süresince bana gösterdiği hoşgörüden dolayı Balcalı Hastanesi Acil Servis Sor. Hem. Günnaz ŞAHİN'e sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
RESİMLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sığır Büyüme Hormonu.....	1
1.2. Sığır Büyüme Hormon Geni ve Polimorfizmleri.....	5
1.3. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı.....	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
2.1. Büyüme Hormon Geni Polimorfizmi ile İlgili Sığırlarda Yapılan Çalışmalar .....	8
2.2. Büyüme Hormonu Geni Polimorfizmi ile İlgili Diğer Türlerde Yapılan Çalışmalar.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. DNA Materyali.....	19
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Diğer Malzemeler.....	19
3.1.3. Kimyasal Maddeler.....	20
3.2. Yöntem.....	21
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	21
3.2.2. bGH Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Uygun Primerlerin Seçimi.....	21
3.2.3. bGH Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	22
3.2.4. PCR Ürününün Elektroforezi.....	25

3.2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP).....	26
3.2.6. bGH Geninde RFLP.....	27
3.2.7. RFLP Elektroforez Çalışmaları.....	29
3.2.8. Jel Dökümantasyon Çalışmaları.....	31
3.2.9. İstatistiksel Analiz.....	32
3.2.9.1. Popülasyonların bGH Gen Lokusu Polimorfizmi Bakımından Genetik Parametreleri.....	32
3.2.9.2. Popülasyonların Hardy-Weinberg Prensibine Göre Denge Analizi.....	33
3.2.9.3. Polimorfik Allel Frekansının Irka/Irklara Özgü Olup Olmadığının Test Edilmesi.....	35
3.2.9.4. Polimorfik Allel Dağılımı Bakımından Irkların Karşılaştırılması.....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Jel Dökümantasyon Çalışmalarına Yönelik Bulgular.....	37
4.2. Popülasyonların İstatistiki Olarak Analizi.....	37
4.2.1. Genotip ve Allel Frekanslarının Irklara Göre Dağılımı.....	36
4.2.2. Taranan Lokus Bakımından Popülasyonların Hardy-Weinberg Denge Testi.....	42
4.2.3. Polimorfik Allel ve Irklarla İlişkisinin Analizi.....	44
4.2.4. Polimorfik Allel Bakımından Irkların Karşılaştırılması.....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	56
EKLER.....	57
EK-1 KULLANILAN KİMYASALLAR.....	57
EK-2 PROTOKOLLER.....	58
EK-3 BGH/ Msp I PAGE GÖRÜNTÜLERİ.....	60

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 1.1. Sığır büyüme hormonunun moleküler yapısı.....	1
Şekil 1.2. Büyüme hormonunun salınımı ve etki mekanizması.....	2
Şekil 1.3. Büyüme hormon geninin yapısı.....	5
Şekil 1.4. bGH geninde SSCP yöntemi ile belirlenmiş polimorfik bölgeler.....	6
Şekil 3.1. PCR aşamaları.....	23
Şekil 3.2. RFLP metodu.....	26
Şekil 3.3. Büyüme hormon geninde çoğaltılan bölge ve kesim yerleri.....	28
Şekil 3.4. <i>Msp I</i> enzimi ile kesim sonrası oluşan AA, AB ve BB genotipleri.....	29
Şekil 4.1. Genotip frekansları ve ırklara göre dağılımı.....	39
Şekil 4.2. ırklara göre allel frekansları.....	40



## RESİMLER DİZİNİ

## SAYFA

<b>Resim 3.1.</b> Çalışmada kullanılan cihazlardan; <b>A:</b> UVP marka görüntüleme cihazı, <b>B:</b> Eppendorf marka PCR cihazı.....	20
<b>Resim 3.2.</b> PAGE için güç kaynağı ve dikey elektroforez ünitesi.....	30
<b>Resim 3.3.</b> Agaroz jelde PCR ürünlerinin görüntüsü.....	31
<b>Resim 4.1.</b> Msp I/RFLP metodu ile belirlenen genotipler.....	37

<b>Çizelge 1.1</b> Sığır büyüme hormonunun amino asit yapısı bakımından farklı türlerde karşılaştırılması.....	3
<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılacak sığır ırkları ile kanların toplandığı merkezler.....	19
<b>Çizelge 3.2.</b> bGH geninde primerlerin bağlanacağı bölgeler.....	22
<b>Çizelge 3.3.</b> PCR bileşenleri ve reaksiyonda kullanılacak optimum miktarları...	24
<b>Çizelge 3.4.</b> PCR sıcaklıkları.....	25
<b>Çizelge 3.5.</b> Kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	27
<b>Çizelge 3.6.</b> %8'lik Akrilamid jel için gerekli bileşenler.....	29
<b>Çizelge 4.1.</b> Irklara göre genotiplerin dağılımı.....	38
<b>Çizelge 4.2.</b> Tüm popülasyonlar genelindeki genotip frekansları.....	39
<b>Çizelge 4.3.</b> Irklara göre ve popülasyon genelinde allel frekanslarının dağılımı .....	40
<b>Çizelge 4.4.</b> Irkların gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeyleri.....	42
<b>Çizelge 4.5.</b> Popülasyonların HWE'ye göre test edilmesi.....	43
<b>Çizelge 4.6.</b> Irkların popimorfizm açısından Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılması.....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADG : Ortalama Günlük Kazanç (Average Daily Gain)
- AI : Yapay Tohumlama (Artificial Insemination)
- APS : Amonyum persülfat (Amonium persulfat)
- BI : Boz Irk
- bç : Baz çifti
- bGH : Sığır Büyüme Hormonu (Bovine Growth Hormone)
- cDNA : Komplementer DNA (Complementary DNA)
- cGH : Tavuk büyüme hormonu (Chicken Growth Hormone)
- cm : Santimetre
- Ç.Ü : Çukurova Üniversitesi
- DAK : Doğu Anadolu Kırmızısı
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- dNTP : Deoksinükleosit trifosfat
- EDTA : Etilendiamintetraasetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
- EtBr : Etidyum Bromid (Ethydium Bromide)
- FAO : Dünya Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
- g : Gram
- GH : Büyüme Hormonu (Growth Hormone)
- gGH : Keçi büyüme hormonu (Goat Growth Hormone)
- GHIH : Büyüme Hormonu İnhibe Edici Hormon (Growth Hormone Inhibiting Hormone)
- GHRF : Büyüme Hormonunu Uyarıcı Faktör (Growth Hormone Releasing Factor)
- GHRG: Büyüme Hormonu Reseptör Geni (Growth Hormone Receptor Gene)
- GSK : Güney Sarı Kırmızısı, Kilis Irkı
- HWE : Hardy-Weinberg Dengesi (Hardy-Weinberg Equilibrium)
- hGH : İnsan Büyüme Hormonu (Human Growth Hormone)
- IGF-I : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-Like Growth Factor)
- IU : Uluslararası Birim (International Unit)
- kb : Kilo baz

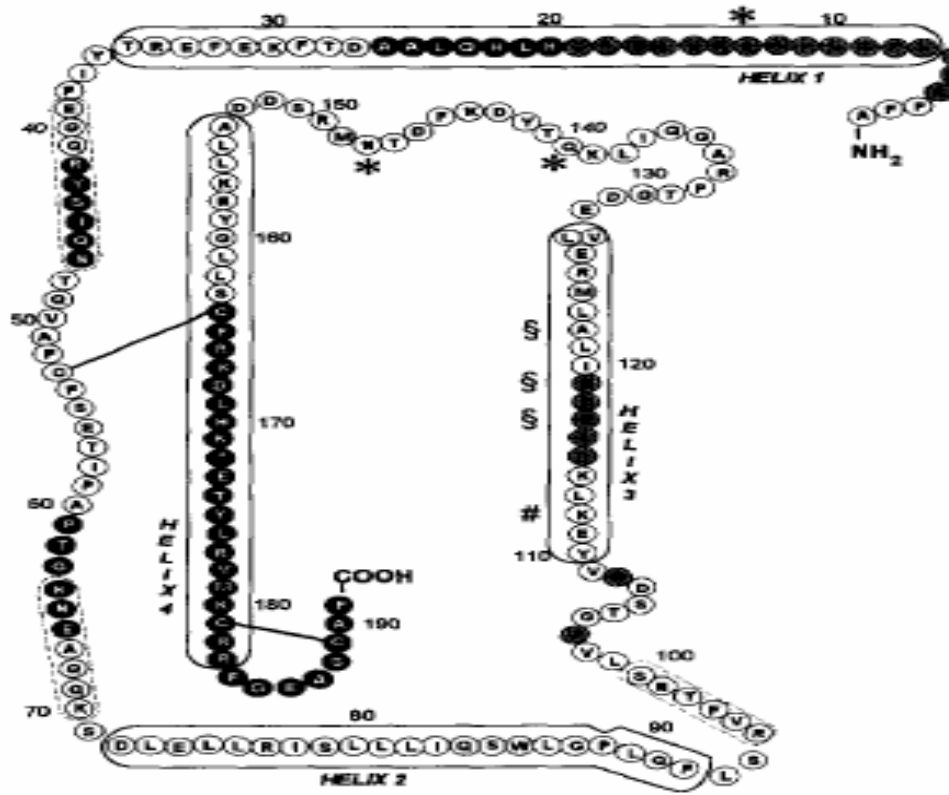
Ki : Kilis Irkı  
M : Molar  
mA : MiliAmper  
MAS : Markıra Dayalı Seleksiyon (Marker Asisted Selection)  
mg : Miligram  
µg : Mikrogram  
µl : Mikrolitre  
ml : Mililitre  
mM : Mili Molar  
Msp I : Restriksiyon Endonükleaz Enzimi (Msp I)  
NaCl : Sodyum Klorür  
NCBI :Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)  
ng : Nanogram  
NRR : Geri Dönmeyenlerin Oranı (Non return rate)  
PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrilamide Gel Electrophresis)  
pGH : Domuz Büyüme Hormonu (Porcine Growth Hormone)  
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)  
pmol : Pikomol  
QTL : Kantitatif Özellik Lokusları (Quantitative Trait Locus)  
RE :Restriksiyon Endonükleaz (Restriction Endonuclease)  
rbGH :Rekombinant Sığır Büyüme Hormonu (Recombinant Bovine Growth Hormone)  
RFLP : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri(Restriction Fragment Lenght Polymorphism)  
rpm : Bir dakikadaki rotor devir sayısı (Rotor Per Minute)  
SCC : Somatik Hücre Sayımı (Somatic Cell Count)  
SDS : Sodyum dedoksisülfat  
SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotid Polymorphism)  
SSCP : Tek Zincir Yapısal Polimorfizm (Single Stranded Conformation Polymorphism)

TEMED	: N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamin (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine)
TRH	: Tirotropin Uyarıcı Hormon (Thyrotropin-Releasing Hormone)
Tris	: Tris (Tris(hydroxymetyl)aminomethane)
UV	: Ultra Viyole (Ultra violet)
V	: Volt
YK	: Yerli Kara
YS	: Yerli Sarı

## 1.GİRİŞ

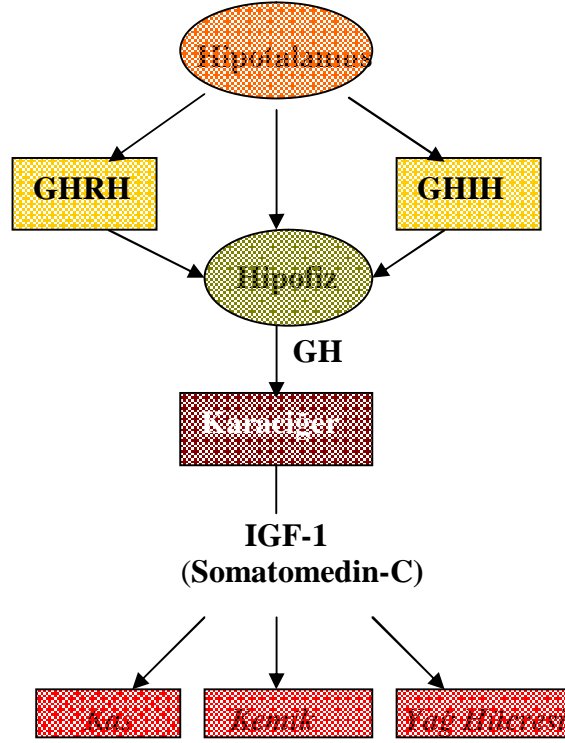
## 1.1. Sığır Büyüme Hormonu

Sığır büyüme hormonu (bGH), bütün omurgalı türlerde de olduğu gibi, hipofizin ön lobundan salgılanan ve 191 amino asitten oluşan tek zincirli bir proteindir (Woychick ve ark., 1982; Gordon ve ark., 1983) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Sığır büyüme hormonunun moleküler yapısı ( Secchi ve Borromeo, 1997).

bGH'nun salınımı iki hipotalamik peptid tarafından düzenlenmektedir. Bunlardan birincisi hormonun salınımını harekete geçiren “Büyüme Hormonu Uyarıcı Faktör” (GHRF) diğeri ise salınımını engelleyen “Somatostatin”(GHIH)'dir (Etherton ve Bauman, 1998) (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Büyüme hormonunun salınımı ve etki mekanizması (Los Gatos Longevity Institute, 1998).

bGH farklı türlerin büyüme hormonları ile benzer yapısal, biyolojik ve immünolojik özelliklere sahiptir. Örneğin sığır büyüme hormonunun amino asit yapısı, keçi (gGH) ve koyun büyüme hormonları (oGH) ile %99 oranında benzerlik gösterirken domuz büyüme hormonu (pGH) ile %90, insan büyüme hormonu (hGH) ile %65 oranında benzerlik göstermektedir (Secchi ve Borromeo, 1997) Bu durumda büyüme hormonu aminoasit yapısı bakımından sığır ile koyun ve keçi arasında 2, domuz arasında 19, insan arasında ise 71 aminoasit bakımından fark mevcuttur (Çizelge 1.1). Yine diğer türlerde olduğu gibi, sığır büyüme hormonu da pek çok hücre tipinin büyümesini, metabolizmasını ve farklılaşmasını kontrol etmekle birlikte doğrudan veya dolaylı olarak oldukça geniş fizyolojik işlevlere sahiptir. Metabolik etkileri arasında yağ moleküllerinin trigliseridlere parçalanmasını sağlayarak dolaşımında birikmesini baskılamak, protein anabolizmasını düzenleyerek protein

sentezini ve aminoasit tutulumunu arttırmak (böylece kas birikimini sağlamak), anti-insülin etkisi ile karaciğerden glikoz salınımını düzenlemek ve kan şekerini normal sınırlarda tutmak sayılabilir. Dolaylı olarak karaciğerden IGF-I (Insülin Like Growth Factor-I) salınımını kontrol ederek kemik gelişimi üzerinde de etki göstermektedir (Secchi ve Borromeo, 1997).

**Çizelge 1.1.** Sığır büyüme hormonunun aminoasit yapısı bakımından farklı türlerle karşılaştırılması (Davies, 2002)

Aminoasit No:	10	30	50
<b>Sığır</b>	AFPAMSLSGL.FANAVLRAQH.LHQLAADTFK.EFERTYIPEG.QRYSIQNTQV.AFCFSETIPA		
<b>Koyun/Keçi</b>	-----		
<b>Domuz</b>	-----P--S-----Y-----A-----A-A-----		
<b>Tavuk</b>	T--P--N-----L--E-Y-----D--T-----NK-S-A--Y-		
<b>Köpek</b>	--P--S-----Y----A-----A-A-----		
<b>İnsan</b>	-TIP--R--D--M--HR----F--YQ--EA--KE-K-----FL-APATSL---S-----T		
	70	90	110
<b>Sığır</b>	PTGKNEAQK.SDLELLRISL.LLIQSWLGPL.QFLSRVFTNS.LVFGTSDRVY.EKLDLEEGI		
<b>Koyun/Keçi</b>	-----D-----		
<b>Domuz</b>	--D---R---V---F-----V-----Q---		
<b>Tavuk</b>	--DD----M---F--V-----T-V-Y--K---N-----R---		
<b>Köpek</b>	-D---R--V---F-----V-----Q		
<b>İnsan</b>	-SNRE-T-RK-NL--FI-----EV---RS--A-----Y-A--SN--DL-----V-		
	130	150	170
<b>Sığır</b>	LALMRELEDG.TPRAGQILKQ.TYDKFDTNMR.SDDALLKNYG.LLSCFRKDLH.KTETYLRVMK		
<b>Koyun/Keçi</b>	-----V-----		
<b>Domuz</b>	-----S-----L-----G-----K-----A-----		
<b>Tavuk</b>	-----R..S--GP-L-RP-....IHL--NE-----K-----V-----K-----		
<b>Köpek</b>	-----S-----L-----G-----K-----A-----		
<b>İnsan</b>	-----T--GR-----T--F--S-----SHN-----Y-----R-----MD--V---F-----I		
	190	<b>Fark</b>	
<b>Sığır</b>	CRRFGEASCA.F		
<b>Koyun/Keçi</b>	-----		
<b>Domuz</b>	-----V-S-----		
<b>Tavuk</b>	-----SN-TI-----		
<b>Köpek</b>	-----V-S-----		
<b>İnsan</b>	Q--S-VGS--G-----		
		2	19
		43	19
		71	



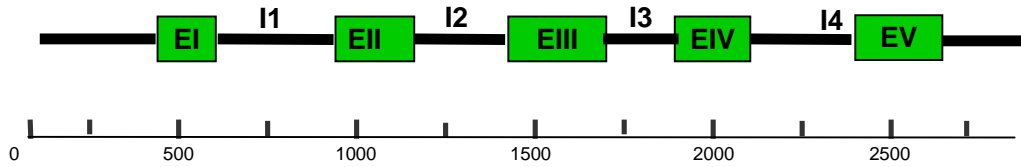
1920'li yıllarda keşfinden beri, laboratuvar hayvanları ve ekonomik önemi olan çiftlik hayvanlarında yapılan araştırmalarda, büyüme hormonunun laktasyon, meme gelişimi, üreme, et ve süt verim özellikleri üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir (Marques ve ark., 2003). Bu sebeple özellikle sığır başta olmak üzere ekonomik öneme sahip pek çok hayvanda büyüme hormonunun et ve süt verim özellikleri ile ilişkisi konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda hormonun yapısal özelliklerinin ve kandaki seviyesinin biyolojik etkileriyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Örneğin Vasilatos ve Wangness (1981), yüksek süt verimli hayvanlar ile düşük süt verimli hayvanları farklı laktasyon dönemlerinde, süt verimleri ve büyüme hormon seviyeleri bakımından karşılaştırmışlardır. Sonuçta yüksek süt verimli hayvanların en iyi büyüme hormon seviyesi ortalamasına sahip olduğunu göstermişlerdir. Eppard ve ark. (1993), 127. amino asit olan lösin yerine valin bulunması durumunda dolaşımdaki büyüme hormon konsantrasyonunun ve süt veriminin arttığını göstermişlerdir.

