

136271

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARAYAKA, SAKIZ VE BAFRA KOYUN IRKLARININ RAPD-PCR
YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

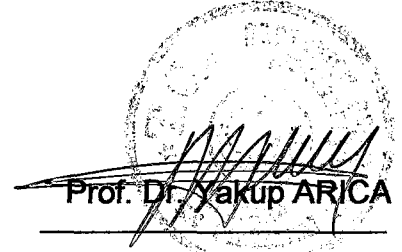
F. AZİZE BUDAK

136271

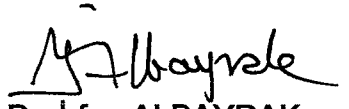
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOL. ANABİLİM DALI

EYLÜL 2003


Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.


Prof. Dr. Yakup ARICA
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.


Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

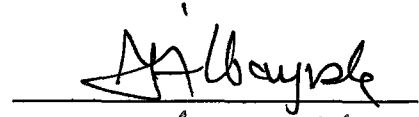



Doç. Dr. Şükran ÇAKIR
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Prof. Dr. Yakup ARICA

Doç. Dr. Şükran ÇAKIR (Danışman)

ÖZET

KARAYAKA, SAKIZ VE BAFRA KOYUN IRKLARININ RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

BUDAK, F. Azize

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç. Dr. Şükran ÇAKIR

Eylül 2003, 84 Sayfa

Anadolu zengin hayvan gen kaynaklarına sahiptir. Örneğin Türkiye’de on beşten fazla evcil koyun ırkı bulunmaktadır. Bu potansiyel ulusal dikkat gerektirmektedir. Çünkü ileride bunların genetik ıslahı ile ekonomik değeri daha yüksek ırklar elde edilebilir. Bu konuda başarılı olmak için yerli ırklarımızın genetik yapıları ile ilgili yeterli bilgiye ihtiyaç vardır ve bu yalnız çiftlik hayvanlarında DNA analizine dayalı genetik araştırmalar ile mümkündür.

Bu çalışmada Türkiye’nin üç yerli koyun ırkından Sakız, Karayaka ve Bafra’nın genetik ayırımında PCR’a dayalı metotlardan Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) belirleyicileri kullanıldı. Bu teknik tür veya ırka özgü DNA profilleri oluşturarak genomdaki birçok ayrı lokusun çoğaltılmasına imkan verir. Birçok araştırmacı ekonomik açıdan önemli olan özellikler ile

bağlantılı belirleyicilerin tanımlanmasında RAPD tekniğini kullanmıştır. Bunlardan bazıları koyun özellikleri ile ilgilidir. Bu çalışmada daha önceki bir çalışmada kullanılan on sekiz ve rasgele olarak seçilen iki tane primer toplam 160 bireyde tarandı. Bu primerlerden 6'sında 67 polimorfik bant elde edildi. Polimorfizm Karayaka ırkında % 22.39 ve Bafra ırkında % 53.73 değerleri arasında bulundu. Nei'nin genetik mesafesi 0.0432-0.4709 arasında bulundu. Populasyon içi farklılaşma $H_s = 0.30$ olarak bulundu. Populasyonlar arasındaki farklılaşmanın büyüklüğü ise 0.58'dir. Bu genetik farklılaşmanın % 58 olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ilerideki yerli koyunların ıslah çalışmalarında kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler : Koyun, RAPD-PCR, çiftlik hayvanları, DNA polimorfizmi

ABSTRACT

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF KARAYAKA, SAKIZ AND BAFRA SHEEP BREEDS BY RAPD-PCR METHOD

BUDAK, F. Azize

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Şükran ÇAKIR

September 2003, 84 pages

The Anatolia has a rich animal gene resources. For example, more than 15 domestic sheep strains have been found in Turkey. This potential needs national attention. Because the strains with high economical value can be improvement from these strains in future. In order to be successful in this tissue there is need enough knowledge of genetic construction of these strains and this is only possible with genetic resources based on DNA analysis in farm animals.

In this study Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) which of the method based on PCR markers were used to determine the genetic diversity in three sheep that Sakiz, Karayaka and Bafra from Turkish sheep strains. This technique gives an opportunity to amplify several discrete loci in the genome by producing species or strain specific DNA profile. Several

researchers have used RAPD assay for identification of markers linked to economically important traits, some of them were related to sheep traits. In this study 18 RAPD primers chosen in a previous study and 2 primer chosen arbitrary were screened for overall 160 individuals. 6 of these primers yielded 67 polymorphic markers. Polymorphism (P) revealed varried between 22.39 % in Karayaka and 53.73 % in Bafra. Nei's genetic distance was found between 0.0432 and 0.4709. The diversity within the populations (H_s) was 0.13. The magnitude of differentiation among the populations (G_{ST}) was 0.58 suggesting that 58 % of the genetic diversity. The results obtained from this study can be potentially utilized in improvement of these sheep strains in future.

Key Words: Sheep, RAPD-PCR, livestock, DNA polymorphism

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma sűresince hibir yardımını esirgemeyen Tez DanıŐmanım Do.
Dr. Sayın Őukran AKIR'a teŐekkűr ederim.

DNA'ların spektro analizinde laboratuvar imkanlarından yararlanmamıza izin
veren Prof. Dr. Sayın Yakup ARICA'ya ve ayrıca çalıŐmalarım sűresince beni
destekleyen aileme çok teŐekkűr ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

ng	nanogram
ml	mililitre
μ	mikrolitre
cm	santimetre
nm	nanometre
mM	milimolar
kb	kilo baz
rpm	dönüş sayısı/dakika



ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon'unun şematize şekli	30
3.1. Bafra ırkına ait bir koyun resmi	42
3.2. Karayaka ırkına ait bir koyun resmi	42
3.3. Sakız ırkına ait koyunların resmi	43
3.4. Bafra ırkına ait dişi ve erkeklerde OPAF05 primeri ile çoğaltılmış RAPD bantları, 11.hat 1kb DNA ölçeği	54
3.5. Sakız ırkına ait dişi ve erkeklerde OPAF05 primeri ile çoğaltılmış RAPD bantları, 11.hat 1kb DNA ölçeği	54
3.6. Karayaka ırkına ait dişi ve erkeklerde OPAF05 primeri ile çoğaltılmış RAPD bantları, 11.hat 1kb DNA ölçeği	55
4.1. Beş koyun ırkı arasındaki genetik mesafeyi gösteren dendogram	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Bazı ülkelerde kişi başına günde tüketilen ortalama protein miktarı.....	7
2.2. Türkiye’de bulunan yerli koyun ırklarından bazılarının karakteristik özellikleri ve yayılış gösterdiği alanlar	10
3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin ırklara, cinsiyetlerine ve alındıkları bölgelere göre dağılımları	41
3.2. Primerlerin baz dizileri ve G-C sayısının toplam baz sayısına oranı	47
3.3. OPA20 primeri için PCR optimizasyon denemelerinin sonuçları	49
4.1. Değerlendirmeye alınan altı primerin tüm ırklarda oluşturdukları RAPD bantlarının büyüklüklerinin yaklaşık değeri (bp)	61
4.2. Bütün koyun ırklarında tüm lokuslar için genetik çeşitliliğin istatistiksel özeti	63
4.3. Tüm popülasyonlarda tanımlanmış istatistik özeti.....	64
4.4. İrklarda gen çeşitliliğinin analizi	65
4.5. Çaprazın üstünde verilen genetik kimlik ve çaprazın altında verilen genetik mesafenin tarafsız ölçümü	66

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1. Çiftlik Hayvanlarının Ekonomik Önemi	5
2.2. Çiftlik Hayvanlarından Evcil Koyunun Sistematiği ve Tarihçesi.....	8
2.2.1. Türkiye'deki Yerli Koyun Irkları	9
2.3. Islah Çalışmalarında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması	20
2.3.1. Islah Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler	20
2.3.1.1. Seleksiyon ve Kontrollü Birleştirmeler.....	21
2.3.1.2. Suni Tohumlama	21
2.3.1.3. Süper Ovulasyon In-vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi	22
2.3.1.4. Rekombinant DNA Tekniği ve Transgenik Hayvanlar	24
2.4. Genetik Farklılıklar ve Analiz Yöntemleri	25
2.4.1. DNA Analizine Dayalı Moleküler Teknikler	25

2.4.1.1. Hibridizasyona Dayalı RFLP (Enzimlerle Kesilen DNA Parçacıklarının Polimorfizmi, Restriction Fragment Length Polymorphism) Tekniği	27
2.4.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Teknikler	28
2.4.1.2.1. AFLP Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi; Amplified Fragment Length Polymorphism	31
2.4.1.2.2. SSRs (Basit Zincir Tekrarları; Simple Sequence Repeat)	31
2.4.1.2.2.1. Minisatellitler (Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar)....	32
2.4.1.2.2.2. Mikrosatellitler (Kısa Ardışık Tekrarlar).....	33
2.4.1.2.3. SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi; Single Nucleotide Polymorphisms	33
2.4.1.2.4. RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA; Randomly Amplified Polymorphic DNA)	34
2.4.1.2.4.1. RAPD Metodunun Avantajları ve Dezavantajları	35
2.4.1.2.4.2. RAPD Belirleyicilerinin Kullanıldığı Uygulama Alanları.	36
2.4.1.2.4.3. RAPD Metodunun Çiftlik Hayvanlarında Uygulanması ile İlgili Litaratür Örnekleri	37
3. MATERYAL VE METOT	40
3.1. Örneklemeler	40
3.2. DNA İzolasyonu	44
3.3. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması	45
3.4. Primerlerin Seçimi	46
3.5. Çalışılan Koyun Irkları İçin RAPD-PCR Yönteminin Optimizasyonu	48
3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu	48
3.5.2. Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayısı	50

3.5.3. Elektroforez Tekniği	51
3.5.3.1. Agoroz Jelin Hazırlanması	51
3.5.3.2. Agoroz Jelin Dökülmesi	52
3.5.3.3. Örneklerin Agoroz Jele Yüklenmesi	52
3.5.3.4. Örneklerin Yürütülmesi	53
3.5.4. RAPD Bantlarının Gözlenmesi ve Verilerin Kaydedilmesi	53
3.6. Verilerin İstatistiksel Analizi	55
3.6.1. Allel Frekansları	56
3.6.2. Genetik Varyasyonun Ölçülmesi	56
3.6.2.1. Lokusların Yüzdesi	56
3.6.2.2. Heterozigotluk	57
3.6.2.3. Allelerin Sayısı	57
3.6.2.4. Bir Lokusta Allelerin Etkili Sayısı	58
3.6.2.5. Shannon'un Bilgi Endeksi	58
3.6.3. Alt Populasyonlarda Gen Farklılıklarının Analizi	58
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	61
4.1. Değerlendirilen RAPD Primerleri	61
4.2. Populasyonun Genetik Yapısı	61
4.2.1. Polimorfik Lokusların Yüzdesi	62
4.2.2. Heterozigotluk	62
4.2.3. Shannon'un Bilgi Endeksi	64
4.2.4. İrk içi ve İrklar Arasında Genetik Farklılıklar	64
4.2.5. Genetik Kimlik ve Genetik Mesafe	65
5. KAYNAKLAR	69

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak besin maddelerine olan gereksinim de artmaktadır. Bu nedenle doğal besin kaynakları ve bunların potansiyellerinin sürdürülebilir kullanımı önem kazanmaktadır. Son zamanlarda ıslah çalışmalarında bu nitelikteki moleküler tekniklerden yararlanılmaktadır. Islah çalışmalarında, ekonomik açıdan önemi olan karakterler dikkate alınarak seleksiyon gerçekleştirilmektedir. Bu sırada ekonomik önemi olmayan karakterler elendiği için gen havuzu homojenize olur ve genetik varyasyon azalır. Bu durum ıslah süresince bir miktar gen kaynağının kaybolmasına yol açmaktadır. Bu nedenle ıslah çalışmaları yapılırken bir yandan da yerli ırkların mevcut hali ile korunması da ilgili kurumlarca sağlanmalıdır.

Islah çalışmalarında kısa sürede ve az maliyet ile ekonomik değeri yüksek ırklar elde etmek esastır. Bu nedenle son zamanlarda ıslah amaçlı seleksiyon çalışmalarında genetik verilerden de faydalanılarak zaman kazanılmaktadır. Bu yol ile mevcut gen kaynaklarından yararlanabilmek için gen kaynaklarının özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Daha sonra bu bilgiler kullanılarak ekonomik değeri yüksek ırklar geliştirilebilir. Hayvanlarda doğrudan üretim özelliklerini etkileyen ve ölçülebilir özellik lokusları (Quantitative Trait Loci, QTL) ve ekonomi açısından önemli olan lokusların (Economically Trait Loci, ETL) belirlenmesi oldukça zordur. Moleküler genetik analizlerde elde edilen DNA bantlarının, belirli bir verim özelliğine karşılık gelip gelmediğini tespit etmek yoğun ve sabırlı bir çaba gerektirmektedir.

Bu tip çalışmalarda öncelikle ırkların genetik yapıları belirlenmeli ve elde edilen veriler bir araya getirilerek genom haritaları çıkarılmalıdır. Genom haritalaması ile genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerler gösterilmektedir. Bunun için moleküler teknikler ve bir dizi istatistiksel analizler kullanılmaktadır. Genom haritalamalarında kullanılacak belirleyiciler doğru seçilmeli ve mevcut gen haritaları etkin olarak kullanılmalıdır.

Gen kaynaklarının moleküler düzeyde tanımlanabilmesi için 15 yıl önce İnsan Genom Projesi başlatılmıştır. İlerleyen bu süreç içinde insan dışında başka organizmalar da bu projeye dahil edilmiştir. İnsan dışında çalışılan genomlar arasında başta model hayvanlar gelmektedir. Çünkü ökaryotlarda genom benzerliği ve gen homolojisi mevcuttur. Ayrıca ekonomik değeri olan sığır, koyun, keçi ve tavuk gibi hayvanlar da genom proje çalışmalarında yerlerini almışlardır. Özellikle bu hayvan genomlarının tanımlanması; sağlıklı, verimli ve hastalıklara karşı dayanıklı hayvanların geliştirilmesinde potansiyel bilgi olması açısından önemlidir. Dünyada tükenmekte olan özgün çiftlik hayvanlarının gen kaynaklarının farkına varılması üzerine FAO, ilk etapta Asya ve Pasifikte bulunan 900 adet hayvan ırkının (sığır, koyun, keçi, kanatlı v.b) genetik varyasyonunun korunması için Nisan 1992'de düzenlediği Dünya Hayvan Gen Kaynakları İdaresi (Global Management of Animal Genetic Resources) organizasyonu bünyesinde kurulan bir komisyonun önerileri ışığında kapsamlı bir projeye başlamıştır. Bu proje ile ilgili veriler, merkezi Roma'da bulunan Dünya Hayvan Gen Bankasında toplanmaktadır. Bu projede, her ülkenin ekonomik gücü ölçüsünde mevcut gen kaynaklarını araştırarak bu çalışmaya katılması yönünde karar alınmıştır. Son yıllarda

Türkiye de bu tür araştırmalara ağırlık vererek bu projede yerini alma çabasındadır.

Dünyada çiftlik hayvanlarının gen kaynaklarının korunması yönünde atılan ilk adım olan FAO'nun bu çalışması; ırkların tanımlanması, verilerin değerlendirilmesi ve bölgede bulunan zengin gen kaynaklarının ve varyasyonların korunmasını amaçlamaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'nin üç farklı koyun ırkının beş populasyonun moleküler genetik analizinde PCR'a dayalı metotlardan Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemi kullanılmıştır. Bu metot genellikle 8-10 baz uzunluğunda, rasgele diziye sahip tek bir primerin kullanılmasıyla DNA nükleotid dizisindeki polimorfizmin belirlenmesi esasına dayanır. Tekrarlanılabilir DNA profilleri elde edebilmek için reaksiyon koşullarının optimizasyonunu gerektirmesi ve RAPD belirleyicilerinin kullanımı sadece dominant karakterlerin belirlenmesi ile sınırlı olması bu metodun dezavantajlarındandır. Çünkü heterozigot ve homozigot lokuslar ayırt edilemezler. İlgilenilen tür için genom sekans ön bilgisine ihtiyaç duyulmaması ise RAPD'in en büyük avantajlarından birisidir.

