

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**BAZI KÜLTÜR VE YERLİ SIĞIR IRKLARINDA
LEPTİN GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
BELİRLENMESİ VE SÜT VERİMİ İLE
BİLEŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

MURAD GÜRSES

ELAZIĞ – 2010

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Metin BAYRAKTAR
Zootečni Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin BAYRAKTAR _____

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE _____

Danışmanlar

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Metin BAYRAKTAR _____

Prof. Dr. Necmettin ÜNAL _____

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE _____

Doç. Dr. Orhan ÖZBEY _____

Doç. Dr. Fikret ESEN _____

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK-TOVAG Araştırma Grubu tarafından 1001 Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında 1070843 nolu araştırma projesi olarak desteklenmiştir. Ayrıca çalışmanın bir bölümü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından 1413 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmanın gerçekleşmesi için finansal destek sağlayan TÜBİTAK ve FÜBAP'a teşekkür ederim.

Tezimin seçim ve hazırlanmasındaki katkılarından dolayı danışman hocalarım Prof. Dr. Metin BAYRAKTAR ve Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye, laboratuvar aşamasındaki katkılarından dolayı Dr. Ebru ÖNALAN'a, örnek toplama aşamasındaki katkılarından dolayı Vet. Hek. Serhat YAŞLI, Vet. Hek. İzlem Ahmet SAYGILI ve TİGEM Ceylanpınar, Karaköy ve Sultansuyu Tarım İşletmeleri çalışanlarına, göstermiş oldukları yakın ilgi ve alaka nedeniyle çalışmalarımı gerçekleştirdiğim F.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına, çalışmalarım süresince her zaman yanımda hissettiğim başta eşim Betül GÜRSES olmak üzere tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Seleksiyon	5
3.2. Süt Verim Özellikleri	7
3.3. Leptin	7
3.3.1. Leptin'in Keşfi	7
3.3.2. Leptin'in Yapısı	8
3.3.3. Leptin Geni ve Polimorfizmleri	10
3.3.3.1. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Verim Özellikleri	13
3.3.3.1.1. Süt Verimi ve Bileşimi	13
3.3.3.1.2. Et Verimi ve Karkas Bileşimi	20
3.3.3.1.3. Döl Verimi	21
3.4. Amaç	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4.1. Kan ve Süt Örneklerinin Toplanması	23
4.2. Polimorfizmlerin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler	27
4.2.1. Makine-Teçhizat	27
4.2.2. Kimyasal Malzemeler	27
4.2.2.1. Genel Kimyasallar	27
4.2.2.2. Moleküler Biyoloji	27
4.2.2.3. Restriksiyon Enzimleri	28
4.2.2.4. Tampon Çözeltiler	28

4.2.3. Plastik Sarf Malzemeler	29
4.3. DNA İzolasyonu	29
4.3.1. İzolasyon aşamaları:	29
4.4. Polimorfizmlerin İsimlendirilmesi	31
4.5. PCR ve RFLP Optimizasyonu	32
4.5.1. Ekzon 2 - C1180T	32
4.5.2. İntron 2 - C2059T ve A2584G	37
4.5.3. Ekzon 3 – C3100T	37
4.6. PCR	41
4.6.1. Ekzon 2 - C1180T	41
4.6.2. İntron 2 - C2059T ve A2584G	41
4.6.3. Ekzon 3 – C3100T	42
4.7. RFLP	42
4.8. Agaroz Jel Elektroforezi	43
4.9. İstatistiksel Analiz	44
5. BULGULAR	47
5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	47
5.1.1. C1180T polimorfizmi	47
5.1.2. C2059T ve A2584G polimorfizmleri	48
5.1.3. C3100T polimorfizmi	49
5.2. Genotip ve Allel Frekansları	50
5.2.1. C1180T polimorfizmi	50
5.2.2. C2059T ve A2584G polimorfizmleri	51
5.2.3. C3100T polimorfizmi	52
5.2.4. Boğa Genotipleri	53