Hormonun kandaki yüksek konsantrasyonunun ve farklı varyantlarının süt verim özellikleri ile ilişkili olması, bu özellikleri arttırmak için rekombinant büyüme hormonlarının üretimi ve kullanımını gündeme getirmiştir. Dışarıdan rekombinant bGH (rbGH) uygulamaları ile %25-30 düzeyinde verim artışları sağlanabildiği bildirilmiştir (Hodgson, 1989). Laktasyon dönemindeki hayvanlara dışarıdan büyüme hormonu uygulaması ile normal kompozisyona sahip süt miktarında artış, meme hücrelerinde salgı artışı ve süt sentezinde kullanılmak üzere yem tüketiminde artış gibi etkiler görülmüştür (Baldi, 1999). Ancak insan ve hayvan sağlığı açısından rekombinat bGH kullanımı hala tartışma konusudur. Amerika ve Arjantin gibi ülkelerde hayvanlara bu uygulama yasal olmasına karşın ülkemizde yasal değildir. Bu kaygılardan dolayı verimin hormon uygulaması ile arttırılması yerine hayvanın büyüme hormonu ile ilgili parametrelerin incelenerek bu yönde seleksiyon yapılması yolu tercih edilmektedir (Marques ve ark., 2003). Büyüme hormon seviyesi hayvanın yaşına, cinsiyetine, fizyolojik durumuna bağlı olmakta hatta gün içerisinde değişiklik gösterebilmektedir (Yao ve ark., 1996). Bu nedenle hormon seviyelerinin ölçümüne göre yapılacak bir seleksiyon yanıtıcı olacağından çalışmalar hormon özelliklerini belirleyen büyüme hormon geni üzerinde yoğunlaşmıştır. bGH düzeyindeki

varyasyonların gen düzeyindeki polimorfizmlerden kaynaklandığı, bu polimorfizmlerin sonucu olarak genin fonksiyonunun ve fenotipe katkıda bulunacak gen ürününün değişebildiği bildirilmiştir (Choi ve ark. 1996). Bu sebeple büyüme hormonu gen polimorfizmleri verim özelliklerine göre yapılacak seleksiyon için önemli bir kriter olabilecektir.

### 1.2.Sığır Büyüme Hormon Geni ve Polimorfizmleri

bGH geni 19. kromozom üzerinde yer alan prolaktin ve plasental laktojen genleri ile birlikte aynı multi-gen familyasında yer almaktadır (Hediger ve ark., 1990). 2856 bp uzunluğundaki bu gen, beş ekzon (kodlama yapan: I-V) ve dört intron (kodlama yapmayan: 1-4) bölgelerinden oluşmaktadır (Woychick et al., 1982; Gordon ve ark., 1983)(Şekil 1.3).



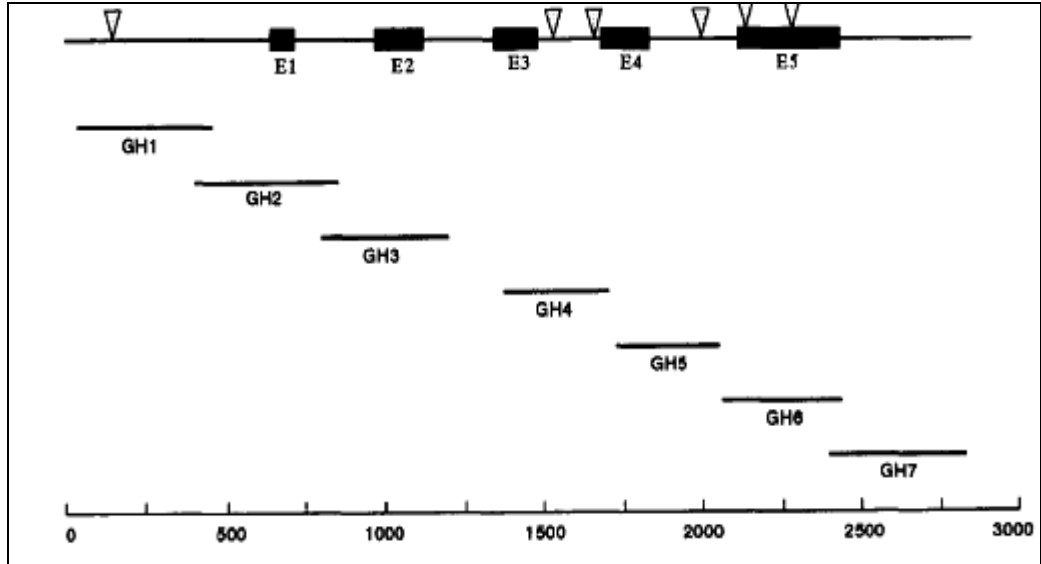
**Şekil 1.3.** Büyüme hormonu geninin yapısı (I: İntron, E:Ekzon)

Büyüme hormon geni yapısı incelenirken gen düzeyinde popülasyondan popülasyona farklılık gösteren polimorfik bölgeler belirlenmiştir (Şekil 1.4). Bu mutasyonlar büyüme hormonunun farklı yapılarda salgılanmasına neden olmaktadır. Sığır büyüme hormonunun şimdiye kadar dört varyanta sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar 127. amino asit pozisyonunda lösin ya da valin bulunan ve NH<sub>2</sub> terminal bölgesinde alanin ya da fenilalanin bulunan çeşitleridir (Wood ve ark.,1989). NH<sub>2</sub> terminal bölgesindeki bu varyasyon sinyal peptidinin ayrılmasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Bugüne kadar bGH geninde birkaç önemli mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar; 5. ekzonda lösinden (CTG) valine (GTG) değişimi, 3. intronda Msp I (-) / Msp I (+) polimorfizmi ve 3' bölgesinde alaninden fenilalanine dönüşüme neden olan nokta

mutasyonlarıdır (Vucasinovic, 1998). Son zamanlarda yapılan çalışmalar bGH lokusundaki polimorfizmlerin et ve süt verim özellikleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Reis ve ark., 2001). Örneğin Lagziel ve ark. (1995), büyüme hormonu geninin üçüncü intron bölgesindeki *Msp I* kesim bölgesindeki mutasyonun süt protein oranı ile, Rocha ve ark. (1992) *Taq I*/RFLP polimorfizminin doğum ağırlığıyla ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Büyüme hormonu gen allellerinin frekansları sürü içinde değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin 127. amino asit pozisyonundaki değişikliğin sonucu oluşan iki genotipten biri olan lösün genotipi sütçü sığırlarda, valin genotipi ise etçi sığırlarda daha sık görülmektedir (Lucy ve ark., 1993).



Şekil 1.4. bGH geninde SSCP yöntemi ile belirlenmiş polimorfik bölgeler (Mutasyon saptanan bölgeler beyaz oklarla gösterilmiştir)(Yao, 1996).

Bir hayvanın gerçek verim kabiliyetinin ortaya çıkabilmesi için çevrenin etkisinin ortadan kaldırılması ya da minimize edilmesi gerekir. Normal şartlarda çevre baskısını etkisiz kabul etmek ya da tamamen kaldırmak mümkün değildir. Bu sebeple seleksiyonda isabet derecesini artırmak için kantitatif verim özellikleri ile ilişkili olduğu düşünülen işaret (Markır) genler kullanılarak çevrenin etkisi elimine edilebilmektedir. Bu nedenle hayvanların kantitatif özelliklerle ilişkili işaret genlerine göre seçilmesi çevrenin etkisini elimine ederek seleksiyonda isabet derecesini arttıracaktır (Gollapudi, 1999). bGH, laktasyon, meme gelişimi, büyüme

ve metabolizmanın düzenlenmesi gibi pek çok biyolojik işlevlere sahip olması ve gendeki polimorfizmlerin verim özellikleri ile ilişkili olmasından dolayı seleksiyonda aday bir işaret gen durumundadır.

### **1.3. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı**

Bu çalışmanın amacı maddeler halinde şu şekilde sıralanabilir:

- a) Beş Anadolu yerli ırkı ve bir kültür ırkı sığırın büyüme hormonu geninin üçüncü intron bölgesindeki *Msp I* polimorfizmi yönünden genetik karakterizasyonu.
- b) Popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıklarını belirlemek.
- c) Polimorfik allellerin ırka özgü olup olmadığını belirlemek.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmanın kapsamı şu şekilde belirlendi:

- 1) Beş Anadolu yerli sığır ırkı (Boz Irk, Yerli Kara, Anadolu Sarısı, Kilis, Doğu Anadolu Kırmızısı) ile bir kültür ırkı sığırdan (Siyah Alaca) alınan kanlardan genomik DNA izolasyonu yapmak.
- 2) Her örnek için bGH geni üzerinde belirlenen bölgenin (1181-2072. nükleotidler arası) PCR yöntemi ile çoğaltılması.
- 3) Çoğaltılan bölgenin *Msp I* restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi (RFLP).
- 4) Kesim ürününün % 8'lik PAGE' de elektroforezi.
- 5) bGH/*Msp I* polimorfizmine göre genotiplerin ve allel frekanslarının belirlenmesi, polimorfik allel bakımından popülasyonların karşılaştırılması için istatistiksel analiz yapmak.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR****2.1. Büyüme Hormon Geni Polimorfizmi ile İlgili Sığırlarda Yapılan Çalışmalar**

Choi ve ark. (1996), Kore yerli sığırlarında, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniğini kullanarak, büyüme hormon geninde et kalitesi ve büyüme performansı ile ilişkili olabilecek markırları araştırmışlardır. Kastre edilmiş erkek hayvanların kanından DNA izole edilmiştir. Genomik DNA, restriksiyon enzimlerle kesilmiş ve büyüme hormonu cDNA'sı kullanılarak Southern Blot analizi yapılmıştır. En çok bant veren restriksiyon enzimi olarak *Taq I* bulunmuştur. *Taq I* restriksiyon endonükleaz enzimi kesim sonucunda sırasıyla 6.15, 5.2, 4.5, 4,3 2.6, 2.4, 1.6, 0.5, 0.3 ve 0.2 kb uzunluklarında fragmentler elde edilmiştir. Bu fragmentler arasında en sık görüleni, 15 hayvanın 11'inde görülen 1.6 kb büyüklüğündeki bant olmuştur. GH-*Taq I* RFLP analizinde elde edilen 4.3 kb.'lık bandın, hayvanların verim kayıtları ile karşılaştırıldığında, ortalama günlük kazanç ( $p=0.021$ ) ve karkas ağırlığı ( $p=0.035$ ) ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Et kalitesini etkilediği düşünülen bir markır bulunamamıştır.

Dybus (2002), Polonya Siyah-Beyaz sığırlarında prolaktin ve büyüme hormonu genlerindeki polimorfizimlerin süt verim özellikleri ile ilişkisi olup olmadığını araştırmıştır. Büyüme hormonu geninin üçüncü intron bölgesini PCR teknolojisi ile çoğaltmış ve PCR ürününü *MspI* enzimi ile kesmiştir (RFLP). Dybus, tüm laktasyon dönemlerinde en yüksek süt verimi ve protein oranına *MspI* (+/+) genotipinin, yine tüm laktasyonlarda en yüksek süt yağı oranına (% olarak) ise *MspI* (+/-) genotipinin sahip olduğunu göstermiştir.

Falaki ve ark. (1996), İtalyan Holstein-Friesian boğalarında süt verimi ile büyüme hormonu geni ve büyüme hormon reseptör geni (GHRG) polimorfizleri arasında bir ilişki olup olmadığını incelemişlerdir. Bunun için PCR-RFLP metodunu kullanmışlardır. Büyüme hormonu geni için *Taq I* ve *Msp I*, büyüme hormonu reseptör geni için ise *Taq I* enzimini kullanmışlardır. Doksan bir hayvanda yapılan analizde, büyüme hormonu lokusu polimorfizmelerinin süt verim özellikleri üzerine etkisi olmadığını görmüşlerdir. Reseptörün hücre içi C-terminal ucunun cDNA

probu ile hibridizasyonu ve *Taq I* ile kesilmesi sonucu altı bant gözlemişlerdir. Bu polimorfizmin süt protein yüzdesi üzerinde etkisi olduğunu görmüşlerdir. Sonuçlar DNA polimorfizmlerinin süt verimi üzerine etkisi konusunda daha fazla araştırmalar yapılması gerektiğini göstermiştir.

Hoj ve ark. (1993), Danimarka Kırmızısı sütçü ırkına ait yüksek ve düşük süt yağ oranına sahip hayvanlardan 58 buzağı ile Norveç Kırmızısı sütçü ırkından 32 düvenin bGH geninin 3' bölgesinde insersiyon(I)/delesyon(D) polimorfizmi ile üçüncü intron bölgesinde *Msp I*(+/-) polimorfizmi bakımından genetik karakterizasyonunu yapmışlardır. RFLP sonucunda yalnızca I-*MspI*(+) ve D-*MspI*(-) haplotipleri olduğunu bulmuşlardır. Danimarka Kırmızısı ırkında yüksek süt yağ oranına sahip hayvanlarda D-*Msp I* haplotipinin frekansını 0.28, düşük süt yağ oranına sahip hayvanlarda ise 0.05 olarak hesaplamışlardır ( $p < 0.01$ ). Norveç Kırmızısı ırkında ise yüksek süt yağ oranına sahip hayvanlarda D-*Msp I* frekansı 0.09, düşük süt yağ oranına sahip olanlarda ise 0.0 bulmuşlardır. Sonuç olarak 3' bölgesindeki delesyonun ve üçüncü intron bölgesindeki *Msp I*(-) polimorfizminin süt yağ oranı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Ge ve ark. (2002), büyüme hormonunun promotor ve kodlama yapan bölgelerindeki ve büyüme hormonu reseptör genindeki (GHRG) polimorfizmler ile IGF-I konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi PCR-RFLP yöntemini kullanarak incelemişlerdir. GHR geninin promotor bölgesindeki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ile süttten kesilen buzağuların IGF-I kan konsantrasyon değerleri arasında bir ilişki bulunmuştur. Sonuç olarak bu işaretlerin (markırların) etkilerinin diğer popülasyonlarda da denenerek verilerin doğrulanması önerilmiştir.

Grochowska ve ark. (2001 a) sığır büyüme hormonu proteinininin 127. amino asit pozisyonunda (Ekzon 5) valin yerine lösin aminoasitinin bulunması durumunun karkas özellikleri üzerine etkili olup olmadığını incelemişlerdir. 109 Polonya Holştayn boğasının karkas özelliklerine ait veriler hayvanlar 15 aylık olduklarında kesilerek değerlendirilmiştir. Canlı ağırlık kazancı, karkastaki et, kemik, kas içi ve deri altı yağ miktarı ile kaburgadaki, filetodaki ve omuzlardaki kemik ve yağ oranı ölçülmüştür. GH genotipleri PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Lösin ve Valin allellerinin frekansları sırası ile 0.64 ve 0.36 bulunmuştur. Canlı ağırlık için kg

başına damar içi 0.15µg TRH uygulamasının 15-135. dakikasına kadar her 15 dakikada bir kan serumunda büyüme hormonu konsantrasyonunu ölçmüşlerdir. Büyüme hormonu değişiklikleri şöyle bulunmuştur: Örneklerin toplandığı ilk 0-15 dakikada düşük oranda, TRH uygulamasından 15 dakika sonra en üst miktarda bulunmuştur ancak pik yaptıktan sonraki 60 dakikalık bölümde ise kaybolmaya başlamıştır. İstatistiksel analizde Lössin/Lössin (L/L) genotipleri ile Valin/Valin (V/V) genotipleri arasında karkasdaki et miktarı ile canlı ağırlık kazancı bakımından fark bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Ayrıca iki homozigot genotip arasında (L/L ve V/V), GH'nun pik düzeyleri bakımından da fark önemli bulunmuştur ( $P \leq 0.10$ ). Büyüme hormonunun salınım farklılıkları üzerine genotiplerin etkisinin düşük olduğu da bulunmuştur ( $\leq 1.77\%$ ). Sonuç olarak araştırmacılar lösin/valin polimorfizminin Holştayn boğalarında karkas özellikleri üzerine etkisi olduğunu ama bu etkinin düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Grochowska ve ark. (2001 b) genç Polonya Friesian sütçü sığırlarında (düve ve boğalarda) IGF-I ve büyüme hormonu salınımının uyarılması ile büyüme hormonu geninde 127. amino asit pozisyonundaki Lössin/Valin polimorfizminin süt verim özellikleri ile ilişkisini araştırmışlardır. Beşinci ekzon bölgesindeki bu mutasyonun tespiti için PCR-RFLP metodunu kullanmışlardır. Damar içine büyüme hormonu salınımını uyaran (Sekretagog) bir hormon olan TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) verildikten sonra yapılan ölçümlerde Val/Val genotipinin diğer genotiplere göre (Lössin/Lössin, Lössin /Valin) daha yüksek seviyede büyüme hormonu düzeyine sahip olduğunu görmüşlerdir. En yüksek IGF-I seviyesi Lössin/Lössin genotiplerinde bulunmuştur. İlk laktasyon kayıtlarına bakılarak Lössin/Val heterozigotlarının en yüksek süt ve protein miktarına, Lössin/Lössin homozigotlarının ise en fazla süt yağ oranına sahip oldukları bulunmuştur. Araştırmacılar büyüme hormonu ve IGF-I'in kanda yüksek seviyede bulunmasının büyüme hormonu genindeki Lössin/Valin mutasyonundan etkilendiğini ve bunun genç sığırlarda kalıtılabilir özellikler olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (2003), *Kore Hanwoo* sığırlarında büyüme hormonu geninin promotor bölgesinde daha önce bildirilmemiş *DraI* polimorfizmini ve büyüme özellikleri ile ilişkisini incelemişlerdir. PCR-RFLP tekniği kullanılarak 108

hayvandan (78 Hanwoo, 20 Holstein ve 10 Angus) izole edilen DNA'ları mutasyonlar açısından analiz edilmiştir. Araştırmacılar *DraI* polimorfizminin 3 aylık yaştaki hayvanlarda karkas ağırlığının ve yetiştirme değerinin tahmin edilmesinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Sonuç olarak bu polimorfizmin “DNA düzeyinde seleksiyon” açısından faydalı olabileceğini belirtmişlerdir.

Lagziel ve ark. (1995), SSCP metodunu kullanarak İsrail sütçü sığırlarında ve Uluslararası Sığır Aile Panel'ine (International Bovine Reference Family Panel) ait *Bos taurus* x *Bos indicus* melezi ebeveyn hayvanlarda büyüme hormon geninin haplotiplerini tanımlamışlardır. bGH geni düzeyinde *B. Taurus* ve *B. indicus* haplotiplerinin kalitatif olarak farklılaştıkları ortaya çıkmıştır. Bunun da daha önce öne sürüldüğü gibi, bu sığırların alt ırklarının uzun evrimsel ayrılmalarının bir sonucu olduğunu düşünmüşlerdir. Araştırmacılar İsrail Holştayn popülasyonunda yalnızca küçük bir miktar bGH haplotipinin bulunduğunu saptamışlardır. *B. indicus* orijinli olduğu düşünülen bu haplotiplerden birinin, süt protein oranı üzerine pozitif yönde önemli bir etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. İndisin allelinin taurin popülasyonunda böylesine güçlü bir etkisinin oluşu, diğer kantitatif genler için de, taurin popülasyonunun iyileştirilmesinde indisin allellerinin genetik bir kaynak olarak kullanılabilmesini ortaya koymuşlardır. Haplotip analizinin gen kaynaklarının korunması açısından ve değerli ırkların genetik uzaklıklarını ölçmede yardımcı olabilecek faydalı bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Lagziel ve ark. (2000), büyüme hormonu geninin üçüncü intron bölgesindeki *Msp I* polimorfizmini (*Msp I*(-) alleli) farklı coğrafik bölgelerde yetiştirilen pek çok sığır ırkında araştırmışlardır. Irkların coğrafik orijinleri göz önüne alındığında bu allellin Kuzey Avrupa kökenli sığırlarda görülme sıklığının düşük, Doğu Avrupa ya da Akdeniz kökenli sığırlarda orta, Hindistan kökenli sığırlarda ise yüksek olduğu görülmüştür. Yetiştirme tipleri göz önüne alındığında *Msp I* (-) allelinin hörgüçsüz sığırlarda (*Bos taurus*) görülme sıklığının hörgüçlü sığırlara göre (*Bos indicus*) daha az olduğu ortaya konmuştur. Bu dağılım için farklı açıklamalar yapılmaktadır. Bunlardan en önemlisi *Msp I* (-) allelinin Hindistan yarımadasındaki *Bos indicus* türünden köken aldığı, daha sonra Doğu Avrupa, Akdeniz ve nihayetinde Doğu ve



Kuzey Avrupa ile Batı Afrika'daki hörgüçsüz sığırlara düşük frekanslarda yayıldığı yönündedir.