Bu çalışmanın amaçları aşağıda sıralanmıştır:

1. Türkiye'nin yerli koyun ırklarından Karayaka ve Sakız'ın genetik özelliklerini RAPD-PCR yöntemi ile araştırmak,
2. Karayaka ve Sakız ırklarının melezlenmesi sonucu oluşan ve ebeveynlerine göre daha yüksek verim özelliklerine sahip Bafra ırkına ait örneklerin genetik özelliklerini yine RAPD-PCR yöntemi ile incelemek ve elde edilen verileri Karayaka ve Sakız'a ait veriler ile karşılaştırmak,
3. Çiftlik hayvanlarımızdan yerli koyun ırkları ile ilgili moleküler genetik bilgi birikimine katkıda bulunmak ve ıslah çalışmalarında moleküler genetik verilerden faydalanmak için zemin oluşturmak,
4. Eğer mümkün olursa bu çalışma ve daha sonraki çalışmalarla elde edilecek DNA bantları ile verim özellikleri arasındaki ilişkiler ile ilgili potansiyel bilgi birikimi oluşturmak.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Çiftlik Hayvanlarının Ekonomik Önemi

İnsanların yeterli ve dengeli beslenmesinde hayvansal kaynaklı gıda maddelerinin önemi herkes tarafından bilinmektedir. Çünkü büyüme, gelişme ve hayatın devamlılığı bakımından önemli olan hayvansal gıdaların protein değerleri oldukça yüksektir. Proteinler 20 çeşit amino asitten meydana gelir. Bunlardan 12' sini vücut kendisi sentezleyebilirken, 8'ini dışarıdan almak zorundadır. Et, süt, yumurta, balık ve tavuk gibi gıdalarda bulunan bu sekiz elzem amino asiti içeren proteinlere birinci sınıf protein denmektedir. Bu durum çiftlik hayvanları üzerindeki verim artırıcı araştırmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Ülke ekonomisi açısından büyük önem taşıyan koyun, bulunduğu koşullara adapte olduğu zaman yüksek verim gösteren çiftlik hayvanlarından birisidir.

Devlet İstatistik Enstitüsü'nden alınan hayvancılık ve nüfus artışı ile ilgili verilere göre 2000 yılında ülkemizde, 10.761.000 baş sığır, 28.492.000 baş koyun ve 7.201.000 baş keçi bulunmaktadır. Son 10 yıl içerisinde %20 dolayında nüfus artışı gözlenmiştir. 1990 yılında yaklaşık 56 milyon olan nüfusumuz, 2000 yılında 68 milyona ulaşmıştır. Son on yıl içerisinde nüfusun %20 dolayında artmasına karşılık, yetiştirilen çiftlik hayvanı sayısında genel olarak düşüş gözlenmiştir. Bu yıllara ait tavuk sayısı ise artış göstermiştir. Fakat tavuk yetiştiriciliği neredeyse tamamen dışa bağımlı hale gelmiştir.

Mevcut hayvan varlığı ile dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almamıza rağmen hayvan başına verim bakımından hala gerilerde yer almaktayız. Türkiye’de kişi başına tüketilen et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürün miktarları da yeterli düzeyde değildir ve bu durumu düzeltmek için henüz yeterli adımlar atılamamıştır.

Türkiye’de ortalama kişi başına yıllık olarak tüketilen hayvansal protein miktarı, gelişmiş ülkelerin yaklaşık üçte biri düzeyindedir (Çizelge 1)⁽⁸⁰⁾. Türkiye’de gelir dağılımının dengeli olmaması nedeniyle halkın büyük bir kısmı bu ortalamanın da aşağısında protein tüketmektedir.



Çizelge 2.1. Bazı ülkelerde kişi başına günde tüketilen ortalama protein miktarı

Ülke	Protein Miktarı (g)			Hayvansal Protein Oranı (%)
	Hayvansal	Bitkisel	Toplam	
Fransa	76.4	36.2	112.6	67.9
İrlanda	67.0	41.6	108.5	61.8
Almanya	66.7	36.8	103.5	64.4
Belçika	66.0	39.2	105.2	62.7
Danimarka	65.4	35.1	100.5	65.1
Hollanda	63.9	33.8	97.6	65.5
İtalya	60.1	50.3	110.4	54.7
Yunanistan	59.3	53.8	113.1	52.4
İspanya	57.1	43.9	100.9	56.6
İngiltere	54.1	35.3	89.4	60.5
Portekiz	46.6	50.8	97.5	47.8
Türkiye	17.9	66.2	84.1	21.3
Gelişmiş Ülkeler	59.2	43.5	102.7	57.6
Gelişmekte Olan Ülkeler	12.8	46.6	59.4	21.5
Dünya Ortalaması	24.2	45.8	70.0	34.6

Yerli çiftlik hayvanlarının ıslah çalışmaları ile ülke koşullarına uyumlu ve verimli ırkların yetiştirilmesi ekonomiye büyük katkılar sağlayacaktır. Böylece insanlarımızın sağlıklı beslenmesi açısından önemli olan hayvansal besinlerin kalitesinin ve miktarının artmasına da olanak sağlanacaktır.

2.2. Çiftlik Hayvanlarından Evcil Koyunun Sistematiği ve Tarihçesi

Çiftlik hayvanlarının ilk evcilleştirilme çabaları ile ilgili çeşitli görüşler bulunmaktadır. Bir araştırmacıya göre koyun ve keçiler ilk evcilleştirilen hayvanlar arasındadır⁽⁶⁸⁾. Mevcut kanıtlara göre koyun, keçi, sığır ve domuzların evcilleştirildiği ilk bölge Yakın Doğu'da özellikle Akdeniz'in kuzeydoğusudur. Yakın doğu ve güneybatı Asya'da Neolitik ağa ait (M.Ö. 5000 – 7000) iftlik hayvanlarının kemikleri bulunmuştur. Başka bir görüşe ise koyun ve keçi, 9000 yıl önce Orta Asya'da evcilleştirilmiştir⁽⁹⁴⁾. Bu döneme ait koyun kemiklerinin bulunması bu düşünceyi desteklemektedir⁽¹⁾. Başka bir araştırıcıya göre ise koyun ilk kez 9.000 – 11.000 yıl önce Batı Asya'da (Anadolu) evcilleştirilmeye başlanmıştır. Batı Asya'da evcilleştirilen koyunlar buradan Avrupa ve Afrika'ya yayılmışlardır⁽⁶⁹⁾.

Yaban koyunlarının bilinen beş türü bulunmaktadır. Bunlardan *Ovis nivicola*; Kuzeydoğu Rusya'da; *Ovis ammon* Argali, Asya'da; *Ovis dalli* Kuzey Amerika'da; *Ovis canadensis* bighorne koyunu; *Ovis orientalis*, Ural ve Mouflon yaban koyunu Asya'da yayılış göstermektedir⁽⁷⁵⁾. Yaban koyunu yazın dağlarda, kışın ovalarda yaşamını sürdürmektedir. Bu mevsimsel gler sırasında koyunların, korunma ihtiyaı ile insanlara yaklaşmasının evcilleştirilmelerinde etkili olduğu ve modern koyun ırklarının *Ovis orientalis vignei*'den köken aldığı düşünülmektedir⁽⁶⁵⁾.

Evcil koyunun sistematiki aşağıda verilmiştir.

Phylum : Animalia

Classis : Mammalia

Ordo : Artiodactyla

Familia : Bovidae

Subfamilia: Caprinae

Genus : *Ovis*

Species : *O. aries*

2.2.1. Türkiye'deki Yerli Koyun Irkları

Türkiye yaban ve evcil gen kaynakları bakımından zengin bir ülkedir. Farklı coğrafik bölgelere uyum göstermiş ayırıcı karakteristik özellikleri olan on beş kadar koyun ırkı bulunmaktadır. Koyun ırkları genellikle kuyruk tipi, yapağı tipi ve morfolojik özellikler gibi fenotipik karakterler göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Bu koyun ırklarından bazılarının genel özellikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir^(1, 3, 77) (izelge 2.2).

Çizelge 2.2. Türkiye’de bulunan yerli koyun ırklarından bazılarının karakteristik özellikleri ve yayılış gösterdiği alanlar

Koyun Irkının Adı	İrkin Karakteristik Özellikleri	Yayılış Gösterdiği Alanlar
Morkaraman	<p>Vücut Rengi: Kahverengi veya kızıl kahverengidir.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkek ve dişilerde boynuzlu ve boynuzsuz olanlara rastlanmaktadır.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk yağlıdır ve S kıvrımı yapmaktadır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 50-60 kg, kirli yapağı verimi 2-2.5 kg/yıl, yapağı kalitesi 36- 42 S (D-E), süt verimi 80-90 kg/yıl, laktasyon süresi 150-160 gün, ikiz doğum oranı % 20-30, yapağı randımanı % 65-72’dir.</p>	<p>Doğu Anadolu’da yetiştirilir, kış aylarında Güneydoğu Anadolu’da görmek mümkündür. Türkiye’de sayı olarak ikinci sırada yer alır. Kızıl ya da Gızıl adı ile İran’ın Doğu Anadolu’ya yakın bölgelerinde de yetiştirilmektedir.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıliş Gösterdiği Alanlar
Karagül	<p>Vücut Rengi: Genelde siyahtır ancak kahverengi, kurşuni ve beyaz olanları da vardır.</p> <p>Boynuz Durumu: Genelde erkekler boynuzlu, dişiler boynuzsuzdur.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk yağlıdır ve dar, uzun olan kuyruk omur uçlarında S kıvrımı yapmaktadır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 40-45 kg, kirlı yapağı verimi 2-2.5 kg/yıl, yapağı kalitesi 36- 42 S (D-E), süt verimi 60-80 kg/yıl, laktasyon süresi 130-140 gün, ikiz doğum oranı % 10-15, yapağı randımanı % 60-65'dir.</p>	<p>Türkiye'de Karagül yetiştiriciliğı 1929 yılında başlamıştır. Dışarıdan getirilen Karagül koçlarla yerli ırklarımız (Akkaraman, Morkaraman, Tuj) arasında melezleme yapılmıştır.</p> <p>Eskişehir Çifteler Harası'nda bir sürü oluşturulmuştur. Bu ırkın anavatanı Orta Asya'dır.</p> <p>Dünyada yayılma alanı Afganistan, Rusya, Pakistan, Türkistan, Özbekistan ve İran'dır. Şu anda Türkiye'de 25 bin civarında bulunmaktadır.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıllık Gösterdiği Alanlar
Sakız	<p>Vücut Rengi: Beyaz olup ağız ve yüz, göz etrafı, ayaklar eklemlerden kasıklara kadar siyah renktedir.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkeklerde kuvvetli spiral boynuzlar bulunurken dişiler boynuzsuzdur.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk ince, uzun ve kök kısmı az yağlı, uç kısmı yağsızdır. Besili olanlarda dip kısımda yağ kütlesi artmaktadır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 40-45 kg, kirliliği yapağı verimi 1.5-2.0 kg/yıl, yapağı kalitesi 40-42 S (D), süt verimi 120-180 kg/yıl, bir doğuma kuzu sayısı 1.7-2.3 olup genelde ikiz doğum görülür, yapağı randımanı % 60-70'dir.</p>	<p>Türkiye'de en çok İzmir ilinde özellikle Çeşme ilçesinde yetiştirilir. Bu ırk adını Ege Denizi'ndeki Sakız adasından almıştır. Antalya'dan İstanbul'a kadar olan kıyı şeridinde yer yer yetiştirilmektedir.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayılış Gösterdiği Alanlar
Karayaka	<p>Vücut Rengi: Genelde beyaz renkli olup siyah ve kahverengi olanlara da rastlanır.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkeklerde kalın spiral boynuzlar bulunurken dişiler boynuzsuzdur.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk uzun ve incedir, nadiren uç kısmında yağ kütlesi bulunur.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 35-40 kg, kirlili yapağı verimi 2.0-2.5 kg/yıl, yapağı kalitesi 32-36 S (E-F), süt verimi 30-45 kg/yıl, laktasyon süresi 100-140 gün, ikiz doğum oranı%4-6, yapağı randımanı % 64-68'dir.</p> <p>Sakız ile melezlenmesi sonucu Bafra adı verilen çoklu doğum oranı yüksek olan verimli ırk elde edilmiştir.</p>	Karadeniz kıyı şeridinde özellikle Sinop, Samsun, Ordu, Giresun ve Tokat illerinde yetiştirilmektedir.

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıliş Gösterdiği Alanlar
Kıvırcık	<p>Vücut Rengi: Beyaz olup nadiren baş ve ayaklarda siyah lekeler görülmektedir.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkeklerde beyaz renkli spiral boynuzlar bulunurken dişilerde boynuz görülmez.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk yağlıdır ve S kıvrımı yapmaktadır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 40-42 kg, kirlı yapağı verimi 1.5 kg/yıl, yapağı kalitesi 44-56 S (B-C), süt verimi 60-90 kg/yıl, laktasyon süresi 140-160 gün, ikiz doğum oranı % 10-20, yapağı randımanı % 60-65'dir.</p>	<p>Türkiye'de Bursa, Balıkesir, Çanakkale, Sakarya, Kocaeli;İstanbul, Manisa, İzmir ve Aydın'da yetiştirilir.</p> <p>Aynı zamanda Bulgaristan ve Yunanistan'da da yetiştirilmektedir.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıliş Gösterdiği Alanlar
İmroz (Gökçeada)	<p>Vücut Rengi: Beyaz olup ağız ve gözlerin etrafı siyahtır. Kulaklarda ve ayak uçlarında siyah lekeler görülebilir.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkeklerde kuvvetli spiral boynuzlar bulunurken dişilerde boynuz görülmez.</p> <p>Kuyruk Yapısı: İnce ve uzun olan kuyruk Tarsus eklemine altına kadar uzanmaktadır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 35-40 kg, kirlı yapağı verimi 1.5-2.0 kg/yıl, yapağı kalitesi 36-40 S (D-E), süt verimi 60-90 kg/yıl, laktasyon süresi 150-170 gün, ikiz doğum oranı % 15-25, yapağı randımanı % 65-70'dir.</p>	<p>Çanakkale'nin batısındaki Gökçeada'da ve Çanakkale'de yetiştirilir. Adını İmroz (Gökçeada) adasından almıştır.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıllık Gösterdiği Alanlar
Akkaraman	<p>Vücut Rengi: Beyaz renkli olup baş ve ayaklarda siyah lekeler görülebilir.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkek ve dişilerde boynuzlu ve boynuzsuz olanlara rastlanmaktadır.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk yağlıdır ve kuyruk omurları uç kısımda S kıvrımı yapmaktadır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 45-50 kg, kirlili yapağı verimi 1.5-2 kg/yıl, yapağı kalitesi 36-42 S (D-E), süt verimi 50-60 kg/yıl, laktasyon süresi 140-150 gün, ikiz doğum oranı % 20-30, yapağı randımanı % 62-70'dir.</p>	<p>Orta Anadolu, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Karadeniz ve Akdeniz Bölgeleri'nin Orta Anadolu'ya yakın kısımlarında yetiştirilmektedir. Türkiye'de sayı olarak birinci sırada yer almaktadır.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıllık Gösterdiği Alanlar
<p>Dağlıç</p>	<p>Vücut Rengi: Beyaz olan vücutta ağız, burun, göz etrafında ve ayaklarda siyah lekeler görülebilmektedir.</p> <p>Boynuz Durumu: Erkekler helezoni boynuzlu, dişiler boynuzsuzdur.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk yağlı olup kalp şeklindedir ve orta kısmında oluk görülmektedir.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 35-40 kg, kirlı yapağı verimi 2-2.5 kg/yıl, yapağı kalitesi 40-50 S (C-D), süt verimi 40-50 kg/yıl, laktasyon süresi 130-150gün, ikiz doğum oranı % 1-2, yapağı randımanı % 68-70'dir.</p>	<p>Sakarya Nehri'nden başlayıp Ege Bölgesi'nin kıyı illerine kadar uzanan bölgede yetiştirilmektedir.</p> <p>Akkaraman ırkı ile melezlenerek Çandır ve Kesber, Kıvırcık ile melezlenmesiyle Kamakuyruk ve Pırlak adı verilen koyun tipleri ortaya çıkmıştır. Ayrıca Ramboillet ile melezlemesi ile Ramlıç adı verilen verimi yüksek koyun tipi elde edilmiştir.</p>

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıliş Gösterdiği Alanlar
Hemşin	<p>Vücut Rengi: Çoğunlukla kahverengidir. Siyah ve açık renk olanlarına da rastlanmaktadır.</p> <p>Boynuz Durumu: Koçlar genellikle boynuzlu, koyunlar boynuzsuzdur.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk uzun ve uca doğru incelmektedir. Kuyruk dibi yağlı olup, aşağıya doğru uzanan yağsız bir uç kısmı vardır.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba karışık yapağı tipi görülmektedir.</p> <p>Bazı Verim Özellikleri: Süt verimleri azdır.</p>	Karadeniz kıyıları ile Kuzey Doğu Bölgelerimizde ve özellikle Artvin havalesinde bulunmaktadır.