5.3. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Süt Verimi	54
5.3.1. C1180T polimorfizmi	54
5.3.2. C2059T ve A2584G polimorfizmleri	55
5.3.3. C3100T polimorfizmi	56
5.4. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Süt Bileşimi	57
5.4.1. C1180T polimorfizmi	59
5.4.2. C2059T ve A2584G polimorfizmleri	61
5.4.3. C3100T polimorfizmi	63
6. TARTIŞMA	65
6.1. Genotip ve Allel Frekansları	65
6.1.1. C1180T polimorfizmi	65
6.1.2. C2059T ve A2584G polimorfizmleri	66
6.1.3. C3100T polimorfizmi	68
6.2. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Süt Verim Özellikleri	69
6.2.1. C1180T polimorfizmi	69
6.2.2. C2059T ve A2584G polimorfizmleri	71
6.2.3. C3100T polimorfizmi	72
6.3. Sonuç	73
6.4. Öneriler	76
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ	85

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Kan ve Süt Örneklerinin Irklara Göre Dağılımı	23
Tablo 2. Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Primerler	38
Tablo 3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesimi Sonucu Farklı Genotiplere Karşılık Gelen Fragmentlerin Sayı ve Büyüklükleri	43
Tablo 4. C1180T Polimorfizmi Genotip Sayı ve Frekansları	50
Tablo 5. C1180T Polimorfizmi Allel Sayı ve Frekansları	50
Tablo 6. C2059T /A2584G Polimorfizmleri Genotip Sayı ve Frekansları	51
Tablo 7. C2059T /A2584G Polimorfizmleri Allel Sayı ve Frekansları	52
Tablo 8. C3100T Polimorfizmi Genotip Sayı ve Frekansları	52
Tablo 9. C1180T Polimorfizmi Allel Sayı ve Frekansları	53
Tablo 10. Boğa Genotipleri	54
Tablo 11. C1180T Polimorfizminin Süt Verimi Üzerine Etkisi	55
Tablo 12. C2059T/A2584G Polimorfizmlerinin Süt Verimi Üzerine Etkisi	56
Tablo 13. C3100T Polimorfizminin Süt Verimi Üzerine Etkisi	57
Tablo 14. C1180T Polimorfizminin Kültür Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi	59
Tablo 15. C1180T Polimorfizminin Yerli Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi	60
Tablo 16. C2059T/A2584G Polimorfizmlerinin Kültür Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi	61
Tablo 17. C2059T/A2584G Polimorfizmlerinin Yerli Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi	62
Tablo 18. C3100T Polimorfizminin Kültür Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi	63
Tablo 19. C3100T Polimorfizminin Yerli Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. 94 bp lik PCR Ürünlerinin <i>Kpn2I</i> Enzimi ile Kesimi	35
Şekil 2. 94 bp lik PCR Ürünlerinin <i>Kpn2I</i> Enzimi ile Kesimi Sonucu Atipik Bant Oluşumu	35
Şekil 3. 166 bp lik PCR Ürünlerinin <i>Kpn2I</i> Enzimi ile Kesimi	36
Şekil 4. 155 bp lik PCR Ürünlerinin <i>PstI</i> Enzimi ile Kesimi	36
Şekil 5. C1180T Polimorfizminin K_1 Primeri ve <i>Kpn2I</i> Enzimi ile Belirlenmesi	39
Şekil 6. C1180T Polimorfizminin K_2 Primeri ve <i>Kpn2I</i> Enzimi ile Belirlenmesi	39
Şekil 7. C1180T Polimorfizminin P_1 Primeri ve <i>PstI</i> Enzimi ile Belirlenmesi	39
Şekil 8. C2059T / A2584G Polimorfizmlerinin <i>Sau3AI</i> Enzimi ile Belirlenmesi	40
Şekil 9. C3100T Polimorfizminin <i>HphI</i> Enzimi ile Belirlenmesi	40
Şekil 10. 155 bp lik PCR Ürünlerinin <i>PstI</i> Enzimi ile Kesimi	47
Şekil 11. 1683 bp lik PCR Ürünlerinin <i>Sau3AI</i> Enzimi ile Kesimi	48
Şekil 12. 347 bp lik PCR Ürünlerinin <i>HphI</i> Enzimi ile Kesimi	49