Lechniak ve ark. (1999), boğaların sperm özellikleri ile bGH/RFLP polimorfizmi arasındaki bir ilişki olabileceğini düşünerek 113 AI (Artificial insemination) boğasının (Holstein x Polish Black&White) kanından veya sperminden izole edilen DNA'lar PCR yöntemi ile çoğaltmış, Alu I enzimi ile kesmişlerdir. bGH genotipleri %10 Poliakrilamid jelde görüntülenmiştir. Süt verim yönlü boğalarda lösün (L) allel frekansı 0.86, et verim yönlü boğalarda ise 0.38 bulunmuştur (Valin alleli (V) ise sırasıyla 0.14 ve 0.62'dir). Sekiz sperm özelliği ve 60 gün NRR (non-return-rate) oranları analiz edilmiştir. Sperm özellikleri üzerine üç genotip (LL,VV,LV) ve üretim tipinin etkisi (Et verim yönlü-Süt verim yönlü) incelenmiştir. LL boğalarında düşük ejakulat hacmi ve VV boğalarında yüksek NNR olmasına rağmen, hiçbir özellik bGH genotipleriyle ilişkili olarak önemli bir farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte et verim yönlü boğalar yüksek sperm konsantrasyonuna sahipken süt verim yönlü boğalar sperm hareketliliği bakımından üstünlük göstermişlerdir.

Liron ve ark. (2002), süt üretimi ile ilişkili proteinleri kodlayan beş lokusun polimorfizmi ile ilgili verilerini, Argentine ve Bolivian Creole sığırlarının genetik farklılığını ve populasyon yapısını incelemek için kullanmışlardır. Altı Creole ırkının (Argentine=230, Patagonian=25, Saavedreno=140, Chaqueno Boliviano=30, Yacumeno=27 ve Chusco=11) kanlarından DNA izole edilmiştir.κ-kazein, β-laktoglobulin, büyüme hormonu ve prolaktin genini PCR-RFLP metodu ile, α<sub>s1</sub>-kazein genini PCR-ASO ile belirlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda; (i) Çalışılan genlerde, Argentine ve Bolivian Creole ırklarında gözlenen gen frekansları profillerinin tarihi bir bağları bulunan Iberian ve Güney Amerika Creole sığır ırklarının profillerine yakın olduğunu göstermiştir;(ii) Zebu gen introgresyonunun bildirilmiş olmasına rağmen bu çalışmada bu lokuslar yönünden Zebu'dan farklı oldukları ortaya çıkmıştır; (iii) Argentine ve Bolivian Creole sığırlarının önemli düzeyde alt guruplara sahip olduğu fakat her populasyonun genetik çeşitlilik derecesini sürdürdüğü belirtilmiştir.

Reis ve ark. (2001), sekiz Portekiz sığır ırkından (*Alentejana, Arouquese, Barrosa, Maronesa, Marinhoa, Mertolenga, Mirandesa ve Preta*) toplam 195 boğanın, PCR-RFLP yöntemi ile, GH-*Alu I* polimorfizmine göre genotiplemesini yapmışlardır. Her ırkın genotipleri ve gen frekansları bakımından birbirlerinden oldukça farklı olduklarını görmüşlerdir. Lössin ve Valin gen frekansları 0.759 ve 0.241 olarak bulunmuştur. Analiz edilen 168 hayvanda büyüme performansı ile bGH-*Alu I* polimorfizmi arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Elde ettikleri istatistiki sonuçlara göre *Alentejana, Marinhoa* ve *Preta* ırklarında bGH-LL ve bGH-LV genotipleri ile ortalama vücut ağırlığı arasında önemli bir ilişki bulunmuşlardır.

Rocha ve ark. (1991), Angus, Brahman, Hereford, Holstein ve Jersey sığır ırklarında RFLP yöntemini kullanarak kantitatif özellik lokusları (QTL-Quantitative Trait Loci) için işaret gen özelliğindeki büyüme hormonu geni, prolaktin geni, osteonektin geni, paratiroid hormonu ve keratin genlerindeki polimorfik bölgelerin verim özellikleri açısından önemli olup olmadığını araştırmışlardır. Büyüme hormonu geni için *TaqI*, prolaktin geni, paratiroid hormonu geni ve keratin geni için *MspI*, Osteonektin geni için *EcoRI* enzimlerini kullanmışlardır. bGH/*Taq I* allelleri (B, C, D) Brahmanlarda yüksek frekansta bulunmuştur. Bu alleller düşük doğum ağırlığı ( $P<0.01$ ) ve düşük omuz genişliğiyle ilişkili bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Paratroid hormon-*Msp I* işaret lokusu ile vücut ölçüsü ve süttten kesme ağırlığı arasında önemli bir ilişki bulunmuştur ( $P=0.03$ ). Diğer işaret genleri için (Keratin-*MspI*, Osteonektin-*EcoRI*, prolaktin-*Msp I*) ile verim özellikleri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır.

Unanian ve ark. (1994), boğalarda yaptıkları bir çalışmada büyüme hormonu geninin 5. ekzonunu ve 3' bölgesini PCR yöntemi ile çoğaltmış ve *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimini kullanarak (RFLP) kesim bölgelerinde mutasyon olup olmadığını araştırmışlardır. Sonuçta üç farklı genotip olduğunu (EE, EF ve FF) gözlemlemişlerdir. Sekiz ırktan 184 boğada, FF genotipinin frekansını 0.03, EF genotipinin frekansını 0.08 ve EE genotipinin frekansını 0.89 olarak bulmuşlardır. F allelini yalnızca Brahman, Holştayn ve Wagyu melezlerinde görebilmişlerdir.

Unanian ve ark. (2000), Nellore saf ırkıdan 211 boğada, büyüme hormon geni polimorfizmi ile ağırlık kazancı arasındaki olası ilişkiyi araştırmışlardır. Ağırlıkla ilgili veriler doğum ağırlığı, sütten kesme ağırlığı ve 10-16 aylık yaşlar arasında aylık canlı ağırlık artışı olarak belirlenmiştir. Ayrıca doğum-sütten kesme, sütten kesme-16 aylık yaş dönemleri arası ağırlık kazancı ölçülmüştür. bGH genini RFLP/*Msp I* (891 bç), RFLP/*Hae III* (441 bç) ve RFLP/*Alu I* (427 bç) polimorfik bölgelerine göre genotiplemişlerdir. Her polimorfizm iki allel vermiştir (*Msp I* için C ve D, *Hae III* için E ve F, *Alu I* için A ve B). Eşbaskın alleller D, F ve A olarak bulunmuştur. bGH/*Alu I* AA genotipinin sütten kesme ile 15 aylık yaşlarda, bGH/*Msp I* DD genotipinin 14-15 aylık yaşlarda ağırlık kazancı üzerine etkisi olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar bGH/*Alu I* ve bGH/*Msp I* polimorfizmlerinin genç boğalarda ağırlık kazancı bakımından potansiyel işaret lokusları olabileceğini göstermiştir.

Unanian ve ark. (2002), Nellore saf ırkıdan 211 boğada, büyüme hormon geni polimorfizmi ile üreme özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 10 ile 16 aylık yaşlarda her ay düzenli olarak testis torbası çevresi ve testosteron yoğunluklarını ölçülmüşlerdir. Bunlara ek olarak testislerin büyüme oranını hesaplamışlardır. Kandan izole edilen DNA'dan bGH genini (1181-2071. nükleotidler arası) PCR tekniği ile çoğaltmış ve *Msp I* ile *Hae III* enzimlerini kullanarak kesmişlerdir. Her polimorfizm iki allel göstermiştir. Eşbaskın alleller bGH/*Msp I* için D (0.85) ve bGH/*Hae III* için F (0.98) olarak bulunmuş, EE genotipine rastlanılmamıştır. Çalışmaya göre %5 önem düzeyinde bGH/*Msp I* polimorfizmi ile ergenlik dönemi sonrası için testis torbası çevresi ve testislerin gelişimi arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. Aynı zamanda yine %5 önem düzeyinde bGH/*Hae III* polimorfizmi ile ergenlik dönemindeki testosteron konsantrasyonu arasındaki ilişki önemli bulunmuştur. Sonuçlar üreme ile ilgili özellikler bakımından yapılacak bir seleksiyonda bu ilişkinin kullanılabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda sonuçlar bGH/*Msp I* ve bGH/*Hae III* polimorfizmlerinin ergenlik dönemi ve ergenlik dönemi sonrası testis gelişimini tahminde işaret gen olarak kullanılabileceğini de göstermektedir.

Yao ve ark. (1996), bGH genini yedi bölgeye ayırarak tamamına yakın bir bölgesini (2.7 kb) PCR yöntemi ile çoğaltmışlardır. SSCP yöntemi ile 128 Holştayn boğasında yapılan analizde fragmentlerin dördünde toplam altı polimorfizm tespit etmişlerdir. Üçüncü intron bölgesindeki (GH4.1 olarak belirtilmiş), T→C'e geçiş polimorfizmi ve beşinci ekzon bölgesinde (GH6.2 olarak belirtilmiş) A→C'e değişim polimorfizmlerinin süt verim özellikleri ile ilişkili oldukları gösterilmiştir. GH4.1<sup>c</sup> / GH4.1<sup>c</sup> boğalarının GH4.1<sup>c</sup> / GH4.1<sup>t</sup> (P≤0.005) ve GH4.1<sup>t</sup> / GH4.1<sup>t</sup> (P≤0.0022) boğalarına göre daha yüksek süt verimine sahip oldukları bulunmuştur. GH4.1<sup>c</sup> / GH4.1<sup>c</sup> boğalarının GH4.1<sup>c</sup> / GH4.1<sup>t</sup> boğalarına göre kilogram olarak daha yüksek süt yağ (P≤0.0076) ve süt protein (P≤0.0018) miktarına sahip oldukları bulunmuştur. Süt verim özellikleri üzerine benzer etkileri olan GH6.2'deki polimorfizmin GH6.2<sup>a</sup> alleli varlığı durumunda süt verimi üzerine etkisi olduğu saptanmıştır. GH4.1 ile GH6.2'nin ortalama etkisi her laktasyonda ±300 kg süt miktarı, ±8 kg yağ içeriği ve ± 7 kg protein içeriği ile birbirine benzerdir. GH4.1<sup>c</sup> ve GH4.1<sup>a</sup>'nın süt verim özellikleri ile olan pozitif ilişkisi süt sığırlarının performansını iyileştirmede kullanılabilir.

Zhang ve ark. (1993), bGH geninde 891 bç'lik bir bölgeyi PCR-RFLP yöntemi ile incelemişlerdir. Daha önce beşinci ekzondaki polimorfizmlerden kaynaklanan A ve B allellere ek olarak taradıkları bölgede *Msp I* ile kesim yaparak C ve D allelleri bulmuşlardır. Aynı PCR ürününü *Alu I*, *Pst I*, *EcoO109I*, *Ava II* ile kestiklerinde ise herhangi bir polimorfizme rastlamamışlardır.

Zwierzchowski ve ark. (2002), %80 ve daha yüksek oranda Holştayn geni taşıyan 102 Polonya Siyah-Beyaz süt sığırlarında büyüme hormonu geni (GH), Pit-1 (PIT) ve Leptin (LEP) genlerindeki polimorfizimlerin süt miktarı ve kompozisyonu üzerine etkisini PCR-RFLP yöntemini kullanarak araştırmışlardır. Hayvanların yaşı, laktasyon aşaması ve süt somatik hücre sayısı (SCC) değerleri gözönüne alınmıştır. GH'da V, PIT'de A ve LEP'te C alleli taşıyan hayvanlar süt miktarı ve kompozisyonu açısından daha iyi performans göstermişlerdir. GH, LEP, PIT genotiplerinin süt verim özelliklerine etkisi önemli bulunmuştur. Özellikle PIT ve LEP lokuslarının bulunmasının bu etkiyi %25 düzeyine çıkardığını belirtilmiştir. Süt

özellikleri üzerinde etkili olan faktörlerin hiyerarşik dağılımı şöyle göstermişlerdir: İneğin yaşı (laktasyon paritesi), laktasyon safhası, SCC, PIT, LEP, GH.

### **2.2. Büyüme Hormonu Geni Polimorfizmi ile İlgili Diğer Türlerde Yapılan Çalışmalar**

Bastos ve ark. (2001), bir Portekiz yerli koyunu olan “Churra da Terre Quente”ye ait 40 hayvanın SSCP yöntemi ile altı gen bakımından genetik farklılığını göstermişlerdir:  $\kappa$ -kazein geninin dördüncü ekzonu, büyüme hormonunun dört ve beşinci ekzonu, büyüme hormonu reseptör geninin altıncı ekzonu,  $\beta$ -kazein geninin yedinci ekzonu,  $\alpha$ -laktalbumin geninin birinci ekzonu,  $\alpha_{s1}$ -kazein geninin on ve onbirinci ekzonları olmak üzere toplam 7 gen parçası PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin beşinde polimorfizm saptanmıştır. Yalnızca  $\kappa$ -kazein ve büyüme hormon reseptör lokusları monomorfik bulunmuştur.  $\alpha$ -laktalbumin ve  $\alpha_{s1}$ -kazein ekzonları üç yapısal farklılık göstermişlerdir.  $\beta$ -kazein ve büyüme hormonunun dördüncü ekzonu iki elektroforetik farklılık gösterirken büyüme hormonunun beşinci ekzonu ise beş yapısal farklılık göstermiştir. Bu veriler “Churra da Terre Quente”nin yüksek genetik çeşitliliğini ortaya koymuştur.

Carillo ve ark. (1996), dişi domuzlarda büyüme hormonu ve IGF-I lokusları ile süttten kesim öncesi ve sonrası ortalama günlük ağırlık artışı (ADG), fileto bölgesi ve kas pH'sı değerleri arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmışlardır. Ama yapılan bağlantı (linkage) analizleri sonucunda ölçülen değerlerle büyüme hormonu genotipleri arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır.

Kang ve ark. (2001), dil balığının büyüme özelliklerinin büyüme hormonu genindeki varyasyonlarla bağlantılı olabileceğini düşünmüşlerdir. Southern Blot analizi sonrasında PCR ürünününün Sau3AI enzimi ile kesilmesiyle farklı uzunlukta polimorfik bantlar elde etmişlerdir. Üç farklı ölçüdeki (geniş, orta ve küçük) 60 dölün büyüme hormonlarının tamamı analiz edilmiştir. Altı haplotip ve 15 genotip gözlemlenmiştir. Farklı ölçülerdeki gruplar arasında haplotipler bakımından ve genotip frekansları açısından önemli bir farklılık olduğu bulunmuştur. Büyüme

hormonu geninde DNA düzeyinde gözlenen varyasyonun büyüme ile ilgili özellikleri doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebileceği düşünülmüştür.

Kuhnlein ve ark. (1996), Beyaz Legorn tavuklarının 12 varyetesinden toplam 219 hayvanı, üç farklı genetik özellik temel alınarak (Marek hastalığına direnç, Avian lökozise direnç ve yumurta verim özellikleri) seçmiş ve RFLP yöntemi kullanılarak büyüme hormon genindeki polimorfizmleri incelemişlerdir. *Sac I* ve *Msp I* enzimleri ile yapılan kesim sonucunda *Sac I* kesim bölgesinde 1, *Msp I* kesim bölgelerinde 3 polimorfizm saptanmıştır. Toplam 16 allelin beş tanesi beklenen frekansın üzerinde bulunmuştur. Bu beş allelden A1 ve A5 alleli ile kuluçkada kalma ve yumurta sayısı arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Lechniak ve ark. (2002), yaptıkları çalışma ile 10 günlük domuz embriyolarında domuz büyüme hormonu geninin (pGH) genotip ve allel dağılımını incelemişlerdir. *Duroc* semeni ile döllenmiş altı melez (*Danimarka Landrace x Yorkshire*) dişi domuzun otopsi ile embriyoları toplanmıştır. DNA'ları izole edilip PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. *Msp I* ve *Hae II* enzimleri ile restriksiyon analizi yapılmıştır. Genotip frekansları; *Msp I* için CD 0.17, DD 0.83; *Hae II* için AA 0.33, AB 0.58 ve BB 0.09 bulunmuştur. Analiz edilen embriyolar arasında *Msp I* CC genotipine rastlanmamıştır.

Malveiro ve ark. (2001), *Algarvia* keçilerinde büyüme hormon geni polimorfizmi ile süt verim özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. 108 *Algarvia* keçisinden DNA izolasyonu yapmışlardır. SSCP yöntemi ile keçi büyüme hormonu geninin beş ekzonu da incelenmiştir. Ekzon 1 ve 2'nin her biri için iki, ekzon 3 için dört, ekzon 4 için altı ve ekzon 5 için beş yapısal model bulmuşlardır. Bu modeller ile süt, süt yağ ve süt protein verimi ile yağ ve protein içeriği karşılaştırılmıştır. Ekzon 4'ün F/F modeli ve Ekzon 5'in A/A modeli ile süt verimi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Sonuçlar gGH geninin markır destekli seleksiyonda aday bir gen olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Marques ve ark. (2003), Portekiz yerli *Serrana* keçilerinde genetik polimorfizimler ve süt verimleri arasında bir ilişki bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Bu ırkın her iki ekotipinden (*Jamelista* ve *Ribatejano*) 229 hayvanın DNA'sını izole etmişlerdir. PCR-SSCP tekniği ile keçi büyüme hormon geninde

(gGH) yüksek derecede genetik polimorfizm olduğunu saptamışlardır. Ekzon 1 ve 2'de 2, ekzon 3'de 6, ekzon 4'de 10 ve ekzon 5'de 5 yapısal SSCP deseni bulunmuştur. *Ribatejano* ekotipi için ekzon 4'ün A/B deseninin süt ve süt yağ miktarı ile süt protein yüzdesi bakımından ilişkili olduğu, *Jarmelista* ekotipi için ekzon 2'nin A/B deseninin süt miktarı ile, ekzon 1'in A/B deseni ile ekzon 2'nin B/B deseninin *Ribatejano* protein yüzdesi ile pozitif etkili olduğu düşünülmüştür ( $P<0.05$ ). Sonuçlar önceki çalışmalarda öne sürüldüğü gibi markıra dayalı seleksiyonda (MAS), gGH geninin aday bir gen olarak kullanılabilceğini ve dördüncü ekzonun süt miktarını etkileyen mutasyonların araştırılmasında kullanılacak ayrıcalıklı bir bölge olduğunu desteklemektedir.