Koyun Irkının Adı	Irkın Karakteristik Özellikleri	Yayıliş Gösterdiği Alanlar
<p>İvesi</p>	<p>Vücut Rengi: Beyaz renklidir. Baş, boyun ve ayaklar kahverengi veya siyahtır. Bazılarında başın ön kısmında yukarıdan aşağıya doğru uzanan beyazlık görülür.</p> <p>Boynuz Durumu: Genelde erkeklerde kuvvetli spiral boynuzlar bulunur, dişiler ise boynuzsuzdur.</p> <p>Kuyruk Yapısı: Kuyruk yağlı ve yuvarlak olup kuyruk omurları uç kısmında yukarı kıvrılarak kuyruğun alt kenarının ortasında bir oyuk meydana getirir.</p> <p>Yapağı tipi: Kaba- karışık yapağı</p> <p>Bazı verim özellikleri: Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 45-50 kg, kirli yapağı verimi 2-2.5 kg/yıl, yapağı kalitesi 36-42 S (D-E), süt verimi 120-160 kg/yıl, laktasyon süresi 170-200 gün, ikiz doğum oranı % 10-20, yapağı randımanı % 60-65'dir.</p>	<p>Bu ırk Güneydoğu Anadolu'da özellikle Mardin, Şanlıurfa, Gaziantep, Hatay illerinde yetiştirilmektedir. Arap adı verilen bu ırkın anavatanı Mezopotamya'dır. Akdeniz ülkelerinde, İsrail'de ve Kuzey Afrika ülkelerinde de yetiştirilmektedir.</p>

2.3. Islah alışmalarında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Hayvanların ilk evcilleştirilmesiyle birlikte islah çalışmaları da başlamıştır. Günüümüze kadar islah çalışmaları için değişik teknikler geliştirilmiştir. Günüümüzde iftlik hayvanlarında yüksek verim özelliğine sahip ırkların islahı için; klasik islah yöntemlerinin yanı sıra yeni gelişmekte olan genetik analiz yöntemlerinden de faydalanılmaya başlanmıştır. Genetik analizlere dayalı bu islah çalışmalarının yapılabilmesi için genom bilgilerine ihtiyaç vardır. Ülkemizde azalmakta olan yerli ırkların iyileştirilebilmesi için hızla gelişmekte olan teknolojinin yakından takip edilmesi ve moleküler analize dayalı islah çalışmaları ile zaman kazanılması gerekmektedir.

2.3.1. Islah alışmalarında Kullanılan Yöntemler

- Kontrollü birleştirmeler ve Seleksiyon
- Suni tohumlama
- Süper ovülasyon, in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi
- Rekombinant DNA tekniği ve transgenik hayvanlar

2.3.1.1. Seleksiyon ve Kontrollü Birleştirmeler

Seleksiyon, istenilen verim özelliklerine göre bir sonraki dölü meydana getirecek ebeveynin seçilmesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışma için kontrollü birleştirmelerin yapılması gerekmektedir. Klasik seleksiyonda bu işlem fenotipe bakılarak yapılmaktadır. Bu sırada dölleri boyunca verim düzeylerinin karşılaştırılması ve çok sayıda bireyin seleksiyona tabi tutulması gerekir. Bu durum ise zaman, ekonomi ve iş gücü açısından büyük külfet getirmektedir.

2.3.1.2. Suni Tohumlama

Suni tohumlama; uygun tohumlama zamanında olduğu belirlenen dişi hayvanların genital kanallarına, damızlık olarak seçilen hayvan spermalarının (tohum) hijyenik koşullarda nakledilmesi işlemine dayanmaktadır. Bu uygulama ile oluşan yavru sayısı artmasa da kontrollü çaprazda izin vermesi ve istenilen genetik özelliklerin artırılması bakımından önemlidir.

Yetiştiricilikte ve ıslahta kullanılan bu yöntem II. Dünya savaşından sonra Türkiye dahil birçok ülkede değişik düzeylerde yaygınlaşmıştır. Özellikle sağimlık ineklerde çok pratik bir yöntem haline gelmiştir^(10, 11).

Suni tohumlamanın ülkemizdeki evcil hayvanlarda uygulanması oldukça eski olup 1926 yılına kadar giden bir geçmişi vardır. Cumhuriyet'in ilk yıllarında Atatürk'ün tarıma büyük yatırımlar yapmasıyla tarım ve hayvancılık hızlı bir gelişim sürecine girmiştir. O yıllarda suni tohumlama, haralarımızda kısırak, inek ve keçilere uygulanmıştır. Fakat asıl halk elindeki hayvanlara uygulanmasına koyunlarda 1930, kısıraklarda 1939 ve ineklerde 1949'da başlanmıştır⁽⁸⁰⁾.

2.3.1.3. Süper Ovulasyon, İn-vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi

Süper ovulasyon, belirli hormonların yardımıyla dışıden çok sayıda olgunlaştırılmış yumurtaların elde edilmesi tekniğidir. İn vitro fertilizasyon, olgunlaştırılmış bu yumurtaların, seçilmiş spermalar ile özel şartlarda in vitro döllenişi ve zigot kültürü elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu teknikler ile yüksek kalitede ve çok sayıda embriyo üretimi mümkün olmaktadır.

Dünyada ilk kez 1982 yılında Brackett ve ark⁽⁶⁾., dana üretmek için bu yöntemi uygulamıştır. Daha sonra İn vitro olarak sığır⁽²²⁾, domuz⁽⁹⁾ ve bizon⁽⁴⁶⁾ elde edilmiştir. Embriyo üretiminin avantajlarına rağmen bizon ve sığırdaki ilk uygulamaları oositlerin olgunlaştırılabilmesi ile sınırlanmıştır. Bununla birlikte son zamandaki gelişmelerle bu zorluklar geniş ölçüde ortadan kalkmıştır⁽¹⁸⁾.

Embriyo Transferi (ET) ilk defa 19. yüzyılda Heape tarafından gerçekleştirilmiştir ve iyi verim özelliğine sahip dişi bireyden elde edilen çok sayıda embriyonun doğrudan ya da bölündükten sonra taşıyıcı hayvana aktarılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle istenilen genetik özelliklerden daha geniş çapta yararlanma imkanı ortaya çıkmaktadır.

İneklerde başlatılan Çoklu Ovulasyon Embriyo Transfer Projeleri (Multiple Ovulation Embryo Transfer, MOET) ile % 10 civarında genetik iyileştirme sağlandığı kaydedilmiştir^(44,56). Sonraki çalışmalarda sığır, bizon, koyun, keçi, deve ve diğer hayvan türlerinde de Embriyo Transfer tekniği uygulanmaya başlanmıştır^(5,45,52).

Embriyo Transferi ve diğer teknikler, çiftlik hayvanlarının hızlı bir şekilde çoğaltılması ve kaliteli ırkların elde edilmesi için kullanılmıştır. Sığır⁽⁸⁹⁾, bizon^(17,45,51,52), koyun⁽³¹⁾, at^(66,78), domuzda^(19,28) bu teknik uygulanmıştır.

Embriyo Transferi ve Çoklu Ovulasyon Embriyo Transferi teknikleri kullanılarak yerli ve yabancı çiftlik hayvanlarının genetik olarak iyileştirilmesi, kalitesinin artırılması ve maliyetin en aza indirilmesi ile ülke ekonomisine katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Bu teknikler suni tohumlama tekniği ile uygulandığında yaklaşık iki kat daha fazla kazanç sağlanmaktadır⁽¹⁴⁾. Ayrıca bu teknikler ile kaybolmakta olan genetik kaynakların korunması ve hayvanların hızlı gelişimi sağlanabilmektedir.

2.3.1.4. Rekombinant DNA Tekniği ve Transgenik Hayvanlar

Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak insan müdahalesi ile yeniden düzenlenmiş DNA molekülleri ve bu şekilde elde edilmiş DNA'dan da amaca uygun ürünler elde edilebilmektedir. İlk kez H. Boyer tarafından 1973 yılında *E. coli* DNA'sında bu teknik denenmiştir.

Genomuna bu teknikler ile farklı tür canlılardan gen transferi yapılmış canlılara transgenik canlılar denmektedir. Transgenik hayvanlar oluşturmak için, öncü çekirdek mikro enjeksiyon, sitoplazmik mikro enjeksiyon, ve retrovirüs temelli vektörler gibi biyolojik teknikler kullanılmaktadır. Son yıllarda enjeksiyon işlemi ile transfer gerçekleştirilmiş embriyolardan yalnız on tanesinden bir tanesinin hayatta kalması sağlanabilmektedir⁽⁸⁴⁾. Fare⁽²¹⁾, koyun^(27,76), keçi⁽¹⁸⁾, domuz⁽²⁷⁾, sığır^(12,41) gibi transgenik hayvanlardan; sonra kuşlar ve balıklarda da gen transferi gerçekleştirilmiştir.

Hayvanlar direnç ve insülin gibi üretimi önem taşıyan proteinlerin genleri transfer edilmekte ve bu genlerin yeni canlıda ifadesi gerçekleştirilmektedir. Bu tip çalışmalara birçok örnek bulunmaktadır. Yapılan çalışmalardan bazıları şunlardır; gen transferi ile hayvanlardaki meme bezlerinde süt ve istenilen protein sentezi düzenlenmiştir⁽⁸³⁾. Daha sonraki çalışmalarda domuzlarda büyüme hormonu genlerinin transferi, koyunda yün kalitesinin artırılması için sistein sentez geninin transferi⁽⁶¹⁾, somon balığına dil balığından soğuğa direnç geninin transferi⁽³⁰⁾ gerçekleştirilmiştir.

2.4. Genetik Farklılıklar ve Analiz Yöntemleri

Canlıların birbirinden ayırt edilmesi morfolojik özellikler, DNA veya protein analizine dayalı belirleyicilerine göre yapılmaktadır. Bunlardan morfolojik özelliklere göre yapılan ayrımlar, hayvanların ilk evcilleştirilmeye başlanmasından itibaren kullanılmaktadır.

Protein polimorfizmine dayalı analizler ile ebeveyn tayini, heterozigotluk indeksinin hesaplanması, polimorfik protein fenotiplerinin ve gen frekanslarının tespiti gerçekleştirilebilmektedir.

İlk kez 1955'te Smithies, nişasta jel elektroforez yöntemi ile hayvanlarda biyokimyasal polimorfik karakterlerin belirlenebileceğini ortaya koymuştur. Bundan sonra proteine dayalı polimorfizm analizleri için bu bir başlangıç olmuştur.

2.4.1. DNA Analizine Dayalı Moleküler Teknikler

Moleküler tekniklerin uygulamalarında değişik DNA belirleyicileri kullanılmaktadır. Bu belirleyiciler, ilk olarak kalıtsal bozuklukların genomdaki yerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda kullanılmışlardır. Son yıllarda

ise belirleyiciler ıslah çalışmaları açısından önemli olan, doğrudan üretim özelliklerini etkileyen ve ölçülebilir özelliklerle ilgili olan genler kantitatif özellik lokusları (QTL) zerinde yoğun çalışmalar vardır. Bu lokuslarda, şitliliği süreklilik gösteren karakterler yer alır ve fenotipler lme, tartma, sayma şeklinde kantitatif olarak belirlenebilir. Genom boyunca yer alan iki ya da daha fazla gen çifti, kalıtımın fenotip üzerindeki etkisine eklemeli yolla katkıda bulunabilir. Birçok gen bu işlevde yer aldığı için bu tip kalıtıma genellikle poligenik kalıtım denir. Genler belirli bir fenotipin ortaya çıkmasına eklemeli bir şekilde etkide bulunurlar. Tüm eklemeli allelerin fenotip üzerindeki toplam etkisinin diğer gen bölgelerindeki tüm eklemeli allelerin etkilerine hemen hemen hemen eşit olduğu kabul edilmektedir. Fenotip bu allelerin hepsinin toplamsal etkisi şeklinde ortaya çıkar. Poligenik zelliklerin analizi için bir organizma populusyonunda çok sayıda oğul dölün çalışılması gerekmektedir⁽³⁹⁾. Bu gen bölgelerinin moleküler genetik yöntemlerle tanımlanması ve bu bölgelerin yakınındaki verime etki eden genlerin yapısının ortaya çıkarılması, birçok ülkede çalışmaları sürdürülen hayvan genom projelerinin ortak hedefidir.

DNA analizine dayalı teknikler hibridizasyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na dayanmaktadır. Bu tekniklerden Enzimlerle Kesilen DNA Parçacıklarının Polimorfizm (Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP) tekniğinin dışındakiler, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile DNA'nın in-vitro koşullarda replikasyonuna dayanmaktadır.

2.4.1.1. Hibridizasyona Dayalı RFLP (Enzimlerle Kesilen DNA Parçacıklarının Polimorfizmi, Restriction Fragment Length Polymorphism) Tekniği

RFLP tekniğinde, genomik DNA'nın değişik bölgelerinin, bir yada daha fazla hibridizasyona özel endonükleazlarla kesilmesi daha sonra jel elektroforezi ile oluşan farklı uzunluktaki DNA parçalarının ayrılması, ayrılan parçaların naylon membrana transfer edilmesi ve özel DNA dizilerinin radyoaktif veya X ışınları ile gözlenmesi aşamalarından oluşmaktadır.

RFLP bantları, DNA dizisindeki, çeşitli yer değiştirmeler ile mutasyonlar sonucu meydana gelen ve Mendel kalıtımı gösteren moleküler belirleyicilerdir. Bu belirleyiciler, DNA parçalarının PCR reaksiyonu ile çoğaltılmadan direkt analizine izin vermektedirler. Bu teknik, tek zincirdeki DNA parçalarının sadece homolog olan diziler ile hibrid oluşturması esasına dayanmaktadır⁽⁷³⁾.