KISALTMALAR LİSTESİ

Arg	: Arginine, Arjinin
bp	: Base Pair, Baz Çifti
BTA	: Bos taurus autosome, Bos taurus otozom
Cys	: Cysteine, Sistein
DAD-IS	: Domestic Animal Diversity Information System, Çiftlik Hayvanları Genetik Çeşitliliği Bilgi Sistemi
DAK	: Doğu Anadolu Kırmızısı
DNA	: Deoxyribonucleic Acid, Deoksiribonükleik Asit
EtBr	: Ethidium Bromide, Etidyum Bromid
FAO	: Food and Agriculture Organization, Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
kDA	: Kilo Dalton
MAS	: Marker Assisted Selection, Marker Destekli Seleksiyon
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid, Mesajcı Ribonükleik Asit
NPY	: Neuropeptide Y, Nöropeptit Y
PCR	: Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR-RFLP	: PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
QTL	: Quantitative Trait Loci, Kantitatif Karakter Lokusları
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism, Tek Nükleotid Polimorfizmi
SNF	: Solids Non Fat, Yağsız Kuru Madde
$S_{\bar{x}}$: Standart Error, Standart Hata
YK	: Yerli Kara
T_M	: Melting Temperature, Erime Sıcaklığı

TAGEM : Tarımsal Araştırmalar Genel M¼d¼rl¼ę¼
TİGEM : Tarım İşletmeleri Genel M¼d¼rl¼ę¼
UV : Ultraviolet, Ultraviyole
 \bar{X} : Aritmetik Ortalama, En K¼çük Kareler Ortalaması

1. ÖZET

Bu çalışma, Türkiye’de yetiştirilen kültür (Holştayn, Esmer ve Jersey) ve yerli (Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı) sığır ırklarında leptin geni polimorfizmlerinin belirlenmesi, polimorfizmler yönünden genotip ve allel frekanslarının tespit edilmesi ve polimorfizmlerin süt verimi ile bileşimi üzerine etkilerinin ortaya çıkartılması amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla, Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı sığırlardan toplam 480 adet kan ve süt örneği toplanmış, ayrıca kültür ırk sığırların (Holştayn, Esmer ve Jersey) verim kayıtları da temin edilmiştir. Toplanan süt örneklerinden sütün protein, yağ, laktoz, mineral madde, yağsız kuru madde oranı ve yoğunluğu tespit edilmiştir. Kan örneklerinden DNA izole edildikten sonra leptin geni ekzon 2, intron 2 ve ekzon 3 bölgelerindeki sırasıyla C1180T, C2059T-A2584G ve C3100T polimorfizmleri PCR-RFLP tekniği ile belirlenmiştir. Hayvanların polimorfizmler yönünden belirlenen genotipleri ile süt verim kayıtları ve süt bileşimi değerleri arasındaki ilişki istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Allel frekansları; C1180T polimorfizmi yönünden Holştayn ırkında C=0.625, T=0.375, Esmer ırkta C=0.625, T=0.375, Jersey ırkında C=0.539, T=0.461, Yerli Kara ırkında C=0.560, T=0.440 ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırkında C=0.600, T=0.400; C2059T/A2584G polimorfizmleri yönünden Holştayn ırkında A=0.822, B=0.084, C=0.094, Esmer ırkta A=0.675, B=0.271, C=0.104, Jersey ırkında A=0.811, B=0.189, C=0.000, Yerli Kara ırkında A=0.720, B=0.220, C=0.060 ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırkında A=0.714, B=0.271, C=0.014; C3100T polimorfizmi yönünden Holştayn ırkında C=0.653, T=0.347,

Esmer ırkta $C=0.908$, $T=0.092$, Jersey ırkında $C=0.654$, $T=0.346$, Yerli Kara ırkında $C=0.880$, $T=0.120$ ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırkında $C=0.900$, $T=0.100$ olarak tespit edilmiştir.