Stephen ve ark. (2000), seçtikleri Çin yerli tavuk ırklarında büyüme hormonu geni polimorfizmini araştırmışlardır. Sarı *Wai Chow* büyüme hormonu sekans analizi sonucu 1 sessiz yerine geçme (substitusyon), 31 araya girme (insersiyon) ve diğer yer değiştirme mutasyonlarının intronlar arasında yaygın olarak bulunduğu görülmüştür. Ayrıca birinci intronda daha önce belirlenmemiş bir *Msp I* kesim bölgesi tanımlanmıştır. İtron 1 polimorfizmi 28 yerli Çin tavuğu popülasyonunda tanımlanmıştır. Bu sebeple cGH (Chicken Growth Hormone) geninin besleme programlarının dizaynında olduğu kadar filogenetik analizlerde de faydalı olabileceği belirtilmiştir.

**3. MATERYAL ve YÖNTEM****3.1. Materyal****3.1.1. DNA Materyali**

Araştırmada kullanılan DNA materyali, FAO'nun "Gen Kaynaklarının Korunması" programı kapsamında koruma altında tutulan yerli sığır ırklarından ve Kilis ırkından genetik olarak farklı olduğu mikrosatellit DNA analizi ile belirlenmiş (Özcan ve Altınalan, 2005) Urfa'nın Siverek ilçesinde yetiştirilen köy sürülerindeki Yerli Sarı sığırlardan sağlanmıştır. Çalışmada kontrol ırk olarak değerlendirilen Siyah Alaca sığırlar ise Ç.Ü. Ziraat Fakültesi'nin Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden sağlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılacak sığır ırkları ile kanların toplandığı merkezler

<b>İrk</b>	<b>Kaynak</b>	<b>♂/♀</b>	<b>Ör. Sayısı</b>
1) <b>BI</b>	Marmara Tarımsal Ar. Enst./Balıkesir	4/21	25
2) <b>YK</b>	Lalahan Hayvan Araş. Enst./Anakara	7/14	21
3) <b>Ki</b>	Çukurova Tar. Araş. Enst./Adana	5/16	21
4) <b>DAK</b>	Doğu Anadolu Tar. Araş. Enst./Erzurum	14/12	26
5) <b>YS</b>	Urfa/Siverek Köy Sürüleri	0/21	21
6) <b>SA</b>	Ç.Ü. Büyükbaş Hayv. Yet.Ünitesi/Adana	0/20	20

**3.1.2. Kullanılan Aletler ve Diğer Malzemeler**

Bu tez çalışmasında kullanılan aletlerden santrifüj Hettich'den, PCR cihazı Techne ve Eppendorf'dan, yatay ve dikey elektroforez takımları ile güç kaynağı ATTO'dan, otoklav Hirayama'dan, inkübatör Nüve'den, hassas terazi Ohaus'dan, spektrofotometre Pharmasia'dan, UV lamba Vilbert Lourmat'dan, vorteks ve



manyetik karıştırıcı CAT'dan, steril kabin Bilser'den, pH metre Nel'den, otomatik pipetler Gilson ve Biohit'den, ependorf tüpler Sigma'dan, jel görüntüleme cihazı UVP'den satın alındı. Ayrıca görüntüleme işlemi için Ç.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü'ne ait Uvitech marka görüntüleme cihazı da kullanılmıştır.

**A****B**

**Resim 3.1.** Çalışmada kullanılan cihazlardan; **A:** UVP marka görüntüleme cihazı, **B:**Eppendorf marka PCR cihazı

### 3.1.3. Kimyasal Maddeler

Jel elektroforezinde kullanılan LE agaroz, akrilamid, bisakrilamid, PCR reaksiyonunda kullanılacak Taq polimeraz, dNTP'ler, tamponlar, MgCl<sub>2</sub> ve primerler, elektroforezde kullanılacak tampon çözeltiler için gerekli kimyasallar, RFLP yönteminde kullanılacak *Msp I* restriksiyon endonükleaz enzimi ile yardımcı diğer kimyasallar Merck, Sigma, MBI Fermentas, Boeringer Mannheim ve Promega'dan satın alınmıştır.

**3.2.Yöntem**

Türkiye yerli sığır ırklarının büyüme hormonu geni polimorfizimleri yönünden incelenmesi çalışması, sığır kanlarından DNA izolasyonu, büyüme hormonu geninde incelenecek bölgenin (1181-2072. pozisyonlar arası) PCR ile çoğaltılması ve *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR ürününün kesilmesi (PCR-RFLP), elektroforez ile jel görüntülerinin elde edilmesi ve istatistiksel analizle verilerin değerlendirilmesi aşamalarını kapsamaktadır.

**3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu**

Değişik bölgelerdeki altı farklı yerli sığır ırkının EDTA'lı tüplere alınan kanlarından genomik DNA izolasyonu modifiye edilmiş “*Salting Out*” yöntemine (Miller et al., 1988) göre yapılmıştır (**Ek 2.1.**).

**3.2.2. bGH Gen Bölgesinin Çoğaltılması için Uygun Primerlerin Seçimi**

bGH gen dizisi (Gordon ve ark. 1983) **M57764** ulaşım numarası ile NCBI gen bankasından sağlandı. Daha önce yapılan çalışmalar göz önünde tutularak en çok polimorfizmin görüldüğü bölgeler için Zhang ve arkadaşlarının (1993) dizayn ettiği primerlerin kullanılmasına karar verildi. Buna göre 22'şer bç'den oluşan iki primer sentezletildi:

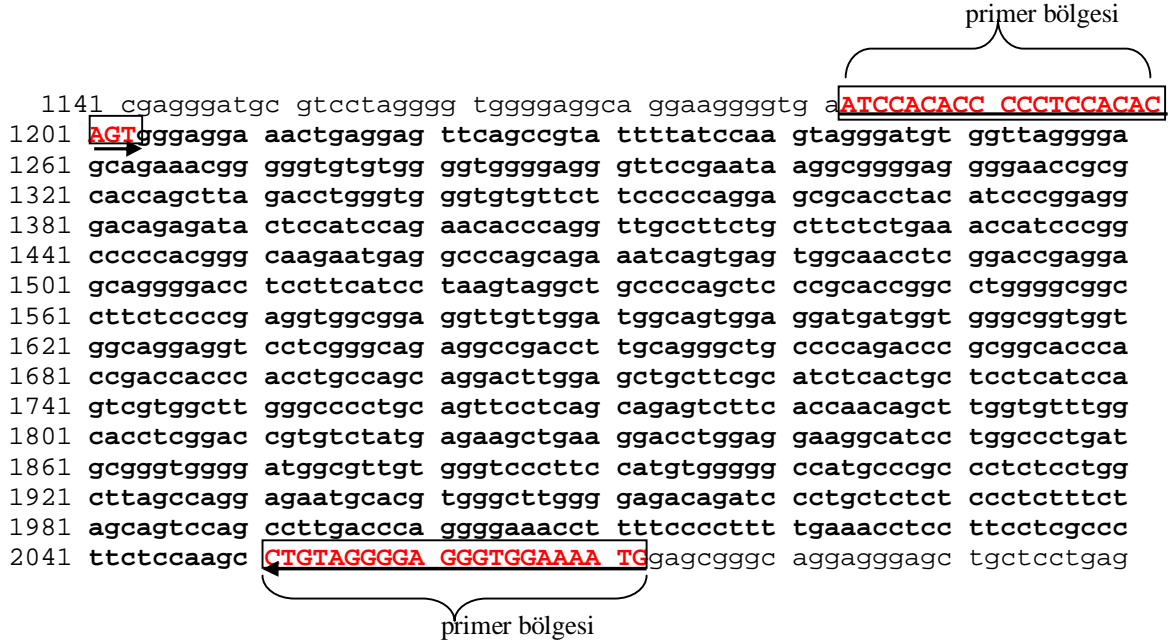
**Primer A:** 5'→ATC CAC ACC CCC TCC ACA CAG T→3'

**Primer B :** 5'→CAT TTT CCA CCC TCC CCT ACA G →3'

Bu primerler kullanılarak bGH geninin, 1181. ve 2072. nükleotidler arasında kalan 2. intron (3' bölgesi), 3. ekzon, 3. intron, 4. ekzon ve 4. intron (5' bölgesi)'u da içine alan 891 bç'lik bölgesinin çoğaltılması hedeflendi (**Çizelge 3.2.**).

**Çizelge 3.2.** bGH geninde primerlerin bağlanacağı bölgeler.

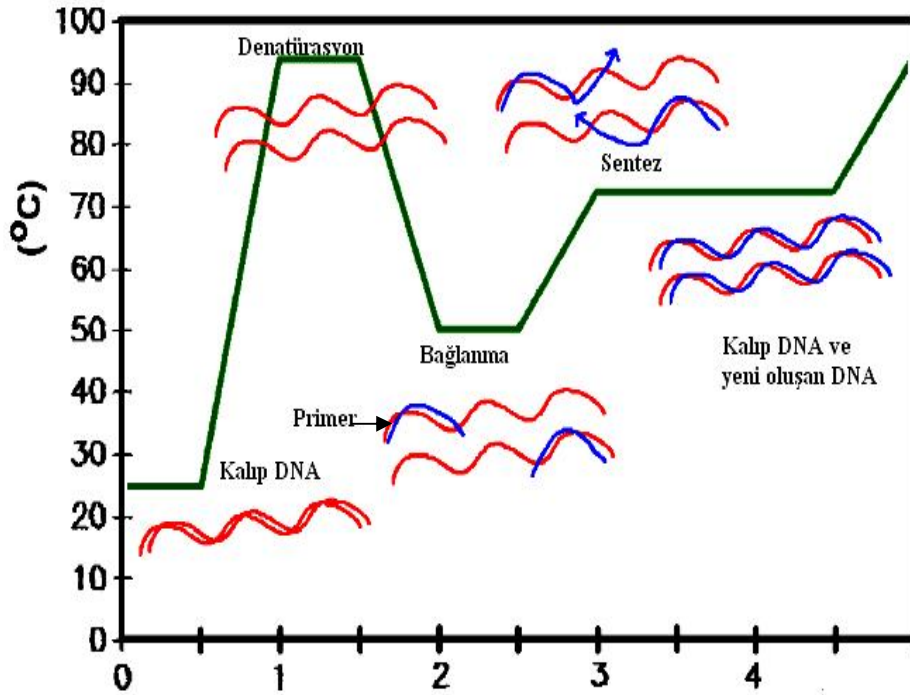
Genin yönü : 5'→3'  
 bGH geninin toplam büyüklüğü : 2856 bç  
 Çoğaltılan bölgenin (koyu renkli) büyüklüğü: 891 bç



### 3.2.3. bGH Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

Bilindiği gibi PCR, laboratuvar şartlarında hedef DNA/RNA'nın seçici olarak milyonlarca kopya halinde çoğaltılmasına imkan veren bir test tüp sistemidir (Tompkins, 1992).

PCR yönteminde üç temel aşama mevcuttur. Bunlar; denatürasyon, bağlanma ve sentez'dir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PCR aşamaları.

PCR çalışmalarına başlanmadan önce, ön çalışma olarak, reaksiyonda kullanılacak tampon, dNTP, DNA, primer, Taq polimeraz enzimi ile  $MgCl_2$  miktar ve çeşidi, farklı reaksiyonlarda, farklı oranlarda kullanılarak uygun miktarlar belirlendi (Çizelge 3.3.). Buna göre en iyi sonucu vermesinden dolayı  $MgSO_4$  yerine  $MgCl_2$ , Pfu yerine Taq polimeraz,  $MgCl_2$ 'lü tampon yerine,  $MgCl_2$  'süz  $(NH_4)_2SO_4$  tampon tercih edildi. Primerler 100 pmol/μl olacak şekilde steril su ile çözüldü. Homojenitenin tam sağlanması açısından + 4 °C'de 24 saat bekletildi. Daha sonra 25 pmol/μl olacak şekilde yeniden tüplere bölüştürüldü. Kullanılacak diğer kimyasallar da, etkinliklerinin devamının sağlanması ve steril şartların korunması açısından bir defada çözümlü kullanılabilecek şekilde mikro tüplere paylaştırıldı.

**Çizelge 3.3.** PCR bileşenleri ve reaksiyonda kullanılacak optimum miktarları.

<b>Reaksiyon Bileşeni</b>	<b>Bileşenlerin Özellikleri</b>	<b>Alınan Miktar</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
Tampon (10x)	10x Tris-HCl (pH:8.8) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5µl	1x
Primer A	25 pmol/ µl	0.1 µl	2.5 pmol
Primer B	25 pmol/ µl	0.1 µl	2.5 pmol
dNTP karışımı	10mM/200 µl	0.5 µl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM/ml	1.5 µl	0.75mM
Taq Polimeraz	5 IU/µl	1.0 µl	5 IU
Kalıp DNA	40 ng/µl	2.0 µl	~80 ng
Toplam Hacim	-	25 µl	-

Özellikle primer yapışma sıcaklığı, ürünün özgüllüğü açısından çok önemlidir. Primer yapışma sıcaklıklarının (annealing) hesaplandığı  $T_m=2(A+T)+4(G+C)$  formülü ile yaklaşık bir değer elde edilmektedir. Laboratuvarımızda bulunan Eppendorf'un Mastercycler Gradient® cihazı ile bir defada, hassas aralıklarda, 12 farklı primer yapışma sıcaklığı uygulanabilmektedir. Yukarıdaki formül ile ~62 °C olarak bulunan yapışma sıcaklığı referans gösterilerek cihaz programlanmıştır. Bu şekilde her bir ırk için aynı yöntem ile primer bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. Buna göre PCR sıcaklıkları **Çizelge 3.4.**'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR sıcaklıkları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
1- Tam Denatürasyon	94°C		1
2- Bağlanma Sıcaklığı	62°C*		1
3- Sentez	72°C		1
4- Tam Denatürasyon	94 o°C	5 dk	1
5- a)Denatürasyon	94°C	45 sn	48
	BI 62°C	45 sn	
	YK 62°C		
b)Primer Bağlanma Sıcaklığı	DAK 65°C		
	YS 62°C		
	SA 62°C		
	GSK 62°C		
c)Sentez Sıcaklığı	72°C	1 dk	
6- Son Sentez Sıcaklığı	72°C	5 dk	1

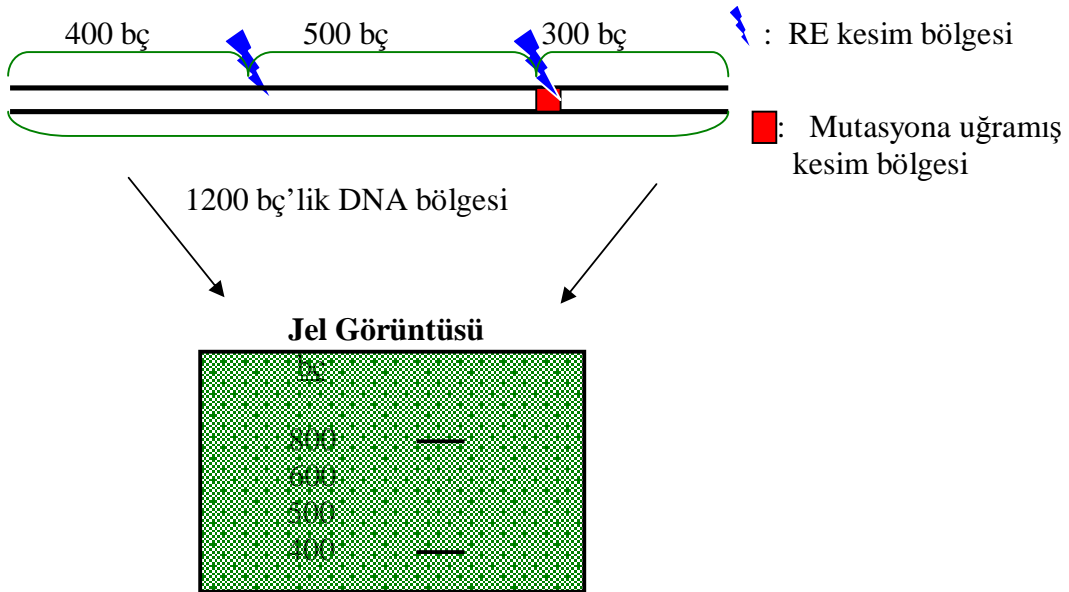
\*Her ırk için belirlenen primer bağlanma sıcaklığına göre değişmektedir.

### 3.2.4. PCR Ürününün Elektroforezi

891 bç'lik hedef DNA parçasının PCR çalışmasının başarılı olup olmadığını anlamak ve oluşabilecek ekstra bantları görebilmek için %2'lik Agaroz jel (Ek 1.2.) elektroforezi yapıldı. Her bir reaksiyon tüpünden 5 µl DNA alınıp 1 µl 6X yükleme tamponu (Ek 1.4.) ile homojenize edildi. Daha sonra örnekler jel kuyularına yüklenerek 100 V, 45 mA'de yaklaşık 1.5 saat yürütüldü. Süre sonunda jel, UV ışığı altında değerlendirildi.

### 3.2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE) DNA'yı çok özgül olarak belirli bölgelerden tanıyıp keserler (Durmaz, 2002). Genom boyunca, özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerde, her 200 nükleotidde 1 dizi farklılığı görülür. Bu farklılığı yaratan nükleotid değişiklikleri; tek bir nükleotid çiftinde değişiklik, bir ya da birden fazla nükleotid çiftinin çıkarılması (delesyon) veya araya sokulması (insersiyon) şeklinde olabilmektedir. Bu değişiklikler bir restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası yaratabilirler. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar "restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri" (RFLP) olarak adlandırılır (Klug ve Cummings, 2003)(Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** RFLP metodu. Normal şartlarda 300, 400 ve 500 bp'lik 3 bant elde edilmesi gerekirken, ikinci kesim bölgesinde oluşan mutasyondan dolayı 800 ve 400 bp'lik 2 bant oluşmuştur.

Bu tez çalışmasında restriksiyon enzimi olarak *Msp I* kullanıldı. *Msp I* enzimi DNA'yı şu baz dizilerini tanıyarak kesmektedir:



Restriksiyon enzimleri oldukça pahalı ürünlerdir. Bu yüzden enzimin en düşük dozda etkili olabileceği miktar ön çalışmalar sonucu belirlendi. Buna göre PCR ile çoğaltılan gen bölgesinin kesim reaksiyonu şu şekilde hazırlandı (**Çizelge 3.5.**).

**Çizelge 3.5.** Kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

<b>Bileşenler</b>	<b>Alınan Miktar</b>
Kalıp DNA	10 µl (1 µg/µl)
Core Buffer (10x)*	2 µl
Msp I (10 u/ µl)	0.25 µl (2.5 u)
Saf Su	7.75 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>

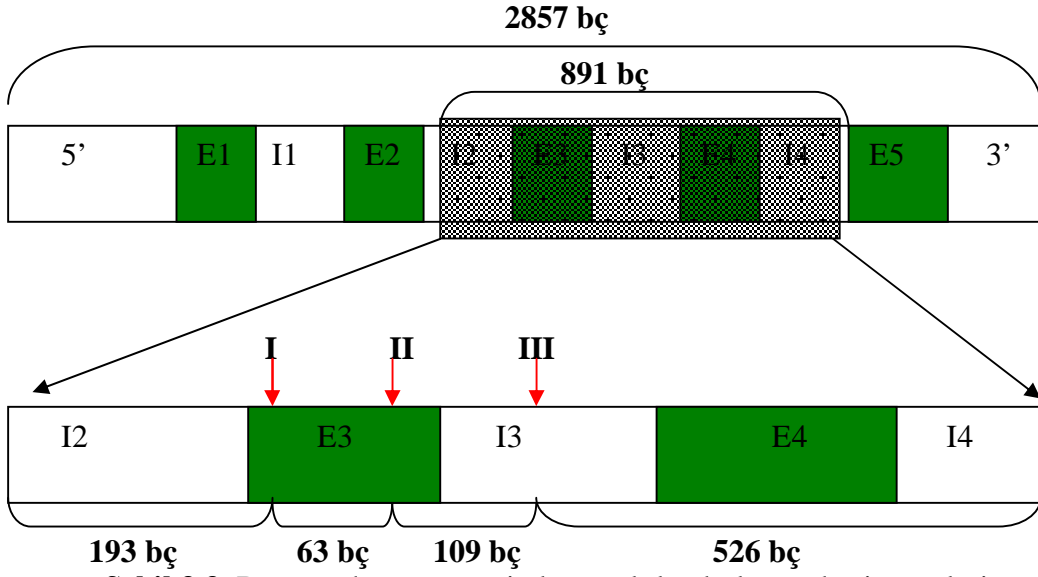
\*10mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithioerythritol (DTH), pH 7.5.