İlk kez 1980 yılında Bostein ve arkadaşları tarafından geliştirilen RFLP tekniği, lokus başına yalnızca 2 allel tanımlanmasına izin verdiği için hayvanlarda tüm genom taramasını sınırlamaktadır. Ayrıca kontrol edilemeyen bakteriyel kontaminasyon içeren örneklerde sonuçların güvenilirliği tartışılmaktadır. Uygulamalarda kontaminasyonu kontrol etmek zor olduğu için sadece taze kan örnekleriyle ęalıřmak suretiyle sınırlandırma yoluna gidilmiştir. Bu sınırlamaların yanı sıra radyoaktivite kullanılması, pahalı

olması ve teknik olarak uzmanlık gerektirmesi de bu tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir.

2.4.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Teknikler

PCR, çalışmaya konu oluşturan hedef bölgenin yapay olarak hazırlanmış olan oligonükleotidler (primer) ile sınırlandırılarak çoğaltılmasıdır. DNA'daki çeşitliliğin taranabilmesi için uygun primerlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu primerler, lokusun PCR ile in vitro enzimatik çoğaltılması (amplifikasyonu) için kullanılmakta^(53,70,71) ve istenilen genlerinya da DNA dizilerinin döllere bağlı replikasyonu, hızlı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Aynen doğal hücre bölünmesindeki replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 döngü sonra seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalamaktadır.

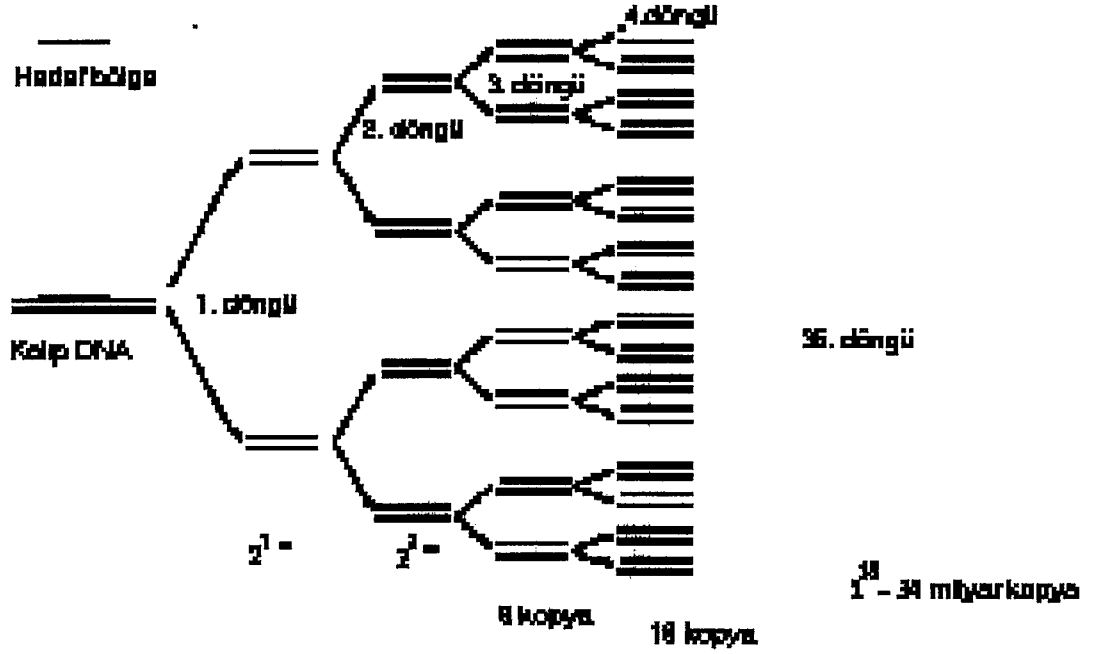
PCR reaksiyonuna katılan bileşenler şunlardır:

1. Kalıp DNA: Genomik DNA, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir.
2. Polimerazlar: En yaygın olarak kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* 'dan elde edilen Taq DNA polimeraz 'dır. Amplitaq, Hot Tub, Protase, Tth Pfu ve Vent gibi bazı enzimler de kullanılmaktadır.

3. Primerler: Primerler 10-25 nükleotid uzunluğunda sentetik oligonükleotitlerdir.
4. dNTP: Deoksiribo nükleozid fosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP). Primerden itibaren zincirin uzaması için gerekmektedir.
5. MgCl₂: PCR karışımında enzim aktivitesinin artırmak amacı ile kullanılmaktadır.

PCR reaksiyonu 3 aşamada gerçekleşir:

1. Ayrılma (Denatürasyon): Kalıp DNA'nın yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denatürasyonu) (92- 96 ° C)
2. Bağlanma (Annealing): Primerlerin, birbirinden ayrılmış DNA zincirlerinde bulunan uygun bölgelere bağlanması (35-65 ° C)
3. Uzama (Elongation): Hedef bölgede simetriği olan DNA zincirine, DNA polimeraz enziminin aktivitesi ile primerden itibaren sentezin gerçekleşmesi (72 ° C).



Şekil 2 1. Polimeraz Zincir Reaksiyon'unun şematize şekli

Bu üç aşama bir 'döngü' olarak kabul edilir ve çalışmalarda ortalama 25-35 döngü uygulanır. Her döngü sonunda, mevcut primer-genomik DNA kombinasyonu ile çoğalan DNA miktarı geometrik olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. İstedğimiz miktarda kopyalanan DNA'ya ulaşıldığında PCR reaksiyonu sona erdirilir.

2.4.1.2.1. AFLP (Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi; Amplified Fragment Length Polimorphism)

AFLP Tekniği; genomik DNA'nın 2 adet restriksiyon enzimi ve bir adet 3' adaptörü ile kesilmesi daha sonra 5' primerleriyle çoğaltılan DNA ile restriksiyon parçaları elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Elde edilen ürünler jelde yürütülerek gümüş boyama veya radyoaktivite ile gözlenmektedir^(47,95).

PCR ile RFLP tekniğinin kombinasyonu olup, kullanılan primerler hem dizi özgü (spesifik) hem de rasgeledir. Böylece hem RFLP'nin tekrarlanabilirliği hem de PCR'in basitliği bir araya getirilmiştir⁽⁵⁸⁾.

2.4.1.2.2. SSRs (Basit Zincir Tekrarları; Simple Sequence Repeat)

Ardışık olarak tekrar eden basit DNA dizi tekrarları insan genomunda yaygın olarak bulunmakta ve bireyler arasında yüksek farklılık (polimorfizm) göstermektedirler. Bu metod tekrar eden lokuslara bağlanan primerlerin PCR yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Ard arda tekrarlanan zincirdeki dizilerin sayısındaki değişiklikler ile tekrar eden lokuslar arasındaki farklılıklar belirlenmektedir⁽⁸⁷⁾.

Bu tekrar bölgeleri, tekrar eden birimlerin büyüklüğüne göre 2 gruba ayrılmaktadır:

- a) Minisatellitler
- b) Mikrosatellitler

1.5.1.2.2.1. Minisatellitler (Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar; VTNR):

Bir DNA dizisinin ardışık tekrarlanan kopyalarını içeren minisatellit lokusu genelde yüksek polimorfizm göstermektedir⁽³³⁾ ve yaklaşık 10-100 baz çiftlik birimlerin birkaç yüz kopyası tekrar etmektedir. Minisatellitler çeşitli sayıda tekrar eden lokuslar olarak bilinen VTNR (Variable Number of Tandem Repeats) sınıflarından birisidir⁽⁵⁴⁾. İlk kez insan genomunda tanımlanmışlardır. Daha çok telomer bölgesinde yoğunlaşmaktadırlar. Bu bölge bireyler arasında yüksek oranda farklılıklar gösterdiğinden dolayı genetik farklılıkların araştırıldığı çalışmalarda büyük önem taşımaktadır. Ancak minisatellit işaretleyicilerinin çoğaltılması zor olduğu için tercih edilmemektedir.

1.5.1.2.2. Mikrosatellitler (Kısa Ardışık Tekrarlar; Short Tandem Repeats; STR):

Mikrosatellit belirleyicileri 2-5 baz çifti uzunluğunda tekrarlanan üniteler içermektedir. Bu tekrarlar $(TG)_n$ ve $(AAT)_n$ şeklinde olabilmektedir^(43,79,86). Ökaryotik genomlarda yaygındır⁽²⁴⁾. Tekrar birimlerinin çoğunda yüksek sıklıkta polimorfizm vardır⁽⁴⁾. Mikrosatellit lokusu incelendiğinde belli bir popülasyonda yüksek derecede ayırım sağlamak mümkün olmaktadır. Ayrıca çok az miktarlarda ve bütünlüğü bozulmuş DNA'da dahi sonuç vermektedir. Bir mikrosatellit lokusunun kullanılabilirliği; yüksek heterozigotluk, değişmez tekrar birimleri, ayrıştırılabilir alleller, kolay çoğaltılması (amplifikasyon) gibi parametreler ile ölçülmektedir. STR analizinde yüksek ayırıcılığı olan ve tek baz farkını bile gösterebilen denatüre edici poliakrilamid jeller kullanılmaktadır.

2.4.1.2.3. SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi; Single Nucleotide Polymorphisms)

DNA dizisinde, aynı pozisyonda farklı nükleotidlerin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. İnsanda her 100-300 baz çiftinde SNP'ler görülmektedir⁽⁶²⁾. İki insanın DNA dizisi karşılaştırıldığı zaman, aralarında 1.6-3.2 milyon SNP bulunduğu tahmin edilmektedir. SNP, kodlanan bölgelerdeki protein

fonksiyonları ile direk ilişkilendirilebilir. Atasal kalıtımda sabit olduğundan dolayı seleksiyon için uygun işaretleyicileridir. Son yıllarda, insanda genetik hastalıkların araştırılmasında, insan evrim çalışmaları ve çeşitli çiftlik hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda tercih edilmektedir. İnsan genom haritalamasında⁽⁸⁵⁾, İnsanın evrimi ile ilgili çalışmalarda^(8,25) da kullanılmaktadır. Ayrıca diğer hayvanlar ile ilgili genom projelerinde geniş ölçüde kullanılmaya başlanmıştır⁽⁴²⁾.

2.4.1.2.4. RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA; Randomly Amplified Polimorphic DNA)

Genetik polimorfizmin taranmasında kullanılan moleküler tekniklerden bir tanesi Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemidir⁽⁹²⁾. PCR tekniği ilk defa Dr. Alec Jeffreys ve arkadaşları tarafından 1985 yılında Leicester Üniversitesinde insanlar üzerinde uygulanmış ve aynı yılda Nobel Ödülü'nü almıştır. Daha sonra diğer canlılarda yoğun bir şekilde uygulanmasına başlanmıştır.

RAPD yöntemi ilk tanımlandığından itibaren önemli bir değişikliğe uğramamıştır. Rasgele dizilerden oluşan oligonükleotit dizileri, kalıp DNA kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Bu teknikte 9-10 baz çifti uzunluğundaki primerler kullanılmaktadır. Reaksiyon başına tek primer ve 10-25 ng DNA gerekmektedir. Genomik DNA; primer, DNA polimeraz, dNTP, magnesium

klorit, ve uygun bir tampon çözelti varlığında 'ısısal döngü' cihazında çoğaltılır. Uygun bağlanma ısı (annealing temperature) ve reaksiyon şartları sağlandığında primerlerin kendileri ile homolog DNA dizilerine bağlanması ve dur kodonuna kadar sentezin devam etmesini sağlar. Polimorfizmlerin varlığı, primer bağlanma noktalarındaki mutasyon ve dizi değişikliklerinin sonucu olarak bantların varlığı ve yokluğuna dayalı olarak tespit edilir. Bu da RAPD belirleyicilerinin genelde dominant oldukları anlamına gelmektedir.

RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılan ürünler; elektriksel alanda uygun tampon bulunan ortamda (TAE, TBE), jel elektroforezinde (agaroz, poliakrilamid jel) yürütülür. Jelde oluşan bantların varlığı ve yokluğu polimorfizm olarak değerlendirilir^(13,92).

1.5.1.2.4.1. RAPD Metodunun Avantajları ve Dezavantajları

RAPD primerlerinin seçiminde DNA problemlerine ya da dizi bilgisine ihtiyaç yoktur. Bu teknik oldukça basit, hızlı ve otomasyonu kolaydır. Ayrıca çok az miktarda DNA kullanımı gerektirdiği için kullanım alanı geniş çaptadır⁽⁸⁸⁾. Ancak RAPD belirleyicilerinin tekrarlanabilirliği konusunda çok sayıda çelişkili kanıtlar mevcuttur. Bu konudaki en önemli nokta PCR koşullarının tamamen sabit tutulması gerekmektedir⁽¹⁵⁾.

Metodun hızı, hassasiyeti ve çok yönlü olması gen haritalaması ve populasyon çalışmaları için gerekli olan çok sayıda örneğin taranmasına olanak vermektedir. Belirlenen polimorfizmlerin dominant olması ve dolayısıyla heterozigotların ayırt edilememesi ise önemli bir dezavantajdır.

RAPD Belirleyicilerinin Kullanıldığı Uygulama Alanları

Bu teknik az miktarda DNA'nın çalışmaya olanak vermesi ve uygulama yönünden kolay ve hızlı olmasından dolayı birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. RAPD belirleyicileri gen haritalarının yapılması, adli tıp olayları, bitki ve hayvan yetiştirme uygulamaları, populasyon genetiği çalışmaları, taksonomi çalışmalarında, bazı kalıtsal hastalıkların teşhisinde (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, 'Fragile X' sendromu, AIDS, lösemi gibi), ve ebeveyn tayinininde kullanılmaktadır. Ayrıca RAPD belirleyicileri kromozom özel (spesifik) DNA segmentlerinin hızlı olarak izolasyonu ve tanımlanmasına olanak veren polimorfizm çalışmalarında güvenle kullanılmaktadır^(26,88,91).

1.5.1.2.4.2. RAPD Metodunun Çiftlik Hayvanlarında Uygulanması İle İlgili Litaratür Örnekleri

McPherson ve ark.⁽⁴⁹⁾, RAPD-PCR yönteminin diğer DNA parmak izi yöntemleriyle beraber kullanılabileceğini, hastalıkların epidemiyolojisi ve yayılma bölgelerinin haritalarının çıkarılmasında çok yararlı bir metod olduğunu bildirmişlerdir.

Rothuizen ve Wolferen⁽⁶⁷⁾, bu yöntemi köpeklerde kalıtsal hastalıkların teşhisinde kullanmışlardır.

Joachim ve ark.⁽³⁴⁾ ise, koyundaki patojen ve patojen olmayan *Sarcoystis* türlerinin arasındaki ayrımı bu yöntemi kullanarak yapmışlardır.

Tinker ve ark.⁽⁸²⁾, RAPD-PCR yöntemiyle 27 arpa ırkı arasındaki polimorfizmi araştırmışlar ve bunun için 33 primer test etmişlerdir. Bu primerlerden 19 tanesinde 31 polimorfik bant belirlemişler ve ırkların ayrımını bunlara göre yaptıklarını yapmışlardır.

Kaya ve ark.⁽³⁷⁾, RAPD-PCR metodunun hızlı, hassas ve çok yönlü olması nedeniyle orman ağaçlarının gen haritalaması ve populasyon çalışmaları için gerekli olan çok sayıda örneğin taranmasında kullanmışlardır.

Joshi ve ark.⁽³⁵⁾, RAPD-PCR yöntemi ile koyun, keçi, bizon ve köpek gibi farklı hayvan türleri arasındaki ilişkiyi incelemişler, bu hayvanlar arasında ortak RAPD bantlarını belirlemişlerdir.

Cushwa ve ark.⁽¹⁵⁾, farklı koyun ırklarında 131 RAPD primerini taramışlar ve bunlardan 53 tanesinde sonuç aldıklarını, toplam 85 polimorfik bant gözlemlediklerini ve bu verilerin koyun genom haritalama çalışmalarına eklendiğini bildirmişlerdir.

Kostia ve ark.⁽⁴⁰⁾, sığırlarda RAPD profilini incelemişler ve 3 RAPD bant dizisinin daha önce tanımlanan memeli dizisi ile homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir.