C1180T polimorfizminin Holştayn ve Jersey ırklarında 100 günlük süt verimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken ($P<0.05$), 200 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunmuştur. Esmer ırkta ise 100 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunmuştur. C1180T polimorfizmi T allelinin süt bileşiminde önemli bir değişikliğe neden olmaksızın laktasyonun erken döneminde süt verimini arttırdığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). C2059T/A2584G ve C3100T polimorfizmlerinin süt verimi ve bileşimi üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmazken, C3100T polimorfizmi T alleli ve C2059T/A2584G polimorfizmleri C allelinin süt verimini yükseltme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçta, leptin geni C1180T polimorfizminin laktasyonun erken döneminde süt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). C1180T polimorfizmi ile süt verimi arasındaki ilişki C1180T polimorfizminin marker destekli seleksiyon gibi genotipik seleksiyon uygulamalarında yararlı bir marker olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. C1180T polimorfizmi yönünden T allelinin seleksiyonu süt veriminin artırılması yönünde önemli bir ekonomik avantaj sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sığır Irkları, Leptin Geni Polimorfizmleri, Süt Verimi ve Bileşimi, Marker Destekli Seleksiyon, Genetik İlerleme.

2. ABSTRACT

The objective of this study was to detect leptin gene polymorphisms, to determine genotype and allele frequencies for the polymorphisms and to investigate their effects on milk yield and composition in culture (Holstein, Brown Swiss and Jersey) and native (Anatolian Black and East Anatolian Red) cattle breeds raised in Turkey.

For this purpose, a total of 480 blood and milk samples were collected from Holstein, Brown Swiss, Jersey, Anatolian Black and East Anatolian Red cattle breeds. In addition, milk production records of culture (Holstein, Brown Swiss and Jersey) cattle breeds were obtained. Protein, fat, lactose, solids, solids non-fat (SNF) contents and density were determined in collected milk samples. After DNA was extracted from the blood samples, C1180T, C2059T-A2584G and C3100T polymorphisms in exon 2, intron 2 and exon 3 were detected, respectively by PCR-RFLP technique. Association between genotypes for polymorphisms and milk yield records and milk composition was analyzed by statistical methods.

Allele frequencies for C1180T polymorphism were determined as C=0.625, T=0.375 for Holstein, C=0.625, T=0.375 for Brown Swiss, C=0.539, T=0.461 for Jersey, C=0.560, T=0.440 for Anatolian Black and C=0.600, T=0.400 for East Anatolian Red. The corresponding numbers for C2059T/A2584G polymorphisms were A=0.822, B=0.084, C=0.094 for Holstein, A=0.675, B=0.271, C=0.104 for Brown Swiss, A=0.811, B=0.189, C=0.000 for Jersey, A=0.720, B=0.220, C=0.060 for Anatolian Black and A=0.714, B=0.271, C=0.014 for East Anatolian Red. The frequencies for C3100T polymorphism were

C=0.653, T=0.347 for Holstein, C=0.908, T=0.092 for Brown Swiss, C=0.654, T=0.346 for Jersey, C=0.880, T=0.120 for Anatolian Black and C=0.900, T=0.100 for East Anatolian Red.

The effect of C1180T polymorphism on 100 days yield was found significant in Holstein and Jersey Breeds ($P<0.05$). While significance level of the effect of this polymorphism on 200 day milk yield was found as $P<0.1$ in these breeds. Similarly, the effect of C1180T polymorphism on 100 days milk yield was found as $P<0.1$ in Brown Swiss. T allele for C1180T polymorphism resulted in increasing milk yield in early lactation period without causing a change in the milk composition. The effects of C2059T/A2584G and C3100T polymorphisms on milk yield and composition were not found significant but T allele for C3100T polymorphisms and C allele for C2059T/A2584G polymorphisms appeared to have a tendency in increasing milk yield.

In conclusion, the effect of C1180T polymorphism on milk yield was found significant in early lactation period ($P<0.05$). The association between C1180T polymorphism and milk yield suggests that C1180T polymorphism might be a useful marker for genotypic selection such as marker assisted selection. Selection of T allele for C1180T polymorphism could provide considerable economic advantage for increasing milk yield.

Keywords: Cattle Breeds, Leptin Gene Polymorphisms, Milk Yield and Composition, Marker Assisted Selection, Genetic Improvement.