En son enzim eklenecek şekilde reaksiyon bileşenleri tüplere konulup içeriğin homojenizasyonu sağlandıktan sonra 37 °C'de 1.5 saat bekletildi. Daha sonra enzimin inaktivasyonu için 65 °C'de 15 dakika tutuldu. DNA elektroforezine kadar ise 4 °C'de saklandı.

### **3.2.6. bGH Geninde RFLP**

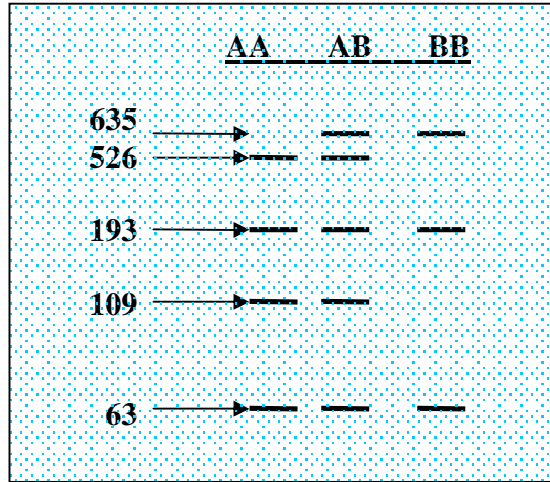
Çoğaltılan 891 bç'lik gen parçasının büyüme hormon genindeki yeri **Şekil 3.3.**'de koyu renkle gösterilmiştir. *Msp I* enzimi bu gen parçasını üç yerden tanıyıp kesmektedir. Kesim bölgeleri I, II ve III olarak numaralandırıldı ve oklarla gösterildi.





Şekil 3.3. Büyüme hormon geninde çoğaltılan bölge ve kesim yerleri.

*Msp I* enzimi ile kesim sonucunda 3 tip bant deseni (genotip) elde edilmiştir. Bunlardan AA genotipi her iki allelin tam kesimi sonucu 197, 63, 109, 526 bç uzunluğunda bantlar veren homozigot tam kesim ürünüdür. Allellerden birinde, III numaralı bölgede kesim gerçekleşmediğinde oluşan AB genotipi 635, 526, 197, 109 ve 63 bç uzunluğundaki bantlardan oluşmaktadır (İki allel birbirine eşbaskın olduğu için mutasyonun olduğu bant B olarak isimlendirildi). Son olarak her iki allelde de III numaralı bölgede mutasyon olması durumunda oluşan BB genotipi 197, 63, 635 bç uzunluğundaki bantlardan oluşan homozigot kesim ürünüdür (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. *Msp I* enzimi ile kesim sonrası oluşan AA, AB ve BB genotipleri.

### 3.2.7. RFLP Elektroforez Çalışmaları

Kesim işlemi sonucu ortaya çıkacak en küçük parçaların görülebilmesi için Agaroz jelden daha hassas sonuçlar veren poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yapıldı. Polimorfizmlerin izlenebilmesi için uygun akrilamid jel konsantrasyonu Ek 1.1.'deki tablodan yararlanılarak % 8 olarak belirlendi (Çizelge 3.6.).

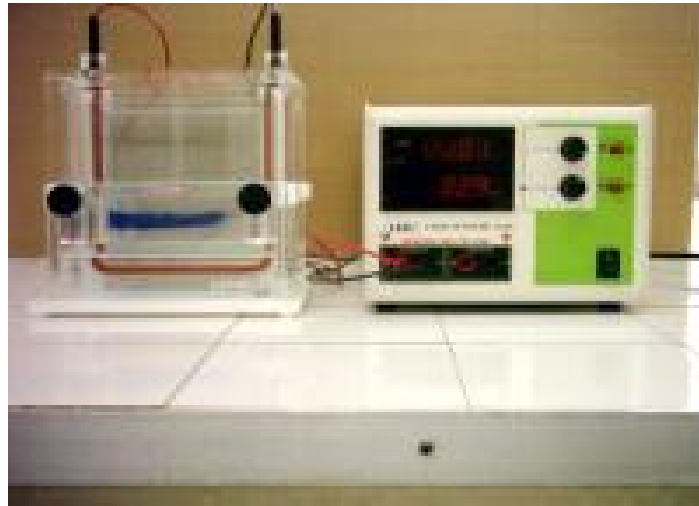
Çizelge 3.6. % 8'lik Akrilamid jel için gerekli bileşenler

Madde	İçerik	Alınan Miktar
% 8 AB solüsyonu	3.3 ml %30 stok AB* solüsyonu, 2 ml 10X TBE**, 14.7 ml saf su)	20 ml
TEMED	Tetramethylethylenediamine	10 µl
% 25 APS	Amonyum per sülfat	150 µl
1X TBE	1 lt için:100 ml10X TBE 900 ml H <sub>2</sub> O	Dikey jel ünitesinde tampon olarak kullanıldı.

\*29:1 g Acrylamide-bisacrylamide saf su ile çözülüp 100 ml'ye H<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

\*\*1 lt için 108 g Tris-HCl, 55 g Boric Asit, 0.5 M EDTA (pH:8.0)

Jelin iyi polimerize olabilmesi için elektroforez aletinin, özellikle cam aparatlarının, toz ve deterjan kalıntılarından arındırılması gerekmektedir. Bu sebeple 14x14x0.1 cm<sup>3</sup> ebatlarındaki cam levhalar kullanılmadan önce etanol ile temizlendi. Jel takımı hazırlandıktan sonra bir erlenin içerisine 20 ml %8 AB solüsyonu konuldu. Üzerine 150 µl %25'lik APS eklendi ve 15 dakika kadar bekletildi. Daha sonra karışımın üzerine 10 µl TEMED eklenerek iyice karışması sağlandı. Zaman kaybetmeden jel kalıbına hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde boşaltıldı. Jel tarakları yerleştirildikten sonra, polimerizasyon için 40 dakika kadar beklendi. Polimerizasyon sırasında jel takımının sarsılmamasına dikkat edildi. Daha sonra cam levhalar arasında polimerize olmuş jel elektrik akımının verileceği elektroforez ünitesine yerleştirildi. Ünitenin içerisine akım telini kapatacak kadar ve jel kuyularını geçecek şekilde 1X TBE konuldu. Tarak çıkarıldıktan sonra ilk ve son kuyuya 2 µl markır (50 bp DNA Ladder, Fermentas®) kondu. Diğer kuyulara, her örneğin hem PCR ürünü hem de *Msp I* kesim ürünü yanyana gelecek şekilde yüklendi. Yükleme bittikten sonra jel takımının dengede olup olmadığı su terazisi ile kontrol edildi. Güç kaynağı 120 V (5 V/cm) ve 45 mA'de 3 saat 45 dakika çalışacak şekilde ayarlandı (**Resim 3.2.**).



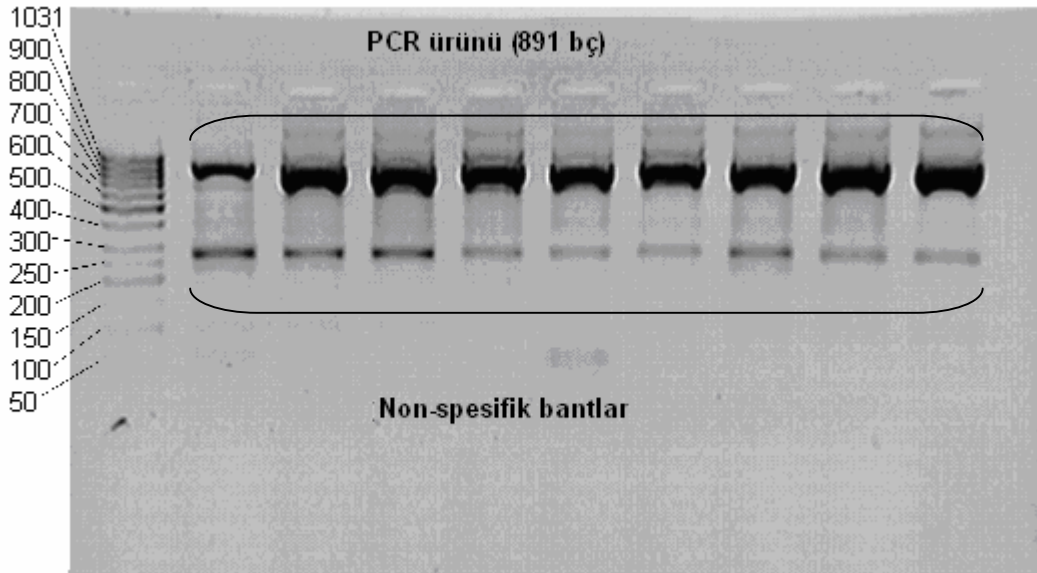
**Resim 3.2.** PAGE için güç kaynağı ve dikey elektroforez ünitesi

Süre sonunda jeller cam levhalardan ayırılarak başka bir kaptaki son konsantrasyonu 0.5 µl/ml olacak şekilde EtBr (**Ek 1.3.**) eklenen 1X TBE tamponunun içerisine alındı. Boyama işlemi için yaklaşık 5 dakika bekletildi. Süre sonunda jel, fazla EtBr'ün uzaklaştırılması için saf su içerisine alındı. Son olarak da görüntüleme cihazında jelin görüntüsü alındı. Bu işlemler her ırk için tekrar edildi.

### 3.2.8. Jel Dökümantasyon Çalışmaları

Altı yerli sığır ırkından toplam 134 örneğin PCR ürünleri % 2'lik Agaroz jelde görüntülendi. Doğu Anadolu Kırmızısı ırkının 8, Kilis ırkının ise 1 örneğinin DNA kalitesinin düşük olması dolayısıyla PCR'ı başarılı olmadı. Bu sebeple 125 örnek değerlendirmeye alındı.

PCR ve RFLP çalışmaları sırasında gen bölgesinin büyüklüğü ve kesim sonucu ortaya çıkacak bantların büyüklükleri bilindiğinden diğer non-spesifik bantlar göz ardı edildi (**Resim 3.3**). Tüm ırklara ait RFLP çalışmaları **Ek 2**'de verilmiştir.



**Resim 3.3.** Agaroz jelde PCR ürünlerinin görüntüsü

**3.2.9. İstatistiksel Analiz**

Çalışmanın istatistiği için Popgene® 1.31v.(Yeh ve ark. 1999), MS Excel® ve Minitab® 13v. paket programları kullanıldı.

**3.2.9.1. Popülasyonların bGH Gen Lokusu Polimorfizmi Bakımından Genetik Parametreleri**

Popülasyonlardaki genotip ve allel sayıları jel fotoğraflarına bakılarak saptandı. Popülasyonların genotip frekansları (3.1) eşitliğine göre hesaplandı.

$$\begin{aligned}f(AA) &= p^2 = \Sigma(AA)/n \\f(Aa) &= 2pq = \Sigma(Aa)/n \\f(aa) &= q^2 = \Sigma(aa)/n\end{aligned}\tag{3.1}$$

Eşitlikteki,

n : Popülasyondaki birey sayısını göstermektedir.

Popülasyonların örnekteki genotip frekanslarına göre allel frekansları (3.2) ve (3.3) eşitliklerine göre hesaplandı.

$$f(A) = p = \frac{göz(AA) + 1/2 göz(AB)}{N}\tag{3.2}$$

$$f(B) = q = 1 - p\tag{3.3}$$

Eşitliklerde,

göz : Gözlenen genotip değerlerini,

f(A)= p: A allelinin frekansını,

f(B)= q: B allelinin frekansını

N : Popülasyondaki örnek sayısını göstermektedir.

Bir popülasyondaki genetik çeşitliliği ölçmek için gözlenen ve beklenen heterozigotluklar karşılaştırılır (Marson ve ark. 2005). Tüm ırkların genetik çeşitlilik (genetic variability) ortalamasını bulmak için gözlenen heterozigotluk

düzeyleri eşitlik (3.4)'e göre, beklenen heterozigotluk düzeyi eşitlik (3.5)'e göre hesaplandı.

$$H_{o1} = \sum_{i \neq j} \frac{N_{1ij}}{N} \quad (3.4)$$

Eşitlikteki;

$N_{ij}$  : 1. lokustaki heterozigot bireylerin sayısı,

$N$  : Analiz edilen toplam birey sayısıdır.

$$H_{e1} = 1 - \sum_{i=1}^n p_{1i}^2 \quad (3.5)$$

Eşitlikteki;

$p_{1i}$  : 1. lokustaki  $i$  allel frekansı,

$n$  : 1. lokustaki allellerin sayısıdır.

Genetik parametrelerin hesaplanması için Popgene® 1.31v. istatistik programı kullanıldı.

### **3.2.9.2. Popülasyonların Hardy-Weinberg Prensibine Göre Denge Analizi**

Hardy-Weinberg prensibi bazı basit varsayımlar altında bir popülasyondaki genotip ve allel frekanslarının ne olacağını gösterir. Bu varsayımlar gerçek popülasyonların karşılaştığı birçok karmaşık durumun bulunmadığı ideal bir popülasyonu belirlemektedir:

- Bütün genotipler eşit hayatta kalma oranına ve üreme başarısına sahiptir. Yani hiç bir seçim yoktur.
- Yeni allel oluşturacak ya da mevcut bir alleli diğerine dönüştürecek mutasyonlar bulunmaz.
- Popülasyonun içine veya içinden dışına hiçbir göç yoktur.
- Popülasyon sınırsız bir genişliğe sahiptir. Bir başka deyişle, bu popülasyon örnekleme hatalarının ve diğer rastgele etkilerin gözardı edilebileceği kadar büyük bir popülasyondur.

Hardy-Weinberg kanununa göre yukarıdaki varsayımlara uygun popülasyon aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- Bir Popülasyondaki allel frekansları nesilden nesile değişmez; diğer bir deyişle popülasyon evrimleşmez.
- Bir nesil süren rastgele eşleşmenin ardından genotip frekansları allel frekanslarından tahmin edilebilir.

Denge test edilirken öncelikle genotip frekansları hesaplanmalıdır. Daha sonra genotip frekanslarından allel frekansları hesaplanır. Son olarak hesaplanan allel frekansları kullanılarak genotip frekansları tahmin edilir. Hardy-Weinberg kanununa göre genotip frekanslarının  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$  denkleminde uyması beklenir. Aksi takdirde varsayımlardan biri veya bir kaç bu popülasyon için geçersizdir (Klug ve Cummings, 2003).

Hardy-Weinberg denge eşitliği için genotiplerin beklenen değerleri eşitlik (3.6)'ya göre hesaplandı.

$$\begin{aligned} E(AA) &= p^2 n & (3.6) \\ E(Aa) &= 2pq n \\ E(aa) &= q^2 n \end{aligned}$$

Eşitlikte,

p: A allelinin frekansı

q: B allelinin frekansı

n: O popülasyondaki birey sayısını göstermektedir.

Genetikte gözlenen sapmaları değerlendirmek önemlidir. Ölçülen değerler ile beklenen değerler arasında gerçek bir fark olmadığı kabul edilerek “sıfır hipotezi” ( $H_0$ ) kurulur. Bu hipotezi test etmek için istatistiksel analizler kullanılır. Buna dayanarak sıfır hipotezi ya reddedilir ya da reddelimez. Eğer reddedilmişse beklenen orandan sapma sadece şansa bağlanmaz. Dolayısıyla istatistiksel analizler, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Bu teste **uyumun mükemmelliği** (Goodness of fit) adı verilir. Sıfır hipotezinin mükemmellik

uyumuna karar vermek için geliştirilen en basit istatistiksel testlerden biri Ki-kare ( $\chi^2$ ) analizidir. Bu sebeple gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için (3.7) eşitliğindeki Ki-kare istatistik analiz yöntemi kullanıldı.

Ki-kare analizi eşitliği;

$$c^2 = \sum \frac{(G_i - B_i)^2}{B_i} \quad (3.7)$$

Eşitlikteki,

$G_i$ : i kategorisi için gözlenen değeri,

$B_i$ : i kategorisi için beklenen değeri göstermektedir.

### **3.2.9.3. Polimorfik Allel Frekansının Irka/Irklara Özgü Olup Olmadığının Test Edilmesi**

Polimorfik allel frekansının (q) ırka veya ırklara bağlı olarak değişip değişmediğini test etmek için (3.7) eşitliğindeki Ki-kare istatistik analiz yöntemi kullanıldı.

### **3.2.9.4. Polimorfik Allel Dağılımı Bakımından Irkların Karşılaştırılması**

Popülasyonların q alleli dağılımı bakımından farklılık gösterip göstermediğini anlamak üzere birbirleri ile karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi bağımsız k sayıda değişkenin birbirleri ile karşılaştırılmasına olanak veren nonparametrik bir test olup Ki-kare dağılımı göstermektedir.

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i \cdot}{n_i} - 3(n+1) \quad (3.8)$$



Eşitlikteki;

n: örnek büyüklüğünü,

k: grup sayısını,

$R_i$ : Sıra numaraları toplamını,

$n_i$ : i. gruptaki örnek sayısını göstermektedir.

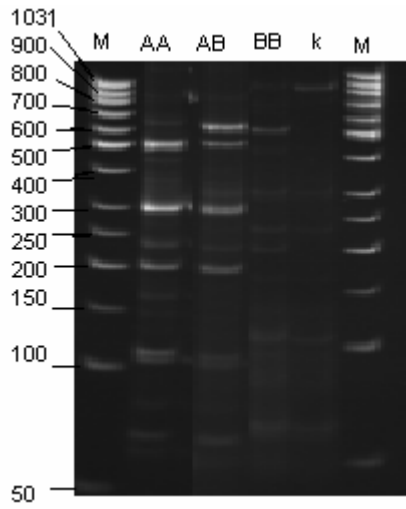
Bulunan H değeri  $\chi^2_{(k-1), \alpha}$  değeri ile karşılaştırılarak  $H_0$  hipotezi test edilir.

Bu çalışmada Kruskal-Wallis testi analizi için Minitab® v.13 paket programı kullanıldı.

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

### **4.1. Jel Dökümantasyon Çalışmalarına Yönelik Bulgular**

Altı ırka ait bGH *Msp I*/RFLP çalışması sonucunda, taranan bölgenin yalnızca 3. kesim bölgesinde (intron III bölgesinde) mutasyon olduğu görüldü. Buna göre 3 genotip belirlendi. Bunlar AA, AB ve BB genotipleridir (**Resim 4.1**). Alleller birbirlerine kodominant oldukları için A ve B olarak adlandırıldı.



**Resim 4.1.** *Msp I*/RFLP metodu ile belirlenen genotipler (M: Markır, AA: Homozigot tam kesim ürünü, AB: Üçüncü kesim bölgesinde mutasyon olan heterozigot kesim ürünü, BB: Üçüncü kesim bölgesinde mutasyon olan homozigot kesim ürünü, k: Kesilmemiş PCR ürünü).