Kantanen ve ark.⁽³⁶⁾, sığır ve koyunlarda genetik çeşitliliği araştırmak için RAPD-PCR metodunu kullanmışlar, koyunlarda polimorfizmin sığırlarda daha fazla olmasına rağmen iki koyun ırkı arasında da homojitenin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Ghosh ve ark.⁽²⁰⁾, Hindistan'da yüksek verim özelliğine sahip Garole koyunlarında RAPD-PCR yöntemini uygulamışlar, düşük ve yüksek doğurganlığa sahip ırkları karşılaştırarak ve doğurganlıkla ilişkili toplam 26 primer test etmişlerdir. Düşük oranda doğurganlığı olan koyunlarda farklı moleküler ağırlıkta bantların oluştuğunu bildirmişlerdir.

Williams ve ark.⁽⁹²⁾, soya, mısır, siyanobakteriler ve insanda RAPD-PCR yönteminin polimorfizmin belirlenmesinde ve genetik haritalama çalışmaları için basit bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca Mısır'da bulunan 4 koyun ırkını (Baladi, Barki, Rahmani ve Suffolk) 19 RAPD primeri ile taranmış⁽²⁾, Barki, Rahmani ve Baladi ırklarının genetik yapılarının birbirine yakın olduğunu bildirmiştir.

Noli ve ark.⁽⁵⁷⁾, dokuz arpa türü arasındaki genetik ilişkileri RFLP ve RAPD yöntemlerini kullanarak incelemişler, RAPD yönteminde daha fazla polimorfizm olduğunu ve iki metodun verileri arasında paralel sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Gustine ve ark.⁽²³⁾, Kuzey Amerika'da bulunan yabancı beyaz yonca türleri ile üç tane kültür popülasyonunu RAPD-PCR yöntemi ile karşılaştırmışlar, sürpriz bir şekilde farklı iklim ve bölgede yetiştirilen beyaz yoncalar arasında genetik benzerlik olduğunu bildirmişlerdir.

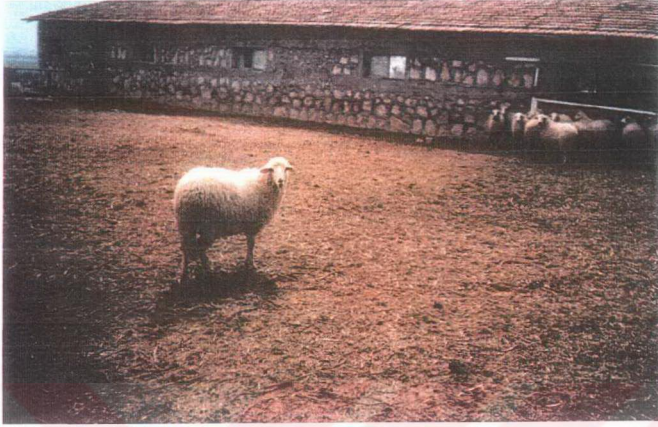
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklemeler

Bu çalışmada Türkiye'nin yerli koyun ırklarından Sakız, Karayaka ve bunların melezlemesi sonucu elde edilen Bafra ırkına ait kan örneklerinde RAPD-PCR metoduna dayalı genetik analizler yapıldı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı Tarımsal İşletmeler Genel Müdürlüğü (TİGEM) çiftliklerinde ve halk elinde yetiştirilen koyunlardan kan örnekleri toplandı. Bafra ırkına ait örnekler, Amasya Gökhöyük Tarım İşletmeleri Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nden, Sakız ırkına ait örnekler, Bandırma Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, İzmir-Çeşme civarındaki halka ait çiftliklerden, Karayaka ırkına ait örnekler, Amasya Gökhöyük Tarım İşletmeleri Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Giresun ve civarındaki halka ait çiftliklerden alınmıştır. Kan örneği alınan koyun ırklarının cinsiyetlerine ve alındığı bölgelere göre dağılımları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin ırklara, cinsiyetlerine ve alındıkları bölgelere göre dağılımı

İrkin Adı	Erkek Sayısı	Dişi Sayısı	Toplam	Alındığı Bölge
Bafra	20	20	40	Amasya Gökhöyük Tarım İşletmeleri Hayvancılık Araştırma Enstitüsü
Sakız	10	10	20	Bandırma Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü
	20	20	40	İzmir-Çeşme civarındaki halka ait çiftliklerden
Karayaka	10	10	20	Amasya Gökhöyük Tarım İşletmeleri Hayvancılık Araştırma Enstitüsü
	20	20	40	Giresun ve civarındaki halka ait çiftliklerden



Şekil 3.1. Bafra ırkına ait bir koyun



Şekil 3.2. Karayaka ırkına ait bir koyun



Şekil 3.3. Sakız ırkına ait koyunlar (Cemal Ün, Institute of Animal Breeding Science, Endericher Allee 15, 53115 Bonn, Germany)

Örneklerin toplanmasında ırkın özelliklerini en çok gösteren hayvanların seçilmesine özen gösterilmiştir. Kan örnekleri vakumlu EDTA'lı tüplere alınarak DNA izolasyonu için 48 saat içerisinde soğuk zincir ile laboratuvar ortamına ulaştırıldı.

3.2. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada RAPD yönteminin laboratuarda optimizasyon çalışmaları Bafra ırkına ait örneklerde gerçekleştirilmiştir. Bafra ırkına ait bireylerin kan örneklerinden Konsantre Tuz Çözeltisi İle Çöktürme Yöntemi⁽³²⁾ uygulaması ile bireylere ait genomik DNA'lar izole edildi. Örnekler arasında DNA konsantrasyonu ve saflığı açısından büyük farklılıklar gözlemlendi ve bu durum optimizasyon çalışmalarını yavaşlattı. Bu nedenle daha sonra aynı devlet üretme çiftliğinden Bafra ırkına ait kan örnekleri tekrar alınarak Fermentas Genomic DNA Purification KİT ® ile DNA izolasyon işlemi tekrarlandı.

Bu izolasyon yönteminde; 200 µl antikoagulanlı kan örneği üzerine Lysis Buffer (KHCO₃, NH₄Cl, 0.5 M EDTA; pH: 8:0) konularak 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen kanların üzerine kloroform eklenerek yavaşça karıştırıldı ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Üsteki sıvı faz döküldü, üzerine 400 µl fenol eklenen örnekler tekrar 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Üstteki temiz faz steril bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine precipitation solüsyon eklendi. Tüpler iki dakika oda sıcaklığında karıştırılarak bekletildi. Daha sonra 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek oluşan süpernatant kısım döküldü. Altta kalan pellet kısmı NaCl solüsyonu ile iyice çözüldükten sonra mevcut hacmin yaklaşık iki misli oranında saf alkol (%99) eklendi ve 10 dakika - 20 °C'de bekletildi. Dondurucudan çıkartılan tüpler, 10000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edildi. Daha sonra dipte pellet şeklinde bulunan DNA % 70'lik alkol ile yıkandı. Tüpler kurutulduktan sonra üzerlerine

DNA yoğunluğuna göre 100 - 200 µl steril su eklendi ve 4 °C'de en az 10 saat iyice çözülmesi için bekletildi. Elde edilen DNA rnekleri daha sonra -20 °C'de saklandı.

3.3. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması

Moleküler analiz yöntemlerinden özellikle RAPD yöntemi gibi az miktarda genomik DNA gerektiren uygulamalarda, DNA miktarının bilinmesi büyük önem taşıtmaktadır. DNA'daki bütün pürin ve pirimidin bazları 260 nm'de ultraviyole işığını absorbe ederler. DNA'nın miktarının hesaplanması, spektrofotometre ile 260 nm'de ölçülmesi ile belirlenmektedir. 260 nm'deki bu okunan değerler, örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanmasına olanak sağlamaktadır⁽⁷²⁾. 1 OD (Optic Density) yoğunlukta yaklaşık 50 µg / ml DNA olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan örneklerin optik yoğunlukları (OD) kuvars küvet kullanılarak spektrofotometrede belirlendi. Daha sonra bu veriler kullanılarak 160 örneğe ait DNA konsantrasyonları ng/µl cinsinden hesaplandı. DNA'lar RAPD-PCR uygulamaları için 5 ng/µl olacak şekilde hesaplandı.

Ayrıca 260 nm ve 280 nm deki OD'ler de ölçülerek nükleik asit saflığının tayini gerçekleştirilmektedir. Nükleik asit solüsyonunda OD_{260} / OD_{280} oranının 1.8 - 2.0 arasında olması istenir. Nükleik asit süspansiyonunda protein ya da fenol artıklarının bulunması bu oranı azaltmaktadır.

Böylece DNA miktarının tam olarak hesaplanması güçleşmektedir ⁽⁷²⁾. Çalışmada kullanılan örneklerin DNA saflığı hesaplanmış birkaç örnekte OD₂₆₀ / OD₂₈₀ oran 1.8'den küçük olduğu diğerlerinde ise bu oranın istenilen değerler arasında olduğu belirlendi.

3.4. Primerlerin Seçimi

RAPD yönteminin uygulandığı bu çalışmada kullanılan primerlerin (sentetik oligonükleotitlerin) seçiminde Guanin ve Sitozin bazlarının toplamının, toplam baz sayısına oranın % 50 ile 80 arasında olması, primerlerin 10 baz çifti uzunluğunda olması ve primerlerin birbirinin tamamlayıcısı (komplementeri) olmaması⁽⁹²⁾ gibi bazı hususlara dikkat edildi.

RAPD analizinde birçok primerin taranması ve sonuç alınan primerlerin genom analizinde kullanılması gerekmektedir. Genellikle taranan primerlerden çok azında RAPD bantları gözlenebilir. Bu nedenle primer seçiminde Cushwa'nın 1996 yılında koyunlarda yapmış olduğu çalışmasında⁽⁹²⁾ bant veren 18 primer ve Operon Technology®'den rasgele 2 primer olmak üzere toplam 20 adet primer seçildi. Çalışmada kullanılan 20 adet primerin DNA dizileri ve dizideki G-C oranları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.2. Primerlerin baz dizileri ve G-C sayısının toplam baz sayısına oranı

primer	Primer Dizini (5'---3')	G- C (%)
1	TGCCGAGCTG	70
2	AGGTGACCGT	60
3	TGGACCGGTG	70
4	CATCCGTGCT	60
5	GGTGCGGGAA	70
6	CCGAATTCCC	60
7	GGGAATTCGG	60
8	GGCACTGAGG	70
9	GTGTCGCGAG	70
10	GTTGCGATCC	60
11	GTCCACACGG	70
12	TTCCCCCGCT	70
13	GGACCCTTAC	60
14	GATGACCGCC	70
15	GTCCCGACGA	70
16	TGTCATCCCC	60
17	AAGCCTCGTC	60
18	GGACCCAACC	70
19	CTCTGGAGAC	60
20	GTGACATGCC	60

3.5. Çalışılan Koyun Irkları İçin RAPD-PCR Yönteminin Optimizasyonu

Irka özgü RAPD bantlarının belirlenebilmesi için her ırkın bireyelerine, RAPD-PCR yöntemi uygulandı. Elde edilen ırklar arası ve ırk içindeki polimorfik RAPD bantlarının taraması yapıldı.

3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Optimizasyon için RAPD-PCR yöntemi ile yapılan çalışmalar dikkate alınarak, en iyi sonuç alınmış olan miktar ve oranlar denenmiştir^(15,16,29,48,50,64,74,92,93). Denemeler sonucunda reaktiflerin uygun miktarları belirlendi. Reaktiflerin (MBI Fermentas ® ve Promega ®) miktarları aşağıda verilmiştir:

1. Taq polimeraz Enzimi: 5 u/µl stok çözeltisinden 0.2 u/µl enzim kullanıldı.
2. 10X Reaksiyon Çözeltisi: Hazır ticari stoktan (10mM Tris, %0.1 Triton X- 100,sığır serum albümini) kullanıldı.
3. MgCl₂ Çözeltisi: 25mM olan hazır stoktan 2.5-3 mM kullanıldı.
4. dNTP: 10mM olan hazır stoktan 1.25 mM kullanıldı.
5. Primer: Stoklar steril distile su ile 100 ng/µl yoğunluğunda sulandırıldı. PCR karışımında 0.4 µM olacak şekilde kullanıldı.

Çizelge 3.3. OPA20 primeri için PCR optimizasyon denemelerinin sonuçları

Deneyin Adı	PCR Buffer (µl)	MgCl ₂ (mM)	dNTP (mM)	Taq DNA Pol. (ünite)	Primer (µM)	DNA (ng)	Sonuç
İntra	2.5	2.5	0.2	1	0.4	20	Bant yok
						22.5	Bant yok
						25	Bant iyi
İkiz	2.5	2.5	0.2	1	0.4	20	Bant silik
						21	Bant iyi
						22	Bant yok
Karayaka	2.5	3	0.2	1	0.4	20	Bant iyi
						21	Bant silik
						22	Bant yok
İkiz (Halk eli)	2.5	3	0.2	1	0.4	35	Bant yok
						38,5	Bant silik
						39,5	Bant iyi
Karayaka (Halk eli)	2.5	3	1	1	0.4	39	Bant silik
						39.5	Bant iyi
						40	Bant yok

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için hazırlanan karışım önce DNAase ve RNAase'dan arındırılmış steril 0.5 ml'lik ependorf tüplerinde hazırlandı ve daha sonra 0.2 ml'lik ependorf tüplerine eşit olarak dağıtıldı. Daha sonra bu tüplere her bireye ait genomik DNA örnekleri konuldu ve tüpler PCR ısı düzenleme cihazına (thermocycler; Thermo Hybaid ®) yerleştirildi.

3.5.2. Reaksiyon ısıları ve Döngü Sayısı

PCR cihazına yerleştirilen DNA ipliklerin birbirinden ayrılması (denatürasyon) için 94 ° C, primerlerin DNA zincirinde uygun bölgelere bağlanması (annealing) için 35 ° C, zincirin uzaması (elongation) için 72 ° C sıcaklık uygulanmaktadır. Bu üç aşama bir döngü adını almaktadır. Çalışmamızda aşağıda belirtilen sıcaklıklarda toplam 40 döngü uygulandı ve sentez işleminin tamamlanabilmesi için 72 ° Cde 10 dakika bekletildi.

Bir döngü

94 ° C 2 dakika

94 ° C 1 dakika

35 ° C 1 dakika

72 ° C 2 dakika

Isı düzenleme cihazındaki işlem tamamlandıktan sonra örnekler, agaroz jelde yürütülmek üzere 4 °C'de bekletildi. Bu çalışmada RAPD-PCR tekniği her

örnek için en az 2 kez tekrarlandı ve optimizasyon denemeleri ile birlikte \approx toplam 10000 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

3.5.3. Elektroforez Tekniği

Bu çalışmada jel yoğunluğu, elektrik akımı ve jelde yürütme süresi için en uygun değerler deneme-yanılma yöntemi ile belirlendi. Elektrolit çözeltisi olarak TBE (Tris-Borat-EDTA) kullanıldı. Çözelti 10 misli konsantr olarak hazırlandı (54 g Tris, 27.5 g Borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA) ve bu stok çözelti sulandırılarak elektrolit çözelti olarak kullanıldı. Her uygulama için 150 ml 10X TBE kullanıldı. Bu çözeltinin 20 ml'lik kısmı agaroz jel hazırlanmasında, kalan kısmı ise elektrolit çözelti olarak kullanıldı.

3.5.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Bu çalışmada %1.7'lik agaroz jel kullanıldı. Bunun için gerekli olan agaroz (Sigma, Prona[®]Basica le) miktarı hassas terazide tartılarak 1X TBE içerisinde berraklaşınca kadar kaynatıldı. Daha sonra içerisine 0.5 μ g/ml olacak şekilde etidyum bromid eklenerek 50-60 ⁰C oluncaya kadar soğutuldu. DNA molekülünü boyamak için kullanılan etidyum bromid mutajenik bir etkiye sahiptir⁽⁷²⁾. Bu nedenle çalışmada kullanılan jeller ve etidyum ile kirlenen

diğer katı maddeler atık torbasında toplanarak imha edilmek üzere Türkiye Atom Enerji Kurumu'na gönderildi.