3. GİRİŞ

3.1. Seleksiyon

Geçtiğimiz yüzyılda, çiftlik hayvanlarının yetiştiricilik değerlerinin tahmininde geleneksel olarak fenotip ve ebeveynlerine ait bilgiler kullanılmış, genetik ilerleme fenotipik seleksiyona dayandırılmıştır (36, 83). Bazı özelliklerde fenotipik performansa dayalı önemli ilerlemeler elde edilmesine rağmen, kantitatif karakterlerde fenotipin çoğu kez genotipi iyi bir şekilde yansıtmaması ve seleksiyon için her zaman iyi bir kriter oluşturmaması nedeniyle, fenotipik performansa dayalı seleksiyon metotlarının bazı sınırlamaları zamanla daha belirgin hale gelmiştir. Kalıtım derecesi düşük, ölçülmesi zor ya da maliyetli, tek cinsiyette gözlenebilen, ileri yaşlarda ya da kesim sonrası ölçülebilen özelliklerde etkinlikleri düşmüş ve seleksiyon çok sayıda hayvandan uygun şekilde ölçülebilen özelliklerle sınırlı kalmıştır. Geleneksel seleksiyon, yaşama gücü gibi yararlı bir seleksiyon kriteri olarak hayatın ilerleyen dönemlerinde ifade edilen, süt verimi ve sütün protein içeriği gibi popülasyon içinde aralarında negatif korelasyon bulunan bazı özellikler için uygulandığında yeterince etkili olamamıştır. Dolayısıyla herhangi bir kantitatif karakterle ilgili genetik değer tahmininde doğruluk derecesi daha yüksek ve güvenilir metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (45, 78, 82).

Süt sığırlarında seleksiyon, genellikle çok sayıda gen tarafından kontrol edildiği bilinen süt verimi, sütün protein ve yağ içeriği gibi kantitatif karakterler üzerine yoğunlaşmaktadır. Kantitatif karakterlerde genetik ilerleme; bazı verim özelliklerinin sadece tek cinsiyette ölçülebilmesi, pek çok genin toplamalı etkileri sonucu ifade edilmesi ve çevre faktörlerinin bu genlerin ifadesi üzerinde önemli

etkilere sahip olması nedeniyle nispeten yavaştır. Bu durum genetik değerlendirmenin doğruluğunu kuşkusuz düşürmektedir. Ayrıca verim özelliklerinin sadece ergin hayvanlarda ölçülebilmesi sonucu generasyon aralığı uzamakta ve yıllık genetik ilerleme oranı düşmektedir (55). Bu nedenlerle kantitatif karakterlerin değerlendirilmesinde kan grupları, protein polimorfizmleri (kan serum proteinleri ve süt proteinleri) ve DNA polimorfizmleri gibi genetik değerlerin tahmininde doğruluğun arttırılmasını ve seleksiyonun erken yaşlarda uygulanabilmesini sağlayacak olanakların araştırılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır (59).

Geride bıraktığımız 30 yıllık süreçte moleküler biyolojinin gelişimi çiftlik hayvanlarının seleksiyonu ve genetik ilerlemesi için heyecan verici yeni yaklaşımlar oluşturmuştur. Farklı genotiplere ait DNA’lardaki nükleotid dizilim farklılıklarını çeşitli şekillerde ortaya koyan DNA markerleri; bireysel tanımlama, ebeveyn tayini ve genetik hastalıkların kontrolünde şimdiden yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. Fakat asıl kullanımları kalıtım derecesi düşük, ölçülmesi zor ya da maliyetli, tek cinsiyette gözlenebilen, ileri yaşlarda ya da kesim sonrası ölçülebilen özellikler için Marker Destekli Seleksiyon gibi genotipik seleksiyon uygulamaları ve bu uygulamaların gerçekleştirilebilmesi için kantitatif karakter lokuslarının belirlenmesi ve yüksek yoğunlukta genom haritalarının oluşturulması için olacaktır (38, 51, 63, 67). Moleküler tekniklerin kullanılmasıyla birlikte bugün kullanılan klasik ıslah metotlarıyla aşılamayan bazı sınırlamaların da önüne geçilebilecektir (46).

3.2. Süt Verim Özellikleri

Süt verim özellikleri çok sayıda gen ve çevre faktörleri tarafından kontrol edilen kantitatif karakterlerdir. Bu karakterleri kontrol eden genlerin dizilimlerinde meydana gelen değişiklikler hem hayvanın performansını hem de damızlık değerini değiştirebilmektedir (61).