### **4.2. Popülasyonların İstatistiki Olarak Analizi**

#### **4.2.1. Genotip ve Allel Frekanslarının Irklara Göre Dağılımı**

Beş yerli ve bir kültür sığır ırkına ait toplam 125 genomik DNA örneği PCR yöntemi ile çoğaltılarak *Msp I* enzimi ile kesildi ve PAGE ile görüntüledi. Jel fotoğraflarına bakılarak genotipler tespit edildi. Genotiplere bakılarak alleller sayıldı. MS Excel® programında AA genotipi için 11, AB genotipi için 12 ve BB genotipi

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

için 22 rakamı verilerek tablo oluşturuldu (**Çizelge 3.7.**). Buna göre A alleli için 1, B alleli için 2 rakamı verilmiş oldu.

**Çizelge 4.1.** Irklara göre genotiplerin dağılımı.

	<b>BI</b>	<b>YK</b>	<b>YS</b>	<b>SA</b>	<b>Ki</b>	<b>DAK</b>
	11	22	11	12	12	11
	11	11	11	12	12	12
	12	12	11	12	12	11
	22	11	12	12	12	22
	11	11	11	12	12	12
	11	12	12	12	22	12
	12	11	11	12	12	12
	12	12	11	12	12	12
	12	12	12	12	12	11
	11	11	11	11	12	12
	11	12	22	12	12	11
	11	22	12	12	12	12
	11	12	12	12	22	12
	12	12	12	12	12	12
	11	12	11	12	12	12
	12	12	12	12	12	12
	12	11	11	12	12	12
	12	11	11	12	12	12
	11	12	12	12	11	
	11	12	11	12	12	
	12	12	12			
	11					
	11					
	11					
	11					
	<b>BI</b>	<b>YK</b>	<b>YS</b>	<b>SA</b>	<b>Ki</b>	<b>DAK</b>
AA	15	7	11	1	1	4
AB	9	12	9	19	17	13
BB	1	2	1	0	2	1
<b>Toplam</b>	<b>25</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>18</b>

Yöntem **3.2.9.1**'de verilen **(3.1)** eşitliğinden genotip frekansları hesaplandı.

Buna göre BI için genotip frekansları şöyle belirlendi:

$$f(AA)= p^2 = 15 / 25 = 0.6$$

$$f(AB)= 2pq = 9/25 = 0.36$$

$$f(BB)= q^2 = 1/25 = 0.04$$

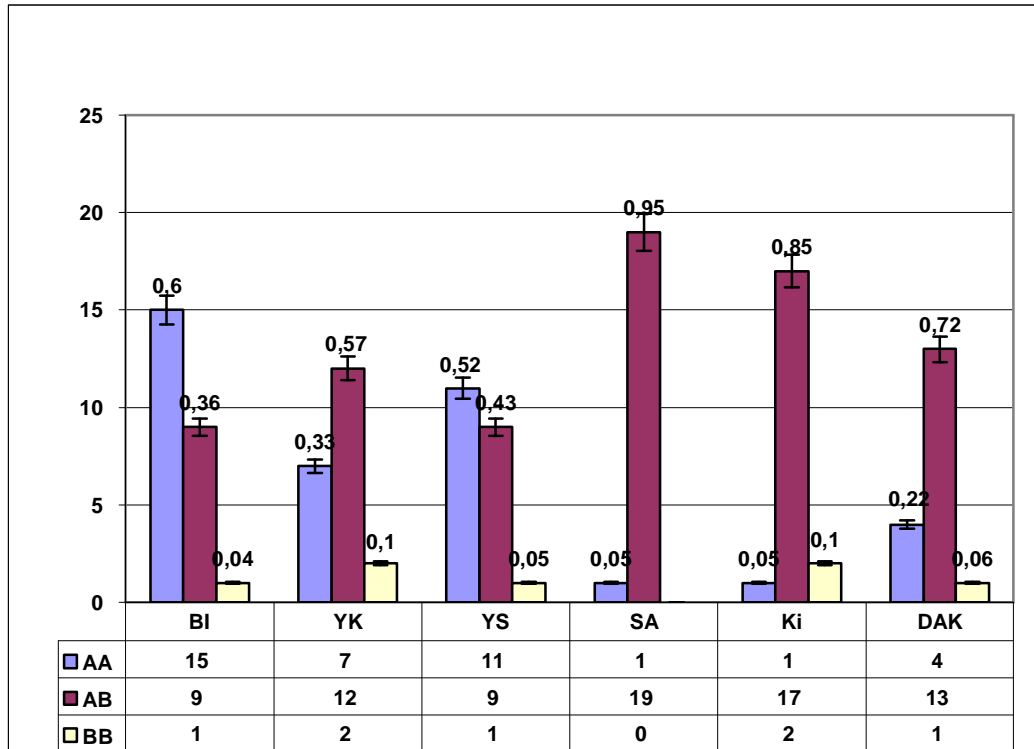
Tüm popülasyonlar genelinde toplam genotip frekansları aynı yöntemle hesaplandı(**Çizelge 4.2**).

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

**Çizelge 4.2.** Tüm popülasyonlar genelindeki genotip frekansları.

Genotip	N	Frekans
AA ( $p^2$ )	39	0.31
AB ( $2pq$ )	79	0.63
BB ( $q^2$ )	7	0.06

Her bir popülasyon için hesaplanan genotip frekansları ve ırklara göre dağılımı **Şekil 4.1.**'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Genotip frekansları ve ırklara göre dağılımı.

Tüm popülasyonlar düzeyinde AA genotipinin frekansı 0.31 iken AB genotipinin frekansı 0.63 ve BB genotipinin frekansı 0.06 bulundu (**Çizelge 4.2**). Irklara bakıldığında ise en yüksek AA genotip frekansına 0.6 ile Boz Irk sahipken onu 0.52 ile Anadolu Sarısı ırkı izledi. Bu iki ırk dışındaki diğer ırklarda ise AB genotipinin diğer genotiplere göre daha yüksek frekansta olduğu görüldü. AB genotipinin en sık görüldüğü ırk 0.95 ile kültür ırkı olan Siyah Alaca ırkı oldu. Bu genotip bakımından Siyah Alaca ırkını 0.85 ile Kilis ve 0.72 ile Doğu Anadolu Kırmızısı takip etti. Diğer ırkların AB genotipinin frekansları ise Yerli Kara'da 0.57,

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

Yerli Sarı'da 0.43 ve Boz Irk'ta ise 0.36 idi. BB genotipinin frekansı, görüldüğü ırklar içerisinde en düşük frekansa sahip genotiptir: BB genotipi sırasıyla BI'da 0.04, YK'da 0.10, YS'da 0.05, Ki'de 0.10 ve DAK'da 0.06 olarak bulundu.

BB genotipi tüm Anadolu ırklarında mevcutken Siyah Alaca ırkı sığırlarda gözlenmedi.

Yöntem 3.2.9.1'deki (3.2) ve (3.3) eşitlikleri kullanılarak tüm ırklar için allel frekansları bulundu. Buna göre BI için p ve q değeri şöyle hesaplandı:

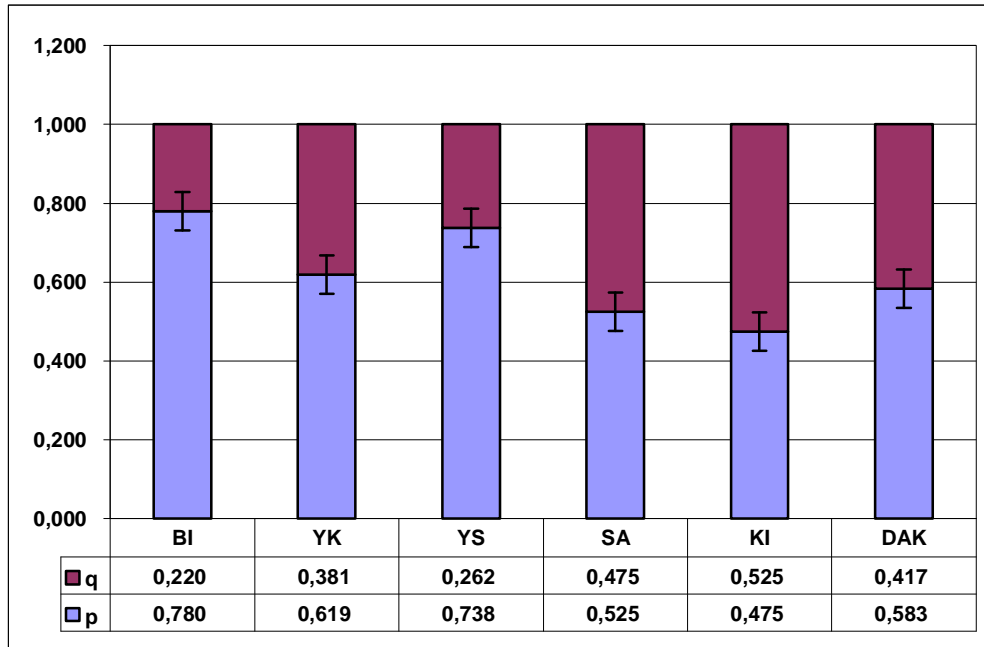
$$p=(15+9)/25=0.78$$

$p+q=1$  eşitliğinden  $q=1-0.78=0.22$ 'dir. Diğer ırklar için p ve q değerleri aynı şekilde hesaplanarak **Çizelge 4.3.**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Irklara göre ve popülasyon genelinde allel frekanslarının dağılımı.

	BI	YK	YS	SA	Ki	DAK	Pop. Geneli	Anadolu Irkları
p	0.780	0.619	0.738	0.525	0.475	0.583	0.620	0.639
q	0.220	0.381	0.262	0.475	0.525	0.417	0.380	0.361

Allel frekanslarının ırklara göre dağılımı **Şekil 4.2**'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Irklara göre allel frekansları.

#### **4.ARASTIRMA BULGULARI VE TARTISMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

Tüm popülasyonlar genelinde A allelinin frekansı (p), polimorfik B allelinin frekansından (q) yüksek bulundu (p değeri 0.620 iken q değeri 0.380'dir). SA göz ardı edildiğinde Anadolu ırkları genelinde ortalama p allel frekansı 0.639 ve q allel frekansı 0.361 bulundu. Bu durum q alleli ortalamasında bir miktar düşmeye neden olsa da fazla bir değişikliğe yol açmadı. Irklar arasında en yüksek p değerine sırasıyla 0.780 ile BI, 0.738 ile YS ve 0.619 ile YK'nın sahip olduğu görüldü. Ki, SA ve DAK'ın popülasyon ortalamasının üzerinde q değerlerine sahip oldukları bulundu (Sırasıyla 0.525, 0.475, 0.417). Tüm Anadolu ırkları genelinde (SA ortalamadan çıkarıldığında) ise p allel frekansı 0.639 ve q allel frekansı 0.361 olarak bulundu.

Daha önce Anadolu ırkları üzerine yapılmış böyle bir çalışma bulunmamakla birlikte Siyah Alaca (Holştayn) için farklı ülkelerde benzer çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada SA için bulunan q frekansı Zhang ve ark. (1993)'nın, Kuzey Amerika'daki Holştaynlar üzerinde yaptığı benzer bir çalışmada buldukları 0.26 değerinden yüksek bulundu. Ayrıca Lagziel ve ark. (2000), farklı bölgelerde yetiştirilen hörgüçlü ve hörgüçsüz 20 ayrı ırkı, benzer bir çalışma ile, q allel frekanslarına göre karşılaştırmışlardır. Bu tez çalışmasında kullanılan Holştayn (SA) popülasyonunun q allel frekansı (0.475), Lagziel ve arkadaşlarının İtalya (q=0.17), İsrail (q=0.00), Kanada (q=0.14) ve İrlanda (q=0.22)'da yetiştirilen Holştayn sığırlarında hesapladıkları q allel frekanslarından yüksek çıkmıştır. Unanian ve ark. (2002), Hindistan orijinli (*Bos indicus*) bir ırk olan ve süt verim yönlü yetiştirilen Nellore sığırlarında benzer bir çalışma yapmışlar ve q allelinin frekansını 0.85 olarak bulmuşlardır. Yine Vukasinovic ve ark. (1998)'nin Holştaynlarda yaptıkları çalışmada buldukları q allel frekansı (0.095) bu çalışmada bulunan değerden (0.475) düşüktür.

Popülasyonların gözlenen ve beklenen heterozigotlukları, eşitlik (3.4) ve (3.5)'e göre hesaplanarak Çizelge 4.4'de verildi.

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

**Çizelge 4.4.** Irkların gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeyleri.

<b>Irklar</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>e</sub></b>
<b>BI</b>	0.36	0.34
<b>YK</b>	0.57	0.48
<b>YS</b>	0.43	0.39
<b>SA</b>	0.95	0.51
<b>Ki</b>	0.85	0.51
<b>DAK</b>	0.72	0.50
<b>Pop. Ort.</b>	<b>0.63</b>	<b>0.47</b>

. Popülasyon ortalamasına bakıldığında da durumun aynı olduğu görüldü. Bu değerler Altınalan (2005)'in 26 mikrosatelit markır kullanarak beş ırkın (BI, YK, Ki, DAK, SA) genetik analizini yaptığı çalışmada elde ettiği sonuçlardan farklı olarak tüm ırkların ortalama gözlenen heterozigotluk değerlerinin beklenen heterozigotluk değerlerinden daha yüksek olduğunu göstermektedir.

#### **4.2.2. Taranan Lokus Bakımından Popülasyonların Hardy-Weinberg Denge Testi**

Yöntem 3.2.9.2'deki (3.6) eşitliğine göre genotiplerin beklenen değerleri hesaplandı. Daha sonra gözlenen ve beklenen değerler kullanılarak Ki-Kare yöntemi ile H<sub>o</sub> hipotezi test edildi (H<sub>o</sub>: Popülasyon dengededir).

BI için dengenin test edilmesi:

Beklenen genotip frekansları;

$$E(AA) = (0.78)^2 * 25 = 15.21$$

$$E(AB) = 2 * 0.78 * 0.22 * 25 = 8.58$$

$$E(BB) = (0.22)^2 * 25 = 1.21 \text{ 'dir.}$$

Gözlenen genotip frekansları;

$$O(AA) = 15$$

$$O(AB) = 9$$

$$O(BB) = 1 \text{ 'dir.}$$

Eşitlik (3.7)'de değerler yerine konduğu zaman Ki Kare değeri elde edilmektedir. Popgene® programı ile hesaplanan Ki-kare değerleri için bulunan

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

olasılık değerleri  $p < 0.01$  ve  $p < 0.01$  önem düzeylerinde karşılaştırılarak **Çizelge 4.5'**de verildi.

**Çizelge 4.5.** Popülasyonların HWE'ye göre test edilmesi.

	$\chi^2$ için p değerleri	HW Dengesine Göre Popülasyonlar
<b>BI</b>	0.88424	$p < 0.05$ için: Dengede $p < 0.01$ için: Dengede
<b>YK</b>	0.38949	$p < 0.05$ için: Dengede $p < 0.01$ için: Dengede
<b>SA</b>	0.00001	<b><math>p &lt; 0.05</math> için: Dengede değil</b> <b><math>p &lt; 0.01</math> için: Dengede değil</b>
<b>Ki</b>	0.00239	<b><math>p &lt; 0.05</math> için: Dengede değil</b> <b><math>p &lt; 0.01</math> için: Dengede değil</b>
<b>DAK</b>	0.05193	$p < 0.05$ için: Dengede $p < 0.01$ için: Dengede
<b>AS</b>	0.69542	$p < 0.05$ için: Dengede $p < 0.05$ için: Dengede

SA ve Ki popülasyonlarının %1 ve %5 önem düzeylerinde test edildiğinde dengede olmadıkları görüldü. Diğer popülasyonlarda ise durum değişmedi. Mutasyon, seleksiyon, popülasyonların altbölümlere ayrılması (subdivision), popülasyon içi çiftleştirme (endogami), seleksiyon ve popülasyonda bazı genotipler bakımından yığılma olması gibi durumlar popülasyonda dengesizlik yaratabilmektedir (Marson ve ark, 2005). Gözlenen heterozigotluk değerlerinin beklenenden yüksek olması Ki ve SA popülasyonlarında belirgin şekilde heterozigot yığılmasının (heterozygote excess) olduğu göstermektedir (**Çizelge 4.1**). Bu durum bu popülasyonların dengede olmayışını açıklamaktadır. Ayrıca üniversitemiz uygulama çiftliğindeki SA popülasyonu için dengeyi bozan diğer etkenlerin yapay tohumlama çalışmaları ve suni seleksiyon uygulamaları olduğu söylenebilir.



### **4.2.3. Polimorfik Allel ve Irklarla İlişkinin Analizi**

Polimorfik allelin ırka/ırklara özgü olup olmadığının test edilmesi için Ki-kare analizi yapıldı. Tüm ırklar için gözlenen ve beklenen değerler Yöntem bölümündeki eşitlik (3.7)'ye göre hesaplandı. Altı ırk karşılaştırıldığı için serbestlik derecesi (6-1 = 5) olarak alındı. Hipotezler şu şekilde kuruldu:

$H_0$ : Polimorfik allelin görülme sıklığı tesadüfidir.

$H_1$ : Polimorfik allelin görülme sıklığı ırka bağımlıdır.

Elde edilen 13.27 Ki-Kare değeri %5 önem düzeyinde cetvel değeri ile karşılaştırıldığında ( $\chi^2_{0.05, 5} = 11.07$ )  $H_0$  hipotezi reddedildi. Yani q alleli ile ırk/ırklar arasında bir ilişki söz konusudur. Allel frekanslarına bakıldığı zaman Ki, SA ve DAK popülasyonlarının q allel frekansı bakımından popülasyon ortalamasından ve diğer popülasyonlardan farklı olduğu görülmüştü. Bu üç popülasyonun q alleli bakımından diğer ırklardan ayrılıp ayrılmadığını test etmek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Buna göre tüm popülasyonlar birbirleri ile karşılaştırıldı.

### **4.2.4. Polimorfik Allel Bakımından Irkların Karşılaştırılması**

Yöntem 3.2.9.4'deki (3.8) eşitliğinde değerler yerine konduğu zaman elde edilen olasılık değerleri (p) % 5 düzeyinde test edildi ( $p < 0.05$ ).

Tüm ırklar için Kruskal-Wallis testinde elde edilen olasılık değerleri **Çizelge 4.1.**'de verilmiştir.

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

**Çizelge 4.6.** Irkların polimorfizm açısından Kruskal-Wallis Testi ile karşılaştırılması.

<b>Karşılaştırılan Irklar</b>	<b>Kruskal-Wallis p Değeri</b>
<b>Ki-YK</b>	p=0.075
<b>Ki-DAK</b>	p=0.144
<b>Ki-YS</b>	p=0.002**
<b>Ki-SA</b>	p=0.323
<b>Ki-BI</b>	p=0.000**
<b>SA-YK</b>	p=0.158
<b>SA-DAK</b>	p=0.321
<b>SA-YS</b>	p=0.004**
<b>SA-BI</b>	p=0.001**
<b>DAK-YK</b>	p=0.641
<b>DAK-YS</b>	p=0.076
<b>DAK-BI</b>	p=0.021*
<b>YK-YS</b>	p=0.205

\*p<0.05 düzeyinde önemli bulunan değerler.

\*\*p<0.01 düzeyinde önemli bulunan değerler.