3.5.3.2. Agaroz Jelin Dökülmesi

50-60 °C sıcaklıktaki jel, tarakları takılmış olan jel tepsisine döküldü. Katılaşan jelden taraklar dikkatlice çıkartılarak kuyucukların oluşması sağlandı. Üzerine 1X TBE çözeltisi döküldü.

3.5.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi

PCR ürünleri kuyucuklara yüklenmeden önce yükleme boyası (Loading Buffer) ile boyandı. İlk denemelerde ticari olarak alınan yükleme boyası kullanıldı. Daha sonra laboratuarda Ficoll, Bromfenol blue, distile su kullanılarak yükleme boyası laboratuvar ortamında hazırlandı. Çıplak gözle görülebilen bromfenol blue bantları, elektroforez sırasında DNA bantlarını yaklaşık konumunu göstermektedir⁽⁷²⁾.

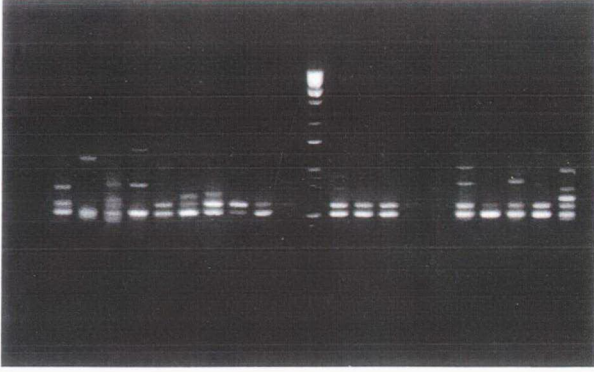
3.5.3.4. Örneklerin Yürütülmesi

Çalışmada kullanılan jel tankının elektrolitleri arasındaki mesafe dikkate alınarak 1-5 Volt/cm arasında elektrik akım değerleri denendi ve 5 Volt/cm'de en iyi sonuç alındığı görüldü. Örnekler bu değerler arasında 2.5 saat yürütüldü.

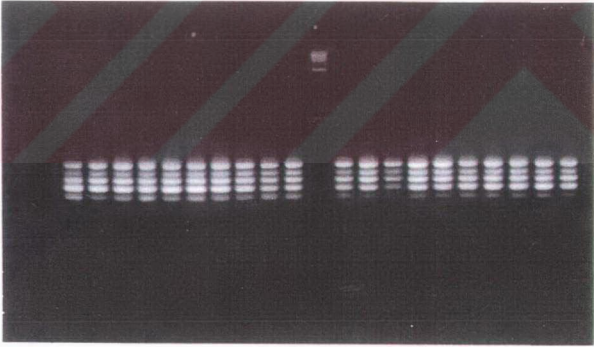
3.5.4. RAPD Bantlarının Gözlenmesi ve Verilerin Kaydedilmesi

Etidyum bromid ile boyanmış olan DNA molekülleri ultra-viyole (UV) görüntüleme sehпасı üzerinde 312 nm dalga boyunda flouresan yansıma göstermektedir. Jelde görülen PCR ürünü olan bantlar "RAPD Bantı" olarak adlandırılmaktadır⁽⁷²⁾.

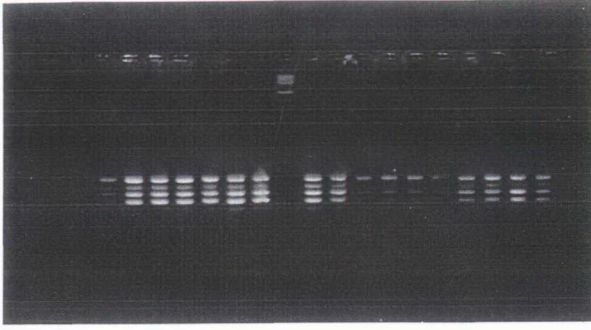
Çalışmada RAPD bantları UV görüntüleme sehпасı üzerinde gözlemlendi. Bu bantların uzunluklarını tespit etmek için 100 bp (MBI Fermentas[®] SM0321) ve 1 kb (MBI Fermentas[®] SM0311) DNA ölççeği (marker) kullanıldı. Gözlenen RAPD bantları, Polaroid[®](DS-34) fotoğraf makinesi ile yeşil lens kullanılarak siyah-beyaz olarak görüntüldü.



Şekil 3.4. Bafra ırkına ait dişi ve erkeklerde, OPAF5 primeri ile çoğaltılmış RAPD bantları, 11. hat 1kb DNA ölçüğü



Şekil.3.5. Sakız ırkına ait dişi ve erkeklerde, OPAF5 primeri ile çoğaltılmış RAPD bantları, 11. hat 1kb DNA ölçüğü



Şekil.3.6. Karayaka ırkına ait dişi ve erkeklerde, OPAF5 primeri ile çoğaltılmış RAPD bantları, 11. hat 1kb DNA ölçeği

3.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

Bu çalışmada üç farklı koyun ırkına ait beş popülasyondan elde edilen DNA örnekleri test edilen toplam 20 primer ile tarandı ve 6 primer için 67 RAPD bantı gözlemlendi. Veriler POPGENE Software (POPGENE VERSION1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi. Mevcut olan bantlar için "1", mevcut olmayan bantlar için "0" yazılarak veri tablosu oluşturuldu.

3.6.1. Allel Frekansları

Diploid populasyonlar için allel frekansları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Her bir RAPD allelinin frekansı} = \frac{\sum N_i}{N}$$

N_i ; verilen populasyondaki birey sayısı,

N ; belirli RAPD bantlarının bulunduğu diploid örneklerdir⁽⁵⁵⁾.

3.6.2. Genetik Varyasyonun Ölçülmesi

Populasyonlardaki varyasyon değişik parametreler ile ölçülebilir⁽⁵⁵⁾.

3.6.2.1. Lokusların Yüzdesi

Bir lokus dikkate alındığında en yaygın allelin populasyondaki oranı %95'in (ya da %99) altındaysa bu lokus polimorfik olarak değerlendirilir⁽⁵⁵⁾.

Bu çalışmada polimorfik lokus için 0.99 değeri esas alındı. Eğer çalışmada yeterli sayıda örnek ve yeterli lokus varsa genetik varyasyon, polimorfik lokus ve her lokusta ortalama heterozigotluk ile ölçülebilir⁽⁵⁵⁾. Polimorfik lokusların yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

$$P = n_p / r$$

P ; polimorfik lokusların yüzdesi

n_p ; polimorfik lokusların sayısı

r ; toplam lokus sayısı

3.6.2.2. Heterozigotluk

Gen frekansı göz önünde bulundurulduğunda genetik varyasyon, ortalama heterozigotluk veya gen çeşitliliği ile ölçülebilir. Eğer populasyon rasgele çiftleşiyorsa ve i 'ninci allelin popülasyondaki sıklığı X_i ise beklenen heterozigotluk aşağıdaki gibi hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾:

$$\hat{h} = 1 - \sum_i X_i^2$$

Bir lokustaki heterozigotluk tahmini $\hat{h} = 2n (1 - \sum X_i^2)$ ile yapılabilir⁽⁵⁵⁾.

3.6.2.3. Allelerin Sayısı

Genetik çeşitliliğin tahmin edilebilmesi için lokustaki allelerin sayısından (n_a) yararlanılabilir. Ancak bu değerler örnek sayısına bağlı olarak değişebilir.

$$\text{Ortalama } (n_a) = \sum_i n_{ai}$$

n_a : allelerin sayısı,

n_{ai} : i 'ninci lokustaki allelerin sayısı⁽⁵⁵⁾

3.6.2.4. Bir Lokusta Allelerin Etkili Sayısı

Allel sayısı ortalama olarak zararlı genler hakkında fikir verebilir, allel sayısı ne kadar az ise genetik varyasyon o kadar küçük demektir. Etkili allel sayısı aşağıdaki formül ile hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾:

$$n_e = 1 / \sum X_i^2$$

n_e ; allelerin etkili sayısı

X_i ; i'ninci allelin sıklığı

3.6.2.5. Shannon'un Bilgi Endeksi

Shannon'un bilgi içeriği her populusyonda RAPD bantlarının sıklığı ile hesaplanmıştır⁽⁵⁵⁾:

$$H_0 = -\sum p_i \ln p_i$$

H_0 ; Shannon'un bilgi içeriği

p_i ; RAPD bantının sıklığı

3.6.3. Alt Populusyonlarda Gen Farklılıklarının Analizi

Populusyonlar arsında ve populusyon içinde gen farklılıklarının bilinmesi gerekmektedir. Bir alt populusyona ait gen kimliği (1 – gen farklılığı) aşağıdaki formülle hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾:

$$J_k = \sum X_{ki}^2$$

J_k ; gen kimliği,

X_{ki} ; k'nıncı alt populasyonun i'ninci allelinin sıklığı

Bir alt populayonda bir bireyin beklenen heterozigotluğu H_s 'dir. Bu aşağıdaki formülle hesaplanabilir:

$$H_s = \sum_{j=1} h_j / s \quad h_j; j'inci \text{ alt populasyonda beklenen heterozigotluk,} \\ s; \text{ alt populasyon sayısı}$$

Tüm populasyonlarda gen kimliği; $J_k = \sum \bar{X}^2$ ile hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾.

J_k , gen kimliği;

\bar{X} , allelerin ortalama sayısı.

Alt populasyonlarda bireylerin beklenen heterozigotluğu H_s ile gösterilir⁽⁵⁵⁾ ve $H_s = \sum \hat{h}_j / s$ ile hesaplanır.

h_j , j'ninci alt populayonda beklenen heterozigotluk;

s, alt populasyonların sayısı.

Toplam populasyonlardaki gen kimliği $J_T = \sum \bar{X}_i^2$ ile hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾.

J_T , gen kimliği;

\bar{X}_i , ortalama allel sayısı.

Toplam populasyonda bireylerin beklenen heterozigotluk, $H_T = 1 - \sum \bar{X}_{ia}^2$ ile hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾.

H_T , toplam populasyonda bireylerin beklenen heterozigotluk

X_{ia} , tüm alt populasyonlarda ortalama i 'nci allelin sıklığı

Toplam populasyonda gen çeşitliliği $H_T = 1 - J_T$ 'dir⁽⁵⁵⁾.

$$H_T = H_S - D_{ST}^{(55)}.$$

D_{ST} , alt populasyonlar arasında ortalama gen çeşitliliği

Alt populasyonlar arasındaki gen farklılaşmasının göreceli büyüklüğü G_{ST}

olarak adlandırılır ve $G_{ST} = D_{ST} / H_T$ eşitliği ile bulunabilir.

D_{ST} , alt populasyonlar arasında ortalama gen çeşitliliği

H_T , toplam populasyondaki gen çeşitliliğidir⁽⁵⁵⁾

Alt populasyonlar arasında ortalama minimum genetik mesafe D_m ile ifade

edilir. $\check{D}_m = sD_{ST} / (s - 1)$ eşitliği ile hesaplanabilir⁽⁵⁵⁾.

S , alt populasyon sayısı

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Değerlendirilen RAPD Primerleri

Üç ırka ait beş farklı populasyon 20 primer ile tarandı. 6 primer için toplam 67 RAPD bantı gözlemlendi. Aşağıdaki çizelgede bu primerlerin adları ve gözlenen RAPD bantlarının yaklaşık olarak baz çifti sayıları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Değerlendirmeye alınan 6 primerin tüm ırklarda oluşturdukları RAPD bantlarının büyüklüklerinin yaklaşık değerleri (bp)

Primerin Adı	Gözlenen Bantların Yaklaşık Büyüklükleri (bp)
OPA02	225-550
ORA20	350-650
OPC05	300-1250
OPD02	325-800
OPE04	300-650
OPF05	150-1200

4.2. Populasyonun Genetik Yapısı

Değerlendirilen 6 RAPD primeri için 67 polimorfik lokus gözlemlendi. Ancak zayıf bantların değerlendirilmemesinden dolayı bu sayı 65'e düşürüldü.

4.2.1. Polimorfik Lokusların Yüzdesi

İrklar içindeki polimorfik lokusların yüzdesi 22.39 – 53.73 arasında değişmektedir. Bafra ırkındaki polimorfik lokus sayısı diğer ırklara göre en yüksek değerdedir. En düşük değer ise Sakız halk eli ırkında görülmektedir.

Bütün alleler aynı sıklıkta olduğu zaman gözlenen allel sayısı (N_a) ile etkili allel sayısı (N_e) birbirine eşittir. Bu durum dışında ise zararlı genlerin bulunması durumunda, N_e her zaman için N_a 'dan daha küçüktür. Bu çalışmada da N_e sayısı her zaman için daha küçük çıktı. Gözlenen allel sayısı 1.22-1.54 arasında iken, etkili allel sayısı 1.15-1.32 arasında değişmektedir. Bütün koyun ırklarında genetik çeşitlilik istatistiğinin özeti Çizelge 4.2'de verilmiştir. Tüm ırklar arasında N_a ve N_e değerleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

4.2.2. Heterozigotluk

En yüksek değerde heterozigotluk Bafra ırkında gözlemlendi. Aynı zamanda Bafra ırkı yaklaşık 1200 bp büyüklüğünde tek allel içermektedir. Bu sonuçlar bize Bafra ırkının diğer ırklardan genetik olarak ayrılabilirliğini göstermektedir. İrklar içerisinde devlet üretme çiftliklerinden alınan Sakız

örnekleri ile halk elinden toplanan Sakız örnekleri heterozigotluk açısından en düşük değerleri göstermektedir. Bu değerler Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Tüm ırklar için heterozigotluk değeri ise Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Bütün koyun ırklarında tüm lokuslar için genetik çeşitlilik istatistiğinin özeti (Na^1 ; Gözlenen allel sayısı, Ne^2 ; Allelerin etkili sayısı, h^3 ; Gen çeşitliliği, I^4 ; Shannon'un bilgi içeriği, P^5 ; Polimorfik lokus⁽⁵⁵⁾)

İrkin Adı	Örnek Sayısı	Na^1	Ne^2	h^3	I^4	# p. lokus ⁵	% p. lokus ⁵
. Bafra	35	1.54±	1.32±	1.19±	0.28±	36	53.73
		0.50	0.37	0.20	0.29		
. Sakız	18	1.39±	1.22±	0.13±	0.20±	26	38.81
		0.49	0.34	0.19	0.27		
. Karayaka	17	1.22±	1.17±	0.10±	0.14±	15	22.39
		0.42	0.33	0.18	0.26		
. Sakız Halk Eli	31	1.24±	1.15±	0.09±	0.13±	16	23.88
		0.43	0.31	0.17	0.24		
. Karayaka Halk Eli	33	1.40±	1.24±	0.14±	0.21±	27	40.30
		0.50	0.36	0.20	0.28		

Çizelge 4.3. Tüm populasyonlarda tanımlanmış istatistikler

	Örnek Sayısı	Na	Ne	h	I
Ortalama	134	1.97	1.53	0.30	0.45
Standart Sapma		0.17	0.36	0.17	0.23

4.2.3. Shannon'un Bilgi Endeksi

Shannon'un bilgi endeksinin en yüksek değeri Bafra ırkında gözlemlendi. Bu değerler heterozigotluk ile paralellik göstermektedir. Tüm ırklar için bu değer 0.13-0.28 arasında değişmektedir.