Süt verimi yönünde yetiştirilen sığırlar üzerinde yapılan moleküler çalışmalarda süt verimi, sütün protein ve yağ içeriğinden sorumlu lokuslar hayli fazla ilgi toplamıştır (63). Öncelikle, Ron ve ark. (73), süt ve protein veriminden sorumlu QTL'nin BTA 21. kromozom üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Georges ve ark. (33), süt ve protein verimini BTA 1. kromozom, süt verimi, yağ ve protein oranını BTA 6. kromozom, yağ ve protein verimini BTA 9. kromozom, yağ verimini BTA 10. kromozom ve protein oranını BTA 20. kromozom üzerinde muhtemel 5 bölgeyle ilişkilendirmişlerdir. Bu çalışmaları, Lindersson ve ark. (60) tarafından süt verim özelliklerinin BTA 4. kromozomla, Coppieters ve ark. (25) tarafından süt veriminin BTA 14. kromozomla ilişkilendirilmesi izlemiştir. Son yıllarda, Ashwell ve ark. (11), yağ verimi ve yağ oranından sorumlu QTL'nin BTA 3. kromozom, Nielsen ve ark. (68), protein oranından sorumlu QTL'nin BTA 6. kromozom üzerinde olduğunu bildirmiştir. Ayrıca süt verimi ve sütçü form ile ilişkili yapısal özellikler BTA 27. kromozom üzerinde tespit edilmiştir (10, 80).

3.3. Leptin

3.3.1. Leptin'in Keşfi

Leptinin keşfi, 1950 yılında Amerika Birleşik Devletleri Maine Eyaleti Bar Harbor'da bulunan Jackson laboratuvarındaki araştırmacıların obez, letarjik,

insüline dirençli ve sürekli aç bir fare tipini bildirmeleri ile başlamış ve bu fareler ob/ob olarak adlandırılmıştır. 1970’li yıllarda Jackson laboratuvarında Douglas Coleman’ın yürüttüğü bir dizi deneyler fareler arasında obezite ve tip 2 diyabete neden olan bir “tokluk faktörü” olduğunu ileri sürmesine neden olmuştur. Coleman’ın “tokluk faktörü” nün bilimsel açıklaması 1994 yılında New York Rockefeller Üniversitesi’nden Jeffrey Friedman ve arkadaşlarının ob/ob farelerde obeziteden sorumlu mutant ob genini bulması ile anlaşılmıştır. Bir sonraki yıl Friedman ve arkadaşları normal obez gen ürününü izole etmişler ve protein yapıdaki bu hormonu Yunanca ince-zayıf anlamına gelen “leptos” kelimesinden yola çıkarak “leptin” olarak adlandırmışlardır (8, 9, 24, 32, 84).

3.3.2. Leptin’in Yapısı

Leptin, temel olarak yağ dokudan sentezlenen protein yapıda bir hormondur (32, 84). Ayrıca iskelet kasları, mide, plasenta ve fetal dokulardan da salgılanır (31). Obez (ob) geni tarafından 167 aminoasitlik bir polipeptit olarak sentezlenir, fakat 21 amino asitlik sinyal peptit kısmı ayrılarak 146 amino asit ve 16 kDA ağırlığında bir protein olarak kan dolaşımına geçer. Hipotalamusta kendine özgü reseptörlere bağlanarak, iştah, enerji metabolizması, vücut ağırlığı ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar (13, 17, 32, 40, 43, 84).

Leptin, hipotalamustaki reseptörleri aracılığıyla iştah ve enerji tüketimini etkiler (2, 37). Leptin iştahı baskımlarken, enerji tüketimini artırır ve vücut ağırlığını azaltır. Hipotalamik nörotransmitter NPY iştahı ve enerji depolanmasını arttıran güçlü bir uyarıcıdır (14, 39, 70). Leptin hipotalamusta NPY nöronlarının

lokalize olduğu reseptörle bağlanır, NPY salgılanmasını inhibe ederek iştahı baskılar ve enerji tüketimini artırır (1, 47, 62).

Plazma leptin seviyesini etkileyen başlıca faktörler vücuttaki yağ miktarı ve enerji dengesidir (16). Sığır ve koyunlarda plazma leptin seviyesi vücuttaki yağ miktarı ve enerji dengesinin artışına paralel olarak artmaktadır (15, 27, 29).