Yukarıdaki verilere göre q allel dağılımı bakımından Ki ile YS, Ki ile BI, SA ile YS ve SA ile BI popülasyonları arasındaki fark %5 ve %1 düzeylerinde, DAK ile BI popülasyonları arasındaki fark ise %5 düzeyinde önemli bulundu. En yüksek polimorfik allel frekansına sahip olan Ki, SA ve DAK popülasyonları ve diğer popülasyonların polimorfizm bakımından karşılaştırılmasında ise önemli bir farklılık bulunmadı (p<0.01 ve p<0.05).

Kruskal-Wallis testinin sonuçlarına göre bGH gen lokusundaki polimorfizm yönünden ırklar şu şekilde sıralandı:

**BI AS YK DAK SA Ki**  
a  
b b b  
c c c c

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

Polimorfik allel frekansına göre yukarıdaki yapılan karşılaştırmada “a” en düşük, “b” orta, “bc” orta-yüksek ve “c” ise en yüksek frekansı temsil etmektedir. Buna göre BI “a”, YS “b”, YK ve DAK “bc”, SA ve Ki “c” grubunda yer almaktadır. İstatistik sonuçlarına göre sıralanan bu ırklardan Kilis ve Siyah Alaca sığırları süt verimi yüksek sığırlardır. Kilis sığırının süt verimi bir laktasyonda 1500-3000 kg arasında, Siyah Alacaların ise 4.500-9000 kg civarındadır (Şekerden ve Özkütük, 1990). Bu durumda “c” ile harflendirilen ırkların yüksek süt verimine sahip oldukları görülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda polimorfik allel ile süt verim özellikleri (Lagziel ve ark, 2000, Dybus, 2002), canlı ağırlık kazancı (Rocha ve ark., 1992) ve üreme ile ilgili özellikler (Unanian ve ark., 2002) arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur. Yine Yao ve ark. (1996), SSCP tekniği ile bGH geninin üçüncü intron bölgesinde T’den C’e geçiş polimorfizmine sahip heterozigot GH.1<sup>c</sup>/GH.1<sup>t</sup> genotiplerin yüksek süt verimine sahip olduklarını göstermişlerdir. Lagziel ve ark. (1995), SSCP yöntemini kullanarak Holştayn sığırlarının bGH geninin 3. intron bölgesindeki aynı polimorfizmin süt protein oranı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Unanian ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada *B. indicus* kökenli olan Nellore ırkı sığırlarda polimorfik allelin yüksek frekansta (0.80) bulunmasını bu allelin *Bos indicus*’dan köken aldığına ve buradan *Bos taurus*’a yayılmış olabileceğine bağlamışlardır. Anadolu sığır ırklarından Boz Irk’ın Ukrayna, Macaristan, Romanya, İtalya ve bazı Balkan ülkelerinde çok eskiden beri yetiştirilmekte olan *Bos taurus Primigenious*’dan köken alan bir ırk olduğu bilinmektedir. Bu durum q allelinin BI’da düşük frekansta oluşunu açıklamaktadır. Yine Loftus ve ark. (1999)’nın mikrosatellit markırlar ile ırkların orijinlerini belirledikleri çalışmada Boz Irk’ın Zebu (*B. indicus*) allel oranının %10.4, Yerli Kara’nın %17.2, Güney Anadolu Kırmızısı’nın (YS ve Ki) %15.6 ve Doğu Anadolu Kırmızısı’nın %20.9 olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışması, Loftus ve arkadaşlarının çalışması ile karşılaştırıldığında, q allelinin Anadolu ırklarındaki dağılım oranı ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak çalışmamızda Kilis ve Anadolu Sarısı ırkı iki ayrı ırk olarak değerlendirildiğinden allel frekansları Güney Anadolu Kırmızısı olarak ifade edilen ırkın frekansları ile uyumlu değildir.

#### **4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Cihan (TABAK) BAKLACI**

Lagziel ve ark., (2000)'nin coğrafik bölgelere göre q allelinin (Msp I(-)) dağılımını inceledikleri bir başka çalışmada Kuzey Avrupa ve Batı Afrika kökenli ırkların q alleli bakımından düşük, Doğu Avrupa ve Akdeniz ülkelerinden köken alan ırkların orta, Hindistan yarımadasından köken alanların ise yüksek frekansa sahip oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan popülasyonların q allel frekansı ortalaması 0.380 bulunmuştur. Bu değer araştırmacıların Akdeniz ülkelerindeki ırklarda hesapladıkları q allel frekansları gibi orta düzeydedir. Araştırmacılar bunun sebebini Akdeniz Bölgesi'nin gen geçiş bölgesi olmasına ve buradaki ırklarda *B. taurus* ile *B.indicus* genlerinin değişik oranlarda karışmasının bir sonucu olarak yorumlamışlardır.

**5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

- 1- Beş Anadolu yerli ırkın ve bir kültür ırkının bGH/*Msp* I bakımından genotipleri ve allel frekansları belirlendi. Tüm popülasyonlar genelinde heterozigot AB genotipi (2pq) 0.63 değeri ile en yüksek frekansa sahipken, en düşük frekansa 0.06 değeri ile homozigot BB ( $q^2$ ) genotipinin sahip olduğu görüldü. AA ( $p^2$ ) genotipinin frekansı ise 0.31 bulundu. Anadolu yerli ırklarında az da olsa BB genotipinin varlığına rastlanmasına rağmen SA ırkı sığırlarda rastlanmadı. Heterozigot genotip en çok SA (0.95) ve Ki (0.85) ırkı sığırlarda görüldü. Tüm popülasyonlar genelinde polimorfik allelin (q) ortalaması 0.380 olarak bulundu. Ayrıca q alleli bakımından en yüksek frekanslara sırasıyla Kilis (0.525), Siyah Alaca (0.475) ve Doğu Anadolu Kırmızısı (0.417) ırkı sığırların sahip olduğu görüldü. En düşük q alleli frekansı ise 0.220 ile Boz Irk ve 0.262 ile Anadolu Sarısı ırkında görüldü.
- 2- Her bir popülasyon %1 ve %5 önem düzeylerinde Hardy-Weinberg dengesi bakımından test edildi. Ki ve SA popülasyonlarının dışında diğer popülasyonların dengede olduğu görüldü. Bunun nedeninin bu iki ırkta heterozigot genotiplerin baskın oluşu (SA için %95, Ki için %85) olduğu düşünüldü. Ayrıca SA popülasyonunun süt verim yönlü yetiştirilen ve bu yönde yapay tohumlama ve seleksiyon çalışmalarına tabi tutulan bir popülasyon oluşu da dengenin bozulmasının diğer bir sebebi olarak düşünüldü. Ayrıca Kilis koruma sürüsünde zaman zaman kan tazeleme amacı ile dışarıdan sürüye hayvan katılması da (göç) dengenin bozulmasına etkili bir diğer faktördür.
- 3- Polimorfik allelin görülme sıklığının tesadüfi olmadığı, ırklara göre değiştiği görüldü. Polimorfik q alleli dağılımı açısından ırklar arasında fark olup olmadığı Kruskal-Wallis karşılaştırma testi ile analiz edildi. Karşılaştırma sonucunda Ki ve SA'nın diğer

popülasyonlardan önemli düzeyde farklılaşarak en yüksek frekansa sahip ırklar grubuna dahil olduğu görüldü.

- 4- Bazı araştırmacılar tarafından q allelinin orijini olarak *B. indicus* kökenli sığırlar gösterilmiştir ( Lagziel ve ark., 2000, Unanian ve ark., 2002). Bu tez çalışmasında, her bir popülasyon q alleli frekansına bakıldığında Ki (0.525), SA (0.475) ve DAK (0.417) ırklarının, popülasyon ortalamasından yüksek olmakla birlikte, orta frekansta oldukları görüldü. Bu da çalışılan popülasyonların *B. taurus* X *B. indicus* genlerinin her ikisini de taşıdığını göstermektedir. Boz Irk *B. indicus* genini en az taşıyan ırk olarak görülürken Kilis ırkı ise en çok taşıyan ırk olarak kabul edildi. Araştırmada kullanılan Kilis ırkı Çukurova bölgesinde SA popülasyonunun süt veriminin iyileştirilmesi için çevirme melezlemesi çalışmalarında kullanılmış olup muhtemelen bu nedenle *B. indicus* kanı taşımaktadır.
- 5- Yapılan bazı çalışmalarda üçüncü intron bölgesinde Msp I(-) polimorfizminin görüldüğü hayvanların süt ve canlı ağırlıkla ilgili verim özellikleri arasında pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür (Dybus, 2002, Lagziel ve ark.,2000, Rocha ve ark. 1992, Unanian ve ark. 2002, Yao ve ark., 1996). Çalışmada, q allel frekansı bakımından yüksek grupta yer alan Ki ve SA ırkları yüksek süt verim yönlü ırklar olarak bilinmektedir. Ancak süt verim özellikleri ile q allelinin ilişkisini net bir şekilde ortaya koyabilmek için yüksek q allel frekansına sahip bireyler ile popülasyondaki diğer bireylerin verim kayıtlarının karşılaştırılması gerekmektedir. Bu çalışma Türkiye'deki sığır ırklarında süt verim özellikleri ile polimorfik allel arasındaki ilişkinin araştırılmaya değer olduğunu göstermiştir. Anadolu ırkları için verim özellikleri ile polimorfizm ilişkisinin belirlenmesi durumunda, bGH geni yapılacak ıslah çalışmalarında bir işaret gen olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- ALTINALAN, A., 2005. Türkiye'deki Yerli Sığır Irklarının Mikrosatellit DNA Markırlarla Genetik Karakterizasyonu. *Doktora Tezi.*, Adana.
- BALDI, A., 1999. Manipulation of Milk Production and Quality by Use of Somatotropin in Dairy Ruminants Other Than Cow. *Domestic Animal Endocrinology*, 17 (1999) 131–137.
- BASTOS, E., ALFREDO, C., AZEVEDO, J., PINTO, H.G., 2001. Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP) Detection in Six Genes in Portuguese İndigenous Sheep Breed “Churra da Terra Quente”. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 5(1),7-15.
- CARILLO, C.E., ADAMS, P.A., PRICE, S.G., CLUTTER, A.C. AND KIRKPATRICK, B.W. 1996. Relationship of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1 Genotypes with Growth and Carcas Traits in Swine. *Animal Genetics*, 28:88-93
- CHOI, Y.J., YIM, D.S., CHO, J.S, CHO, B.D., NA, K.J., BAIK, M.G. 1996. Analysis of RFLP in the Bovine Growth Hormone Gene Related to Growth Performance and Carcas Quality of Korean Native Cattle. *Meat Science*, 45:405-410
- DAVIES, J.A., 2002. Molecular Endocrinology. Growth Hormone and Prolactin. [<http://www.biols.susx.ac.uk/ugteach/cws/mend/MEND>] Erişim tarihi; 11.07.2005, 22:10
- DURMAZ, R. 2001. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. *Nobel Tıp Kitabevi*. 242s.
- DYBUS, A., 2002. Associations of Growth Hormone and Prolactin Genes Polymorphisms with Milk Production Traits in Polish Black and White Cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 20:203-212
- EPPARD, P.J., WHITE, T.C., BIRMINGHAM, B.K., HINTZ, R.L., BENTLE, L.A., WOOD D.C., SALSGIVER, W.J., ROWOLD, E., MILLER, M.A., GANGULI, S., HALE, M.D., KRIVI, G.G., COLLIER, R.J. AND LANZA, G.M., 1993. Pharmacokinetic and Galactopoietic Response to Recombinant Variants of Bovine Growth Hormone. *J. Endocrinology*, 139:441-450.

- ETHERTON, T. AND BAUMAN, D.,1998. Biology of Somatotropin in Growth and Lactation of Domestic Animals. *Physiological Reviews*, 78:3.
- FALAKI, M., GENGLER, N., SNEYERS,M., PRANDI,A., MASSART, S., FORMIGONI, A., BURNY, A., PORTELETTE, D., RENAIVILLE, R.1996. Relationships of Polymorphisms for Growth Hormone and Growth Hormone Receptor Genes with Milk Production Traits for Italian Holstein-Friesian Bulls. *J.Dairy Sci*, 79:1446-1453.
- GE, W., DAVIS, M.E., HINES, H.C.,IRVIN,M. AND SIMMEN, C.M., 2002. Association of Single Nucleotide Polymorphism in the Growth Hormone and Growth Hormone Receptor Genes with Blood Serum Insulin-Like Growth Factor I Concentration and Growth Traits in Angus Cattle. *J. Animal Science*,81:641-648.
- GOLLAPUDI, G., 1999. Evaluation Of Growth Hormone As a Candidate Gene In Dairy Cattle Breeding. *Animal Science Graduate Seminar (M.Sc Research Proposal)*. McGill University, Canada.
- GORDON, D.F., QUICK, D.P., ERWIN, C.R., DONELSON, J.E. AND MAURER, R.A. 1983. Nucleotide Sequence of the Bovine Growth Hormone Chromosomal Gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 33: 81-95.
- GROCHOWSKA, R.,LUNDEN,A., ZWIERZCHOWSKI, L., SNOCHOWSKI,M., OPRZADEK,J.,2001a. Association Between Gene Polymorphism of Growth Hormone and Carcass Traits in Dairy Bulls. *Animal Science*,72:441-447.
- GROCHOWSKA, R., SORENSEN, P., ZWEIERZCHOWSKI, L., SNOCHOWSKI, M. AND LOVENDAHL, P. 2001b. Genetic Variation in Stimulated GH Release and in IGF-I of Young Dairy Cattle and Their Associations With the Leucin/Valine Polymorphism in the GH Gene. *J.Animal Science*,79:450-476.
- HEDIGER , R., JHONSON, S.E., BARENDSE, 1990. Assignment of the Growth Hormone Gene Locus to 19q26–qter in Cattle and to 11 q25-qter in Sheep by In Situ Hybridization. *Genomics*,8, 171–174 (1990).



- HODGSON, J., 1989. Bio-Technology Changing The Way Nature Works (Edts.March, M.). Equinox (Oxford) Ltd., Musterlin House, Jordan Hill Road. Oxford, USA. p.127
- HOJ S, FREDHOLM M, LARSEN NJ, NIELSEN VH., 1993. Growth Hormone Gene Polymorphism Associated With Selection For Milk Fat Production in Lines Of Cattle. *Animal Genetics*, 24(2):91-5.
- KANG, J.H., LEE, S.J., PARK, S.R. VE RYU, H.Y., 2001.DNA Polymorphism in the Growth Hormone Gene and Its Association with Weight in Olive Flounder :Parlichthys Olivaceus. *Fisheries Science*,68:494-498.
- KIM, N.K., SEO, Y.W., KIM, G.H., JOH, J.H., KIM, O.H., CHUNG, E.R. AND LEE, C.S. 2003. A Previously Unreported DraI Polymorphism Within the Regulatory Region of the Bovine Growth Hormone Gene and Its Assosation with Growth Traits in Korean Hanwoo Cattle. *Animal Genetics*,10.1111/j.1365-2052.2004.01100.x
- KLUG, S. W. VE CUMMINGS, R. M., *Concepts of Genetics*,(C. Öner editör) *Genetik Kavramlar*,2003. 2. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, s.578.
- KUHNLEIN, U., NI, L.,WEIGEND, S., GAVORA, J.S., FAIRFULL, W, ZADWORNÝ, D., 1996. DNA Polymorphisms in the Chicken Growth Hormone Gene: Response to Selection for Disease Resistance and Association with Egg Production. *Animal Genetics*, 28:116-123.
- LAGZIEL,A., LIPKIN,E., SOLLER,M., 1995.Association Between SSCP Haplotypes at the Bovine Growth Hormone Gene and Milk Protein Percentage. *Genetics*,142:945-951.
- LAGZIEL, A., SOLLER,M., 1999.DNA Sequence of SSCP Haplotypes at the Bovine Growth Hormone Gene. *Animal Genetics*,30:362-365
- LAGZIEL, A., DENISE, S., HANOTTE, O., DHARA, S., GLAZKO, V., BROADHEAD, A., DAVOLLI, R., RUSSO, V., SOLLER, M., 2000. Geographic and Breed Distribution of An MspI PCR-RFLP in the Bovine Growth Hormone (bGH) Gene. *Animal Genetics*,31:210-213.

- LECHNIAK, D., MACHNIK, G.M., SZYDŁOWSKI, M. AND SWITONSKI, M. 1999. Growth Hormone Gene Polymorphism and Reproductive Performance of AI Bulls. *Theriogenology*, 52:1145-1152.
- LIRON, J.P., RIPOLI, M.V., LUCA, J.C., GARCIA, P. 2002. Analysis of Genetic Diversity and Population Structure in Argentine and Bolivian Creole Cattle Using five Loci related to Milk Production. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4):413-419.
- LOFTUS, R.T., ERTUĞRUL, O., HARBA, H.A., EL-BARODIS, A.A., MACHUGH, D.E., PARK, D.E., BRADEY, D.G., 1999. A Microsatellite Survey of Cattle from a Centre of Origin: The Near East. *Molecular Ecology*, 8:2015-2022.
- LOS GATOS LONGEVITY INSTITUTE, 1998. Human Growth Hormone. Copyright©[<http://www.antiaging.org/growthhormone.html>]. Erişim tarihi, 30.11.2005, 19:21.
- LUCY M.C., HAUSE S.D., EPPARD P.L., KRIVI G.G., CLARK J.H., BAUMAN D.E., COLLIERR.J., 1993 . Variants of Somatotropin in Cattle Gene Frequencies in Major Dairy Breeds and Associated Milk Production. *Domestic Animal Endocrinology*, 10 (4), 325-333.
- MALVEIRO, E.,PEREIRA,M., MARQUEZ, P.X .,2001. Polymorphisms at the Five Exons of the Growth Hormone Gene in the Algarvia Goat:Possible Association with Milk Traits. *Small Ruminant Research*, 41:163-170
- MARQUES, P. X., PEREIRA, M., MARQUES, M.R., SANTOS, I.C, BELO,C.C., RENAVILLE,R., CRAVADOR, A. 2003. Association of Milk Traits with SSCP Polymorphism at the Growth Hormone Gene in the Serana Goat. *Small Ruminant Research*, Article in Pres.
- MARSON, P.E., FERRAZ, J.B.S.,MEIRELLES, F.V., ELER, J.P.,FIGUEIREDO, L.G. AND MOURAO, G.B., 2005. Genetic Characterization of European-Zebu Composite Bovine Using RFLP Markers. *Genet. Mol. Res.*, 4 (3): 496-505
- MILLER, S.A., DYKES, D.D. AND POLESKY, H.F.,1988. A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA From Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Research*,16(3):1215.