4.2.4. Irk içi ve Irklar Arasında Genetik Farklılıklar

Tüm ırklar arasında genetik farklılık (H_T), 0.30 bulundu. Irklar arasındaki değer ise 0.13 bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu sonuçlar bize ırklar içinde diğerlerinden ayrılacak düzeyde farklılaşmanın olmadığını göstermektedir. G_{ST} değerinin 0.58 çıkmıştır. Bu da bize ırklar arasındaki genetik farklılığın ırk içindeki genetik farklılıktan daha fazla olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Irklarda gen çeşitliliğinin analizi

	Örnek Sayısı	H_T	H_s	G_{ST}
Ortalama	134	0.30	0.13	0.58
Standart Sapma		0.03	0.01	
Polimorfik lokus			65	
Polimorfik lokus yüzdesi			97.01	

4.2.5. Genetik Kimlik ve Genetik Mesafe

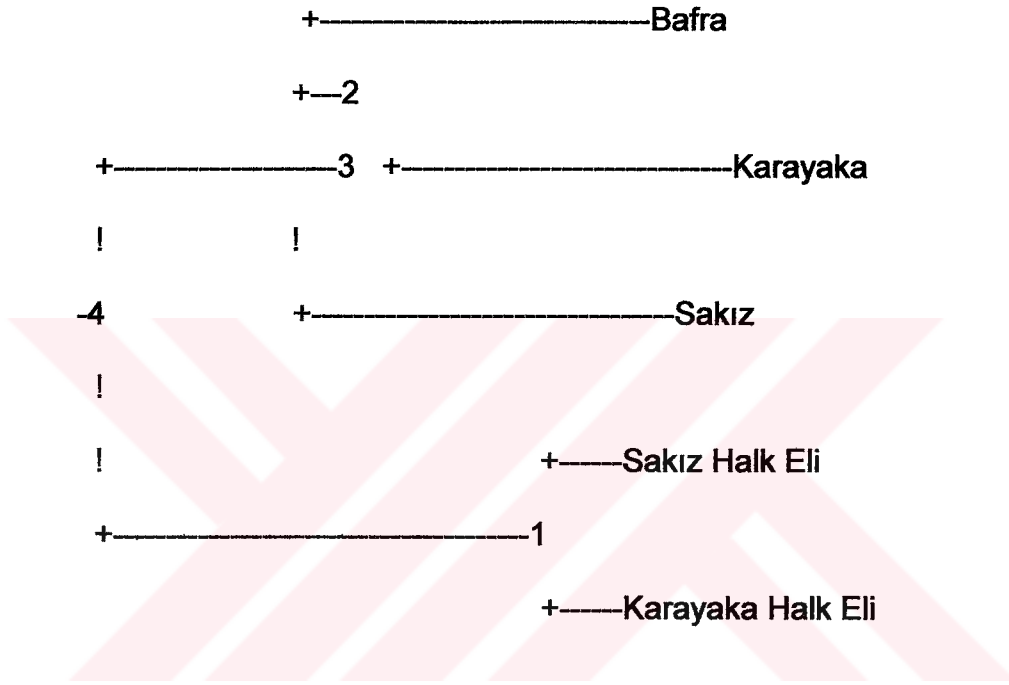
Tüm ırklar için genetik kimlik ve genetik mesafe değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Buna göre Bafra ve Sakız ırkı arasındaki genetik kimlik değeri 0.8072 iken genetik mesafe 0.2142, Bafra ile Karayaka ırkı arasındaki genetik kimlik değeri 0.8130 iken genetik mesafe 0.2070, Bafra ve Sakız halk eli örnekleri arasındaki genetik kimlik değeri 0.6244 iken genetik mesafe 0.4779, Bafra ve Karayaka halk eli örnekleri arasındaki genetik kimlik değeri 0.6768 iken genetik mesafe 0.3309, Sakız ve Karayaka ırkı arasındaki genetik kimlik değeri 0.7799 iken genetik mesafe 0.2485, Sakız ve Sakız halk eli örnekleri arasındaki genetik kimlik değeri 0.7525 iken genetik mesafe 0.2844, Sakız ve Karayaka halk eli örnekleri arasındaki genetik kimlik değeri 0.7404 iken genetik mesafe 0.3006, Sakız halk eli ve Karayaka halk eli

örnekleri arasındaki genetik kimlik değeri 0.9575, genetik mesafe 0.0432'dir. Bu sonuçlara göre en uzak genetik mesafe Bafra ırkı ile Sakız halk eli örnekleri arasında görülürken, en kısa genetik mesafe Karayaka halk eli ve Sakız halk eli örnekleri arasındadır. Genetik kimlikler genetik mesafe kalıplarını takip eder⁽⁵⁵⁾. Buna göre genetik olarak en benzer olarak Sakız halk eli ve Karayaka halk eli örnekleri belirlendi.

Çizelge 4.5. Çaprazın üstünde verilen Genetik kimlik ve çaprazın altında verilen genetik mesafenin tarafsız ölçümü (1.Bafra, 2. Sakız, 3. Karayaka, 4. Sakız halk eli, 5. Karayaka halk eli)

Irklar	1 ¹	2 ²	3 ³	4 ⁴	5 ⁵
1	****	0.8072	0.8130	0.6244	0.6768
2	0.2142	****	0.7799	0.7525	0.7404
3	0.2070	0.2485	****	0.6647	0.6791
4	0.4709	0.2844	0.4084	****	0.9577
5	0.3903	0.3006	0.3870	0.0432	****

Tüm ırklar için POPGENE paket programında PHYLIP VERSION 3.5 NEIGHBOUR Yöntemine göre dendogram çizildi (şekil 3.1).



Şekil 4.1. Beş koyun ırkı arasındaki genetik mesafeyi gösteren dendogram ($Nei^{(55)}$, PHYLIP Version 3.5 NEIGHBOR Procedure)

Bu çalışmada halk elinden ve devlet üretme çiftliklerinden alınan Sakız ve Karayaka'nın genetik olarak dendogramda bir grup oluşturması beklenirken ilginç bir sonuç olarak her iki ırkında halk elinden alınan örnekleri bir grupta yer almıştır. Devlet üretme çiftliğinden alınan Sakız ırkına ait örneklerin

diğerlerinden tamamen ayrı bir grupta yer aldı. Sakız ve Karayaka ırkının melezi olan Bafra ırkı ise dendogramda Karayaka ile bir grup oluşturdu.

Bu çalışma ile Türkiye yerli koyun ırklarından alınan örneklerin sınırlı sayıda primer kullanılarak RAPD-PCR yöntemi ile moleküler genetik analizi yapıldı. Çalışma bundan sonraki çalışmalar için bir başlangıç olması açısından önemlidir. Genetik mesafenin belirlenmesinde genellikle birden fazla DNA analizine dayalı metodun verileri göz önüne alınır. Bu amaçla mevcut DNA örneklerinin farklı moleküler teknikler kullanılarak analiz çalışmalarına devam edilmektedir. Bu sonuçlar bir ön veri niteliğindedir. Çiftlik hayvanlarının moleküler genetik analizlerinde henüz yolun başında olan Türkiye'nin bu ve benzeri moleküler genetik analizlerle bilgi birikimi ile oluşacak veri bankasına ihtiyacı vardır. Bu bilgiler daha sonra yerli çiftlik hayvanlarının ıslahında kullanılabilir.

5. KAYNAKLAR

1. Akçapınar H., Koyun Yetiştiriciliği, Ankara, 2000.
2. Ali B. A., Genetics similarity among four breeds of sheep in Egypt detected by random amplified polymorphic DNA markers, African Journal of Biotech., 2(7), 194(2003).
3. Alpan O., Arpacık R., Sığır Yetiştiriciliği, Ankara, 1996.
4. Amos B., Schlötterer C., Tautz D., Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling, Science, 260, 670(1993).
5. Anon, Annual report, DARE, Ministry of Agriculture, Govt. Of India, 1998-99
6. Brackett B. G., Bousequet D., Boice M. L., Donawick W. L., Evans J. F., Doresell M. A., Normal development following in vitro fertilization in the cow, Biol. Reprod., 27, 147(1982).
7. Burr B., Evola S. V., Burr F. A., The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding, In: Setlow J. K., Hollander A. (Eds), Genetic engineering principles and methods, Plenum Press, 5, 45(1983).
8. Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes, Nature Genetics, 22, 231(1999).

9. Cheng W. T. K., Moor R. M., Polge C., In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro, *Theriogenology*, 25, 146(1986).
10. Chupin D., Schuh H., Survey of present status of the use of artificial insemination in developing countries, *World Animal Review*, 74/75, 26(1993).
11. Chupin D., Thibier M., Survey of present status of the use of artificial insemination in developing countries, *World Animal Review*, 82,58(1995).
12. Cibelli J. B., Stice S. C., Golueke P. J., Kane J. J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A., Roble J. M., Cloned transgenic calves produced from non-quiescent foetal fibroblast, *Science*, 280, 1256(1998).
13. Clark A. G., Lanigan C. M. S., Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs, *Mol. Biol. Evol.*, 10(5), 1096(1993).
14. Cunningham E. P., Recent developments in biotechnology as they relate to animal genetic resources for food and agriculture. Background study paper no 10. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, April, 1999.
15. Cushwa W. T., Doods K. G., Crawford A. M., Medrano J. F., Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome, *Mammalian Genome*, 7(8), 580(1996).
16. Cushwa W. T., Medrano J. F., Identification of RAPD genetic markers in sheep, *Proc. 5 th. World Congress Genet. Appl. Livestock Prod.*, 21, 133(1994).

17. Drost M., Wright Jr. J. M., Cripe W. S., Richter A. R., Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*), *Theriogenology*, 20, 579(1983).
18. Ebert K. M., Selgrath J. P., Di Tullio P., Denmon J., Smith T. E., Memon M. A., Sehindler J. E., Monastersky G. M., Vitole J. A., Gordon K., Transgenic production of variant human tissue type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goat and analysis of expression, *Biotechnology*, 9, 835(1991).
19. Galvin J. M., Killin D. B., and Stewart A. N. V., A procedure for successful non-surgical embryo transfer in swine, *Theriogenology*, 41, 1279(1994).
20. Ghosh S. K., Chauchuri G., Gupta P., Litter-size RAPD markers in highly prolific Garole microsheap of Bengal, *Journal of Interacademia*, 5(3), 368(2001).
21. Gordon J. W., Ruddle F. H., Integration and stable germline transmission of genes injected into mouse pronuclei, *Science*, 214, 1244(1981).
22. Gordon I., Lu K. H., Production of embryos in vitro and its impact on livestock production, *Theriogenology*, 33, 77(1990).
23. Gustine D. L., Voigt P. W., Brummer E. C., Papadopoulos Y. A., Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars, *Published in Crop. Sci.*, 42, 343(2002).
24. Gyapay G., Morissette J., Vignal A., Dib C., Fizames C., Millassean P., Marc S., Bernardi G., Lathrop M., Weissenbach J., The 1993-94 Genethon human linkage map, *Nature Genetics*, 7, 246(1994).

25. Hacia J. G., Fan J. B., Ryder O., Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays, *Nature Genetics*, 22, 164(1999).
26. Hadrys H., Balick M., Schierwater B., Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Mol. Ecol.*, 1, 55(1993a).
27. Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad G. E. Jr., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L., Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection, *Nature*, 315, 680(1985).
28. Hazeleger W, Kemp B., State of the art in pig embryo transfer, *Theriogenology*, 51, 81(1999).
29. Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H., Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step Protocol, *BioTechniques*, 23, 504(1997).
30. Hew C. L., Fletcher G. L., Davis P. L., Transgenic salmon: tailoring the genome for food production, *Journal of Fish Biology*, 47, 119(1995).
31. Holm P., Walker W. H., Seamark R. F., Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in-vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo, *J. Reprod. Fert.*, 107 , 175(1996).
32. Jeanpierre M., A rapid method for the purification of DNA from blood, *Nucleic Acids Research*, 15(22), 9611(1987).
33. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Hypervariable "minisatellite" regions in Human DNA, *Nature*, 314, 65(1985a).

34. Joachim A., Tenter A. M., Jeffries A. C., Johnson A. M., A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic *Sarcocystis* species of sheep, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 956(1998).
35. Joshi C. G., Rank D. N., Brahmakshtri B. P., Patel A. V., Vateiya P. H., Muraleedharan P., Khoda V. K., Solanki J. V., RAPD analysis by PCR using arbitrary primer in different animal species, *Indian Veterinary Journal*, 75(11), 1029(1998).
36. Kantaren J., Vilkki J., Elo K., Maki Janila A., Random amplified polymorphic DNA cattle and sheep: application for detecting genetic variation, *Animal Genetics*, 26(5), 315(1995).
37. Kaya Z., Neale D. B., Randomly amplified DNA (RAPD) polymorphisms in *Pinus nigra* var *pallasiana* and *Pinus brutia*, *Turkish J. of Agriculture and Forestry*, 17, 295(1993).
38. Kernodle S. P., Cannon R. E., Scandalios J. G., Concentration of primer and template qualitatively affects products in Random-Amplified Polymorphic DNA PCR, 14, 3(1993).
39. Klug W. S., Cummings M. R., *Genetics*, 2000.
40. Kostia S., Palo J., Varvio S. L., DNA sequences of RAPD fragments in artiodactyls, *Genome*, 39(2), 456(1996).
41. Krimpenfort P., Rodemakers A., Eyestone W., Vanden Schon A., Vanden Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Plantenburg G., Pieper E., Strijkar Rand de Boer H., Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production, 9, 844(1991).

42. Lindblad-Toh K., Winchester E., Daly M. J., Large-scale discovery and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the mouse, *Nature Genetics*, 24, 381(2000).
43. Litt M., Luty J. A., A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat with in the cardiac muscle Actin gene, *Am. J. Hum. Genet*, 44, 397(1989).
44. Lohuis M. M., Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs, *Theriogenology*, 43, 51(1995).
45. Madan M. L., Prakash B. S., Jaikhani S., Singla S. K., Patla P., Manik R. S., Buffalo endocrinology with special reference to embryo transfer, National Dairy Research Institute, Karnal, India, Pub., 265, 1993.
46. Madan M. L., Singh S. K., Chauhan M. S., Manik R. S., In vitro production and transfer of embryos in buffaloes, *Theriogenology*, 41, 139(1994).
47. Marques C. M., Araujo J. A., Ferreira J. G., Whetten R., O' Malley D. M., Liu B. H., Sederoff R., AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticomis*, *Theor. Appl. Genet.*, 96, 727(1998)
48. McPherson J. M., Eckstein P. E., Scoles G. J., Gajadhar A. A., Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration, *Molecular and Cellular Probes*, 7, 293(1993).
49. McPherson J. M., Gajadhar A. A., Wilson S. M., Random amplified polymorphic DNA, *Parasitology Today*, 8(7), 235(1992).

50. Mercier B., Gaucher C., Feugeas O., Mazurier C., Direct PCR from whole blood, without DNA extraction, *Nucleic Acids Research*, 18, 19(1990).
51. Misra A. K., Mutha Rao M., Kasiraj R., Ranga Reddy N. S., Pant M. C., Factors affecting pregnancy rate following non-surgical embryo transfer in buffalo (*Babulus bubalis*) a retrospective study, *Theriogenology*, 52(1), 1(1999).
52. Misra A. K., Superovulation and embryo transfer in buffalo. Progress, problems and future prospects in India, *Buffalo Journal*, 1, 13(1993).
53. Mullis K. B., Faloona F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.*, 155, 335(1987).
54. Nakamura Y., Lathrop M., O'Connell P., Leppert M., Barker D., Wright E., Skolnick M., Kondoleon S., Litt M., Lalouel J. M., White R., A mapped set of DNA markers for human chromosome 17., *Genomics*, 2, 302(1988).
55. Nei M., *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, 1987
56. Nicholas F. W., Smith C., Increased rate of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting , *Anim. Prod.*, 36, 341(1983).
57. Noli E., Salvi S., Tuberosa R., Comparative analysis of genetic relationships in barley based on RFLP and RAPD markers, *Genome*, 40, 607(1997).