Liefers ve ark. (57), süt ineklerinde gebeliğin son ve laktasyonun ilk dönemlerindeki leptin konsantrasyonundaki dalgalanmanın yem tüketimi, enerji dengesi, canlı ağırlık, süt verimi ve bileşimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada, plazma leptin konsantrasyonunun gebeliğin son dönemlerinde oldukça yüksek olduğunu, doğuma yaklaştıkça hızlı bir şekilde azalarak doğumda minimum seviyeye düştüğünü, doğumdan kısa bir süre sonra yükselme görüldüğünü fakat çok geçmeden doğumdaki minimum seviyesine tekrar düştüğünü ve doğumdan en az 70 gün sonrasına kadar bu düşük seviyede kaldığını, laktasyon döneminde leptin konsantrasyonunun enerji dengesini yansıttığını, laktasyon döneminde negatif enerji dengesindeki ineklerde plazma leptin konsantrasyonunun daha düşük olduğunu, bu ineklerin pozitif enerji dengesindeki ineklerle karşılaştırıldığında genellikle daha fazla süt verme, daha az yem tüketme ve daha düşük canlı ağırlıkta olma eğiliminde olduklarını bildirmişlerdir.

Santos-Alvarez ve ark. (75), süt sığırlarında buzağılamadan önce artan vücut kondisyonunun laktasyon döneminde süt verimini desteklemek için enerji depoları oluşturduğunu, fakat yine de süt sığırlarının laktasyonun ilk dönemlerinde yüksek süt verimine karşın gebeliğin fiziksel ve hormonal

olumsuz etkileri sonucu düşük düzeyde yem tüketmeleri nedeniyle negatif enerji dengesinde olduklarını bildirmişlerdir.

Buchanan ve ark. (21), gebeliğin olumsuz etkileri nedeniyle yem alımının sınırlandığı laktasyonun ilk dönemlerinde yüksek süt veriminin devam ettirilebilmesi için kuru dönemde vücutta yağ depolanmasının oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir.

3.3.3. Leptin Geni ve Polimorfizmleri

Sığır genomu 29 çift otozomal ve 2 adet cinsiyet kromozomu olmak üzere toplam 60 kromozomdan meydana gelmektedir. X kromozomu hariç tüm kromozomlar akrosentriktir (81).

Sığırlarda leptin geni 4. kromozom (4q32) üzerinde lokalize olmuştur (71, 72). Gen 2 intron ve 3 ekzondan oluşmaktadır. Genin sadece ekzon 2 ve ekzon 3 bölgeleri protein kodlamasına katılmaktadır. Ekzon 2 ve ekzon 3 bölgelerinden oluşan 501 nükleotid büyüklüğündeki bölge leptin proteinini kodlamaktadır (41).

Sığırların leptin genine olan ilgi son yıllarda oldukça artmıştır. Konfortov ve ark. (49), geninin ekzon ve intron bölgelerinden oluşan 1788 baz çiftlik fragmentini sekanslamış ve toplamda 20 polimorfizm tespit etmişlerdir. Bu polimorfizmler BovMap veri tabanında da listelenmiştir (7). Leptin geninin ekzon 2 bölgesinde 2 RFLP belirlenmiştir: *ClaI* (bir aminoasitin tirozinden fenilalanine dönüşmesine yol açan A/T baz değişikliği) (54) ve *Kpn2I* (bir aminoasitin argininden sisteine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) (20). Genin ekzon 3 bölgesinde de 2 farklı RFLP tespit edilmiştir: *NruI* (bir aminoasitin valinden alanine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) (54) ve *HphI* (bir aminoasitin

alanından valine dönüşmesine yol açan C/T baz değişikliği) (35). Ayrıca intron 2 bölgesinde *Bsa*AI (58) ve *Sau*3AI (72) polimorfizmleri tespit edilmiştir.

Lindersson ve ark. (60), BTA 4. kromozom üzerinde leptin geni ve serum amilaz-1 geni yerleşim bölgesinde süt verim özelliklerini etkileyen bir QTL olduğunu bildirmişlerdir. Leptin geni sığırlarda et verimi (20), süt verimi (21, 79), döl verimi (34) gibi farklı verim özellikleri üzerine etkili muhtemel bir QTL olarak da kabul edilmektedir. Genin, et sığırlarında karkas bileşimi, süt sığırlarında süt ve protein verimleriyle ilişkileri de tespit edilmiştir (20, 21).