- ÖZCAN, N.,ALTINALAN, A.2005. Yerli Sarı Sığırlarının Mikrosatellit Markırlar ile Genetik Karakterizasyonu. *Yayınlanmamış Makale*, 2005.
- REIS, C, NAVAS D, PEREIRA, M. AND CRAVADOR, A. 2001. Growth Hormone *ALUI* Polymorphism Analysis in Eight Portuguese Bovine Breeds. *Archivos de Zootecnia*,50:41-48.
- ROCHA, L.J., BAKER, J.F., WOMACK, J.E., SANDERS, J.O. AND TAYLOR, J.F., 1991.Statistical Associations Between Restriction Fragment Length Polymorphisms and Quantitative Traits in Beef Cattle. *J.Animal Science*,70:3360-3370.
- SECCHI, C., BORROMEO, V. 1997. Structure and Function of Bovine Growth Hormone. Bovine Growth Hormone as a Experimental Model for Studies of Protein-Protein Interactions. *Journal of Chromatography B*, 688:161-177.
- STEPHEN, C.Y., ZHANG, X., LEUNG, F. 2000. Genomic Growth Hormone Gene Polymorphisms in Native Chinese Chickens. *Exp. Biol. Med. Vol.* 226(5):458-462.
- ŞEKERDEN,Ö. VE ÖZKÜTÜK,K.,1990. Büyükbaş Hayvan Yetiştirme, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı. No:122, Adana.
- TOMPKINS, L.S.1992 The Use of Molecular Methods in Infectious Disease. *N. Eng. J. Med.*,327(18):1290-7
- UNANIAN, M.M, DENISE, S.K, ZHANG H.M. AND AX R.L. 1994. Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in the Bovine Growth Hormone Gene. *J. Animal Science*, 72:2203.
- UNANIAN,M.M., BARRETO, C.C, FREITAS, A.R., CORDEIRO,C.M.T, 2000. Association Between Growth Hormone Gene Polymorphism and Weigh Traits in Nellerone Bovines. *Rev.Bras.Zootec.*,29(5):1380-1386.
- UNANIAN, M.M, BARRETO, C.C., CORDEIRO, C.M., FREIDAS, A.R.,JOSAHKIAN, L.A. 2002.Possible Association Between Bovine Growth Hormone Gene Polymorphism and Reproductive Traits. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45:293-299.

- VASILATOS,R. AND WANGSNES, P.J.,1981. Diurnal Variations in Plasma Insulin and Growth Hormone Associated With Two Stages Of Lactation in High Producing Dairy Cows. *Endocrinology*, 108:300-304.
- VUKASINOVIC, N., DENISE, S.K. AND FREEMAN, A.E. 1998. Association of Growth Hormone Loci With Milk Yield Traits in Holstein Bulls. *J.Dairy Sci.*, 82:788-794.
- WOOD, D. C., W. J. SALSGIVER, T. R. KASSER, G. W. LANGE, E. ROWOLD, B. N. VIOLAND, A. JOHNSON, R. M. LEIMGRUBER, G. R. PARR, N. R. SIEGEL, N. M. KIMACK, C. E. SMITH, J. F. ZOBEL, S. M. GANGULI, J. R. GARBOW, G. BILD, 1989. Purification and Characterization of Pituitary Bovine Somatotropin. *J. Biol. Chem.*, 264: 14741–14747.
- WOYCHICK, R.P., CAMPER, S.A, LYONS, R.H., HOROWITZ, S., GOODWIN, E.C., ROTTMAN, F.M., 1982. Cloning and Sequencing of Bovine Growth Hormone Gene. *Nuc. Acids Research.*, 10:7197-7210.
- YAO,J.,SAMUEL,E.A.,ZADWORNY, D.,HAYES, J.F. AND KUHNLEIN,U.,1996. Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single Stranded Conformation Polymorphism(SSCP) Analysis and Their Association with Milk Production Traits in Holsteins. *Genetics*,144:1809-1816.
- YEH, F.C.,Yang.R and Boyle, T.,1999. Popgene Version 1.31. University of Alberta. Kanada.
- ZHANG, H.M.;BROWN,D.R; DENISE, S.K. AND AX, R. L. 1993. Rapid Communication,Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Bovine Somatotropin Gene. *J. Animal Sci.*, 71:2276
- ZWIERZCHOWSKI,L.,KRZYEWSKI,J., STRZALKOWSKA, N., SIADKOWSKA, E., RYNIOWICZ, Z. 2002. Effects of Polymorphism of Growth Hormone, Pit-1 and Leptin Genes, Cow's Age, Lactation Stage and Somatic Cell Count on Milk Yield and Composition of Polish Black and White Cows. *Animal Science Papers and Reports*.Vol.20. no:4:213-227.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılı Oğuzeli doğumluyum. İlk öğrenimimi Çağırkanlı köyünde, orta öğrenimimi Yunusoğlu köyünde tamamladım. Balcalı Sağlık Koleji'nde lise eğitimini alarak hemşire sıfatı ile mezun oldum. 1995 yılında Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümünde lisans eğitime başladım. 2001 yılında aynı bölümün Biyometri ve Genetik Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime kabul edildim.

Evliyim.1997 yılından beri Ç.Ü. Tıp Fak. Balcalı Hastanesi'nde hemşire olarak çalışmaktayım.

## **EKLER**

### **EK-1 KULLANILAN KİMYASALLAR**

#### **1.1. Agaroz ve Akrilamid Jel Konsantrasyonları**

<b>Agaroz jel %</b>	<b>DNA Ayırım Aralığı</b>	<b>Akrilamid Jel %</b>	<b>DNA Ayırım Aralığı</b>
2.0	2-0.1		
1.5	3-0.2	20	6-100
1.2	6-0.4	15	25-150
0.9	7-0.5	12	40-200
0.7	10-0.8	8.0	60-400
0.6	20-1.0	5.0	80-500
0.3	60-5.0	3.5	1000-2000

#### **1.2. % 2'lik Agaroz Jel Hazırlanması**

50 ml'lik jel tankı için 1 gr. Agaroz tartılır ve erlen içerisine alınır. Üzerine 50 ml. 1X TBE tamponu eklenir. Ateş üzerine alınarak 3-5 saniye kaynaması sağlanır. El yakmayan sıcaklığa geldiğinde içerisine son konsantrasyon 0.5 µl olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan eklenir. İyice homojenize edildikten sonra jel kalıbına hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde dikkatlice dökülür. Yaklaşık 40 dakika beklenerek jelin polimerize olması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülecek şekilde 1X TBE eklenir ve taraklar yavaşça çıkarılır.

#### **1.3. EtBr Konsantrasyonu**

İstenilen hacim için gerekli EtBr miktarı dikkatli bir şekilde tartılır. Saf su ile vortekslenerek çözülür. Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak + 4 °C'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

#### **1.4.Yükleme Tamponu (6X)**

%40 sukroz (w/v), (suda çözülür)

%0.25 bromfenol mavisi

İstenilen hacim için gereken miktarda sukroz ve boya tartılır, vortekslenir ve + 4 °C'de saklanır. DNA ile 1/5 oranında karıştırılır.

## EK-2 PROTOKOLLER

### 2.1. Salting Out Yöntemi

Bu yöntemde kullanılacak kimyasallar şunlardır.

Tampon Adı	Kiyasal İçeriği
1) Eritrosit Lizis	0.32 M Sukroz, 10mM EDTA(pH:8.0), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , %1 Triton X-100
2) Fizyolojik Tampon	75 mM NaCl, 25 mM EDTA
3) TE-Tamponu(Lizis tamponu)	500 mM Tris-Cl (pH:9.0), 20mM EDTA, 10mM NaCl
4) %10'luk SDS	10 g SDS, 100 ml saf su
5) Proteinaz K	100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH:8.0), %1 SDS 2 mg/ml Proteinaz K
6) Doymuş Tuz Çözeltisi	6 M NaCl
7) %99'luk Etanol	
8) %70'lik Etanol	
9) TE tamponu	10 mM Tris-HCl(pH:8.0), 1 mM EDTA (pH:8.0)

Genomik DNA izolasyonu için 2 ml'lik ependorf tüplerine alınan 500 µl hacimdeki kan örneği üzerine eritrositleri parçalayıcı işlevi olan eritrosit lizis tamponundan ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dakika kadar bekletildi. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üstteki süpernatant pipet ile dikkatli bir şekilde alındı. Çöken lökosit kümesi beyaz renge dönene kadar aynı işlem tekrarlandı. Çöktürülmüş lökosit kümesi aşağıdaki işlemlerden geçirilerek hücresel bileşenlerine ayrıldı:

-Kimyasal kalıntıların temizlenmesi için 1 ml fizyolojik tampon ilavesi ile 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Hücre peleti beyaz değilse yıkama işlemine devam edilir.

-Hücre kümesi üzerine, eritrositleri temizlemek için, 300 µl TE-tamponu (Lizis tampon) ilave edilir. Hücre kümesi hafif parmak darbeleri ile çözülür.

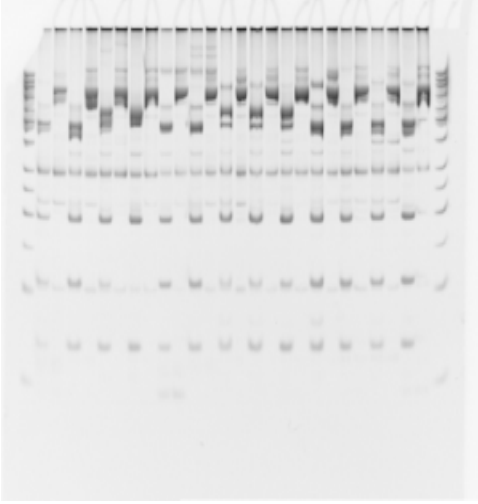
-Çözülen hücre kümesi üzerine hücre zarını eritip proteinleri denatüre etmesi için 100 µl %10'luk SDS (Filtre edilmiş) ve 20 µl proteinaz K ilave edilir. Hafifçe vortekslenir.

- Su banyosunda 65 °C'de en az 45 dakika inkübe edilir.
- Proteinlerin çökmesi için 200 ml doymuş tuz çözeltisi eklenir ve vortekslenir.
- 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant temiz bir tüpe alınır.
- Tekrar aynı hızda 5 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant bir tüpe alınarak üzerine DNA'nın yoğunlaşmasını sağlaması için 1 ml saf etanol(%99'luk) eklenir.
- Beş dakika kadar santrifüj yapılarak DNA'nın tüpün dibinde birikmesi sağlanır.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde boşaltılarak tüpün dibindeki DNA , tuzu uzaklaştırmak için, %70'lik etanol ile yıkanır.
- Tüp temiz bir kurutma kağıdının üzerine ters çevrilerek 10 dakika kadar alkolün uçması beklenir.
- Süre sonunda DNA'nın çözülmesi için tüpe 50-100 µl TE tampon eklenir. DNAz kontaminasyonunu önlemek için, tüp önce 65-70 °C'de 15-20 dakika bekletilir daha sonra DNA'nın yavaşça çözülmesi için +4 °C'ye konur.

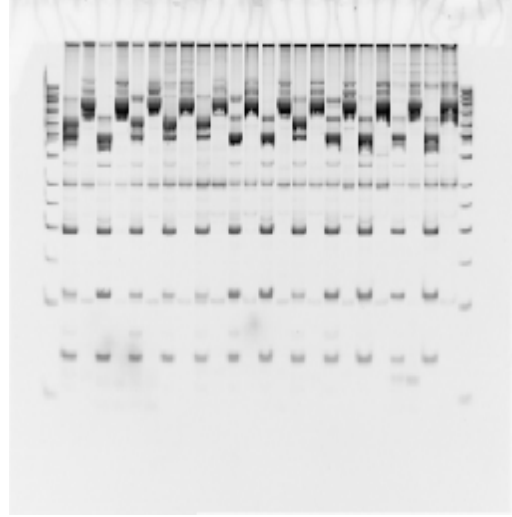


### **EK-3 bGH/Msp I PAGE GÖRÜNTÜLERİ**

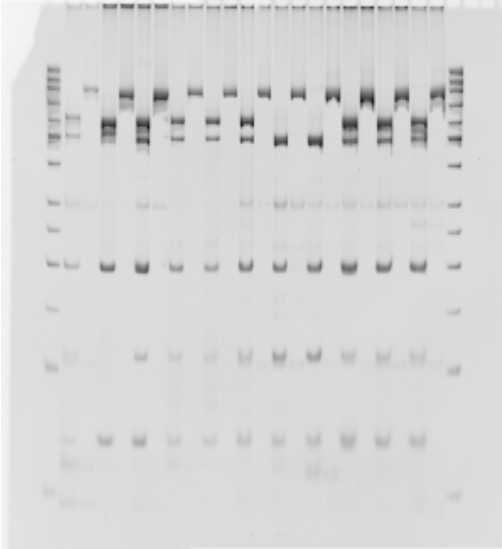
Boz Irk-1



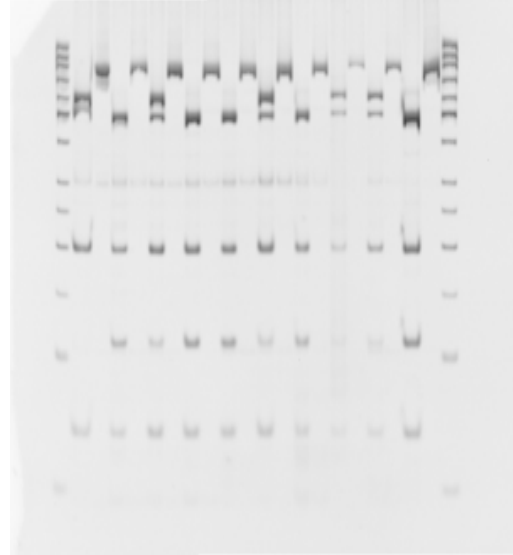
Boz Irk-2



Yerli Kara-1

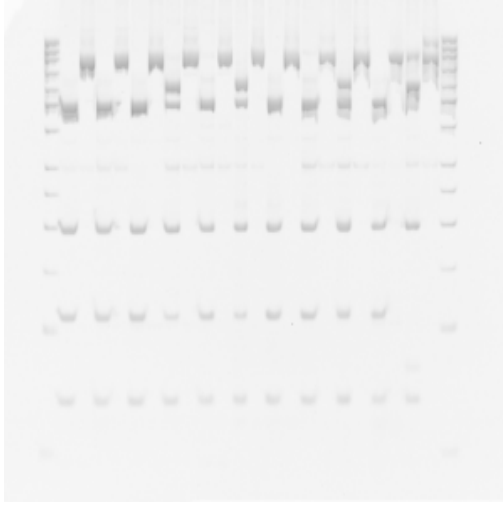


Yerli Kara-2

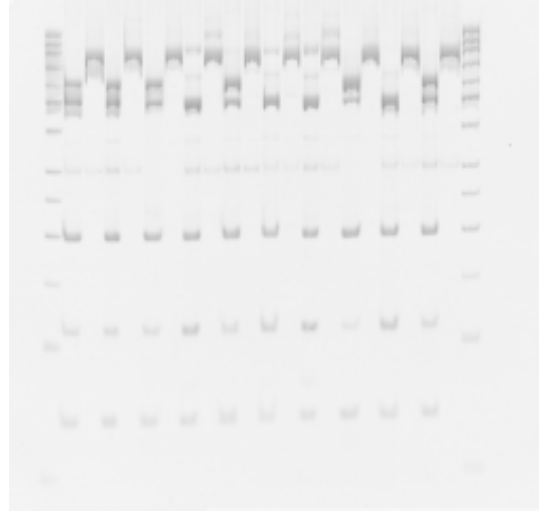


### **EK-3 bGH/MspI PAGE GÖRÜNTÜLERİ**

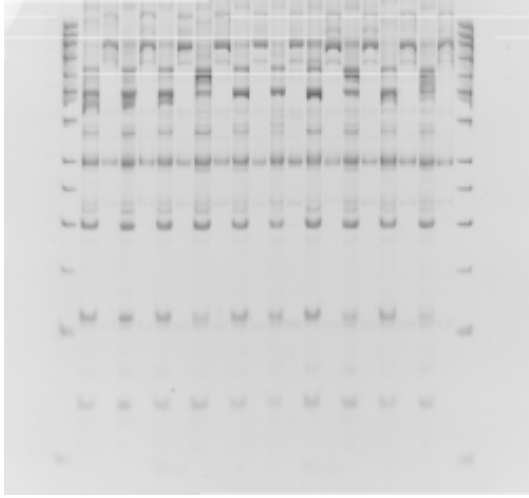
Anadolu Sarısı-1



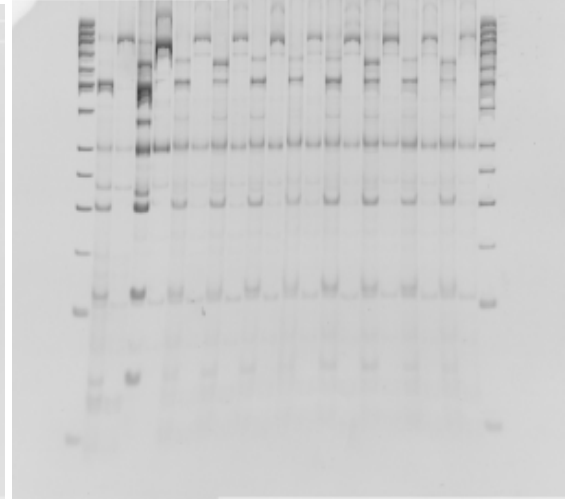
Anadolu Sarısı-2



Siyah Alaca-1

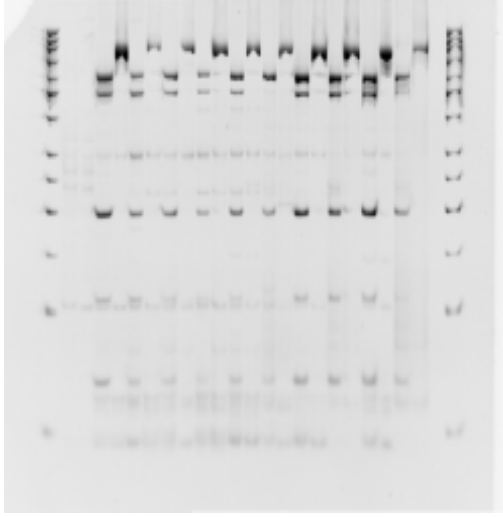


Siyah Alaca-2

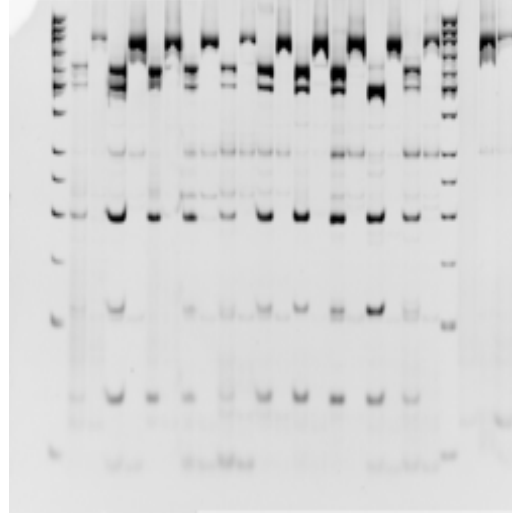


### EK-3 bGH/MspI PAGE GÖRÜNTÜLERİ

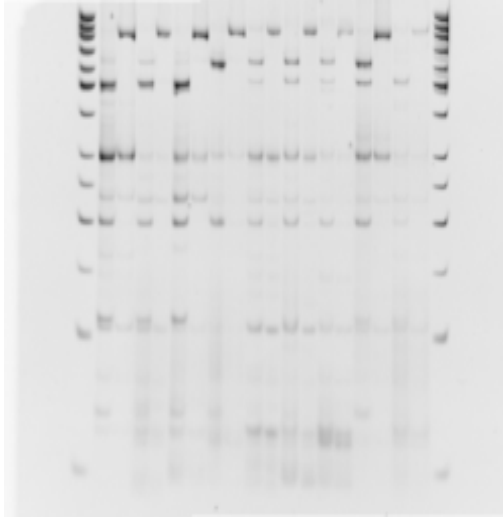
Kilis-1



Kilis-2



Doğu Anadolu Kırmızısı-1



Doğu Anadolu Kırmızısı-2