58. Parsons Y. M., Shaw K. L., Mapping unexplored Genomes: genetic linkage map of the Hawaiian Cricket *Laupala*, *Genetics*, 162, 1275(2002).
59. Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip A. M., Taverne M. A. M., Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries, *Theriogenology*, 30, 751(1998).
60. Pieterse M. C., Vos P. L. Am., Kruip Th. A. M., Wurth Y. A., Van Beneden Th. H., Wilmense A. H., Taverne M. A. M., Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes, *Theriogenology*, 35, 19(1991).
61. Powel B. C., Walker S. K., Bawden C. S., Sivaprasad A. V., Rogers G. E., Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status, *Fertil. Dev.*, 6, 615(1994).
62. Primmer C. R., Borge T., Lindell J., Saetre G. P., Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avran genome, *Molecular Ecology*, 11, 603(2002).
63. Ragot M., Hoisington D. A., Molecular markers for plant breeding: Comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs, *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 975(1983).
64. Rasmussen R., Optimizing Rapid Cycle DNA Amplification Reactions, *The Rapidcyclist Newsletter*, 1, 1(1992).
65. Reed C. A., The beginnings of animal domestication, In *Animal Agriculture*, San Francisco, 1974.

66. Riera F. L., McDonough J., Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina, *Equine Vet. J.*, 15, 116(1993).
67. Rothuizen J., Van Wolferen M., Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission, *Animal Genetics*, 25, 13(1994).
68. Ryder M. L., Sheep In: Mason I. L. (eds) *Evolution of Domestic Animals*, Longman, London, 63, 1984.
69. Ryder M. L., Stephenson S. K., *Wool Growth*, Academic Press, 805(1968).
70. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase, *Science*, 239, 487(1988).
71. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230, 1350(1985).
72. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1989.
73. Schall B. A., Leverich W. J., Rogstad S. H., Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology, In: Falk D. A., Holsinger K. E.(eds), *Genetics and conservation of rare plants* , 123, New York Oxford University Press, 1991.
74. Schierwater B., Ender A., Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products, *Nucleic Acids Research*, 21(19), 4647(1993).

75. Shackleton D. M., Wild Sheep and Goats and Their Relatives, Status Survey and Conservation Action Plan for Caprinae. IUCN, Gland, Switzerland, 1997.
76. Simon J. P., Wilmut I., Clark A. J., Archibald A. L., Bishop J. O., Lathe K., Gene transfer into sheep, *Biotechnology*, 6, 179(1998).
77. Sönmez R., İvesi Koyunlarının Vücut Yapıları, Çeşitli Verimleri ve Bunların Diğer Yerli Koyunlarla Çeşitli Verimler Bakımından Mukayeseleri, *Ankara Üniv. Zir. Fak.Derg.*, 7(2), 93(1955).
78. Squires E. L., McCue P. M., Vanderwall D., The current status of equine embryo transfer, *Theriogenology*, 51, 91(1999).
79. Tautz D., Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acids Res.*, 17, 6463(1989).
80. Tekintaş C., İzci C., Alkan M., Türkiye Hayvancılığı, Türkiye, 1999.
81. Thibier M., Statistic of the ET industry around the world, *IETS Newsletter*, 15(4), 10(1966).
82. Tinker N. A., Fortin M. G., Mather D. E., Random amplified polymorphic DNA pedigree relationships in spring barley, *Theor. Appl. Genet.*, 85, 976(1993).
83. Violette J. L., Soulier S., Persuy M. A., Lepourry L., Legrain C., Stinnakre G., Li Huillier P., Mercier J. C., Application of transgenesis to modifying milk protein composition, In *Milk Composition, Production and Biotechnology*, Eds, Welc et al., 321(1997).
84. Wall R. J., Modification of milk composition in transgenic animals, *Biotechnology's role in genetic improvement of farm animals*, USDA, 165(1996).

85. Wang D. G., Fan J. B., Siao C. J., Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science*, 280, 1077(1998).
86. Weber J. L., May P. E., Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 388(1989).
87. Weising K., Atkinson R. G., Gardner R. C., Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation, *PCR Methods and Application*, 4, 249(1995).
88. Whitkus R., Doebley J., Wendel J. F., Nuclear DNA markers in plants, 116-141, Amsterdam, The Netherlands: Kluwer, 1994.
89. Willet E. L., Black W. G., Casida L. E., Stone W. H., Buckner P. J., Successful transplantation of a fertilized bovine ovum, *Science*, 113, 247(1951).
90. Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V., Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers, *Methods Enzymol.*, 218, 704(1993).
91. Williams J. G. K., Hanafey M. K., Rafalski J. A., Tingey S. V., Genetic analysis using random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum, *Theor. Appl. Genet.*, 86, 1033(1993).
92. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531(1990).
93. Wittwer C. T., Garling D. J., Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization, *Biotechniques*, 10, 76(1991).

94. Yalçın B. C., Sheep and goats in Turkey, 1986.

95. Zabeau M., Vos P., Selective Restriction Fragment Amplification
general method for DNA fingerprinting European patent application,
No: 0534858, (1993).



EK-1

/* Diploid RAPD Data Set */

Number of populations = 5

Number of loci = 67

Locus name :

OPA02-1 OPA02-2 OPA02-3 OPA02-4 OPA02-5 OPA02-6 OPA02-7 OPA02-8 OPA02-9
OPA20-1 OPA20-2 OPA20-3 OPA20-4 OPA20-5 OPA20-6 OPA20-7 OPA20-8
OPC05-1 OPC05-2 OPC05-3 OPC05-4 OPC05-5 OPC05-6 OPC05-7 OPC05-8 OPC05-9 OPC05-10
OPC05-11 OPC05-12 OPC05-13 OPC05-14 OPC05-15
OPD02-1 OPD02-2 OPD02-3 OPD02-4 OPD02-5 OPD02-6 OPD02-7 OPD02-8 OPD02-9 OPD02-10
OPD02-11 OPD02-12 OPD02-13
OPE04-1 OPE04-2 OPE04-3 OPE04-4 OPE04-5 OPE04-6 OPE04-7 OPE04-8 OPE04-9 OPE04-10
OPF05-1 OPF05-2 OPF05-3 OPF05-4 OPF05-5 OPF05-6 OPF05-7 OPF05-8 OPF05-9 OPF05-10
OPF05-11 OPF05-12

name = BAFRA

fis = 0.0

000100111	00100111	000000001010001	0010100100	000110100000
110100110	00111111	000000001010001	0010100100	000100100100
000100110	00111111	000101001010001	0010100100	001110100010
110100111	00111111	000000001010001	0010100100	011000100010
110101111	00111111	000101001010001	0010100110	000110100000
110101111	00111111	000100000010001	0010100110	000111000000
110101111	00111000	000101001010001	0010100100	000111000001
110101111	00111111	000101001010001	0010100110	000110001010
110100111	00111111	000100001010001	0001100011101	0010100110	000111000010
110100111	00111111	000100001010001	0010100110	000110110000
110100111	00111111	000100001010001	0001100011101	0010100100
110100101	00111111	000100001010000	0001100011101	0010100100
110100111	00111111	000100001010000	0001100011101	0010100110
110101111	00111111	000100001010001	0001100011101	0010100110
110101111	00111111	000101101010001	0001100011101	0010100110	000111100000
110101111	00111111	000101101010001	0001100011101	0010100110	000110110000
110101111	00111100	000101101010001	0001100011101	0010100110	000111100000
010101111	00111100	000101101010001	0001100011101	0010100110	001111110000
010101111	00000100	000101101010001	0001100011101	001101100000
110101111	00000100	000101101010001	0001100011101	0000100000	000000100000
110100111	00111111	000100001010001	0001100011101	0000100100	001101010000
.....	00111111	000101101010001	0001100011101	0010100100	001100000000
110111111	00111111	000101001010001	0001100011101	0010100100	001100000000
110101111	00111111	000101001010001	0001100011101	0010100100	001100000000
110101111	00111111	000101001010001	001101000000
110100111	00111111	000101001010001	0001100011101	0010100110	001100101000
110101111	00111111	000101001010001	0001100011101	0010100000	001000000010
110101111	00111111	000101001010001	0001100010000	001101111000
110101111	00111111	000101001010001	0001100011101	0000100100	111101100010
110101111	00111111	000101001010001	0001100011101	0000100000	001111010000
110101111	00111111	0001100010000	0010100100	010001000000
110101111	00111111	000100101000000	0001100010000	0000100100	010001000000
110101111	00111111	000100101010001	0001100011101	0000100100	010001000000

```

110101111 00111111 000100101010001 0001100011101 0000100100 011111000000
110101111 00111111 000101101010001 0001100011101 0000100100 110111000000
110101111 00111111 000100101010001 0001100011101 0010100100 010111100000
110101111 ..... ..... ..... 0010100100 000100000000
110101111 00111111 ..... 0001100010000 0000100000 001111000000
110101111 00001111 000100000000000 0001100010000 0000100100 111110000000
110101111 ..... 000100000000000 ..... 0010100110 001101000000

```

name = SAKIZ

fis = 0.0

```

..... 00111100 000111010000000 0001110000000 1010100100 011111000000
..... 00111100 110111010100000 0001110000000 0000110000 010101000000
000100111 00111100 010111010100000 0001110000010 1010100100 011111000000
..... 00111100 010111010100000 0001110000000 1010100100 011111000000
000100111 00111100 010111010110010 0001110000000 1010100100 011111000000
000100111 00111100 010111010110000 0001110000000 1010100100 011111000000
000100111 00111100 010111010110000 0001110000000 1010100100 011111000000
000100110 00111100 010111010000000 0001110000010 1010100100 011111000000
000100111 00111100 000010010110010 0001110000010 1010100100 011111000000
000100111 00111100 110111010110000 0001110000010 1011100100 011111000000
000100111 00111100 010111010110010 0001110000010 0110100100 011111000000
000100111 00011010 000111010110000 0001010000000 1010100100 011111000000
000101111 00011010 000010010000000 0000010000010 1010100100 011111000000
000101101 00111010 000010000000000 0000010000010 1010100100 011111000000
000101111 00111010 000010010000000 0000010000010 1010100100 011111000000
000100111 ..... 000010010000000 0001110000110 1010100100 011111000000
000101111 ..... ..... 0001110000010 ..... 011111000000
000101111 00111010 ..... 0001110000000 ..... 011111000000
000101111 00111010 ..... 0001110000000 ..... 011111000000
000101111 00111010 ..... 0001110000000 1010100100 011111000000

```

name = KARAYAKA

fis = 0.0

```

110101111 00110100 000001000000000 0001101100100 0000110000 000001000000
110101111 00110100 ..... 0001101100100 0000110000 010101000000
110101111 00111101 000011000111010 0001101101101 ..... 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 0001101101100 ..... 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 ..... 0000110000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 ..... 0000110000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 ..... 0000110000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 ..... 0000110000 011111000000
110101111 ..... 000011000111010 ..... 0000110000 011111000000
110101111 00111101 000011000110010 0001101101101 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 0001101101101 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 0001101101100 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 0001101101101 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 ..... 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000011010 ..... 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000011010 ..... 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000111010 ..... 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000011000011010 0001101101101 0000111000 011111000000
110101111 00111101 000001000010010 0001101101101 0000111000 011111000000

```

name = SAKIZ HALK ELİ

fis = 0.0

```
..... 11000100 010010100100000 0000000100000 1100010100 011111011000
..... 11000100 010010100100000 0000000100000 1000010100 011111010000
..... 11000100 010010100100000 0000100100000 1000010100 011111010000
001000000 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
001000000 ..... ..... 0000000100000 1100010100 011111010000
001000000 ..... ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
001001010 ..... ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
001001010 ..... 0100101000000000 0000100100000 1100010100 011111000000
001001010 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 011111010000
001001010 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 .....
001001010 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
001001010 11000100 000010000000000 0000000100000 1100010100 011111000000
001001010 11000100 000010100100000 0000100100000 1100010100 011111010000
001001010 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
001001010 11000100 ..... 0000000100000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010000000000 0000000100000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010100100000 0000100100000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010100100000 0000100100000 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... ..... 1100010100 .....
011001010 11000100 ..... 0010100000000 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... 0010100000000 1100010100 011111000000
011001010 11000100 010010100100000 ..... 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... ..... 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... ..... 1100010100 011111010000
011001010 11000100 ..... ..... 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010100100000 0010100000000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010100100000 ..... 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010100100000 ..... 1100010100 011111010000
011001010 11000100 ..... ..... 1100010100 011111010000
011001010 11000100 010010100100000 0010100100000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 1100010100 011111010000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 1100010100 011111000000
011001010 00010000 ..... 0010100100000 1100010100 011111000000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 ..... 011111000000
011001010 11000100 010010000000000 0010100100000 ..... 011111010000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 ..... 011111010000
011001010 11000100 010010100000000 0010100100000 ..... 011111010000
011001010 11000100 ..... 0010100100000 ..... .....
```

name = KARAYAKA HALK ELİ

fis = 0.0

```
001000000 11000100 ..... 0110100100000 1100110100 000101000000
001000000 11000100 ..... 0010100100000 1100110100 000100000000
001000000 11000100 ..... 0010100100000 1100110100 .....
001000000 11000100 ..... 0110100100000 1110010100 .....
111001010 11000100 ..... 0010100100000 1100010100 011111000000
111001010 11000100 ..... 0000100100000 1100010100 011111000000
111001010 11000100 ..... 0110100100000 1100010100 011111000000
111001010 11000100 ..... 0110100100000 1100010100 011101000000
111001010 11000100 000010100000000 0110100100000 1100010100 011101000000
111001010 11000100 000010100000000 0000100100000 ..... 011101000000
111001010 11000100 0101101101000010 0010100100000 ..... 011101000000
111001010 11000100 010110110100000 0000100100000 1100110100 011111000000
111001010 11000100 000010110000000 0100100100000 1100110100 011111000000
111001010 11000100 000010100100000 0100100100000 1100110100 010101000000
```



```

111001010 11000100 000010100000000 0100100100000 1100110100 010101000000
111001010 11000100 000010100000000 0100100100000 1100110100 010101000000
111001010 11000100 000010100000000 0100100100000 1000010000 010101000000
111001010 11000100 000010100000000 0100100100000 1000000000 011110100000
111001010 11000100 010111110100010 0100100100000 ..... 011111000000
111001010 11000100 010110110100000 0100100100000 ..... 011111000000
111001010 11000100 011010100000000 1110100000000 1000000000 011111000000
011001010 11000100 011010100000000 0110100010000 1000000000 011111000000
..... 11000100 010010100000000 1110100000000 1000000100 010101000000
011001010 11000100 ..... 1110100000000 1000000000 011111000000
111001010 11000100 ..... 1110100000000 ..... 011111000000
011001010 11000100 000010000000000 1110100110000 1000010100 011111000000
111001010 11000100 011110100000000 1110100100000 1000010100 011111000000
111001010 11000100 011010100000000 1010000000000 1100010100 011111000000
111001010 11000100 011010100100000 1010100000000 1100010100 010111000000
111001010 11000100 ..... 0010100000000 1000010100 010111000000
111001010 11000100 ..... 0010100000000 .....
111001010 11000100 011110100100000 0010100000000 ..... 011111000000
111001010 11000100 ..... 1110100000000 ..... 011111000000
111001010 11000100 010010100000000 0110100100000 ..... 010101000000
111001010 11000100 011010100000000 0010100000000 1000010000 .....
111001010 11000100 011110100000000 ..... 1000010000 .....
111001010 11000100 011110100100000 ..... ..... 011111000000
111001010 11000100 ..... ..... ..... 011111000000
111001010 11000100 ..... ..... 1000010000 011111000000
111001010 11000100 ..... ..... 1000010100 001111000000

```