Choudhary ve ark. (23), *Bos taurus* (Holştayn ve Jersey), *Bos indicus* (Hariana, Sahiwal, Gir ve Nimari) ve *Bos taurus* x *Bos indicus* (1/2 Holştayn x 1/2 Hariana) melezi toplam 403 sığır üzerinde yaptıkları çalışmada leptin geni intron 2 bölgesindeki *Bsa*AI polimorfizminin hem *Bos taurus* hem de *Bos indicus* sığırlarda görülmesine rağmen ekzon 2 bölgesindeki *Kpn*2I polimorfizminin sadece *Bos taurus* sığırlarda görüldüğünü öne sürmüşler ve *Kpn*2I polimorfizmi allel frekanslarını Holştayn ırkında C=0.60, T=0.40, Jersey ırkında C=0.44, T=0.56 ve Hoştayn x Hariana (*Bos indicus*) melezlerinde C=0.82, T=0.18 olarak tespit etmişlerdir. Holştayn ırkına göre Hoştayn x Hariana melezlerinde C allelinin frekansının arttığını belirterek, Hariana ırkının melezlerde wild type C allelinin frekansını arttırdığını bildirmişlerdir.

Dandapat ve ark. (26), 30 *Bos indicus* (Sahiwal) ve 70 *Bos taurus* x *Bos indicus* (Jersey x Holştayn x Sahiwal) melezi sığırın leptin geni ekzon 3 bölgesindeki *Hph*I polimorfizmi yönünden genotiplerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında, *Bos indicus* Sahiwal ırkı sığırlarda *Hph*I

polimorfizmini testip edememişler ve *HphI* polimorfizmi yönünden Sahiwal ırkının monomorfik olduğunu bildirmişlerdir. Bos taurus x Bos indicus (Jersey x Holştayn x Sahiwal) melezlerinde ise genotip frekansını CC=0.57, CT=0.36, TT=0.07 ve allel frekansını C=0.75 ve T=25 olarak tespit etmişlerdir.

Jawasreh ve ark. (42), Ürdün'de 45 Holştayn ve 36 Yerli ırktan oluşan toplam 81 sığır üzerinde leptin geni intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* (*BfuCI*) polimorfizmi yönünden genotiplerini belirledikleri çalışmalarında, genotip frekansını Ürdün Holştaynlarında AA=0.619, AB=0.309, BB=0.071, yerli ırkta AA=0.629, AB=0.296, BB=0.074 ve allel frekanslarını Ürdün Hoştaynlarında A=0.774, B=0.226, yerli ırkta A=0.777, B=0.223 olarak tespit etmişlerdir.

Özbatak ve ark. (69), Güney Anadolu Kırmızısı, Doğu Anadolu Kırmızısı ve Boz ırk sığırlarda leptin geni polimorfizmlerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, her ırktan 40 baş olmak üzere toplam 120 sığırın leptin geni ekzon 2, intron 2 ve ekzon 3 bölgelerindeki sırasıyla *Kpn2I*, *Sau3AI* ve *HphI* polimorfizmleri yönünden genotiplerini belirlemişlerdir. Allel frekanslarını *Kpn2I* polimorfizmi yönünden Güney Anadolu Kırmızısında C=42.50, T=57.50, Doğu Anadolu Kırmızısında C=48.75, T=51.25 ve Boz ırkta C=55.00, T=45.00; *Sau3AI* polimorfizmi yönünden Güney Anadolu Kırmızısında A=72.50, B=18.75, C=8.75, Doğu Anadolu Kırmızısında A=71.25, B=26.25, C=2.50 ve Boz ırkta A=67.50, B=30.00, C=2.50; *HphI* polimorfizmleri yönünden Güney Anadolu Kırmızısında C=11.25, T=88.75, Doğu Anadolu Kırmızısında C=13.75, T=86.25 ve Boz ırkta C=11.25, T=88.75 olarak tespit etmişlerdir.

3.3.3.1. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Verim Özellikleri

3.3.3.1.1. Süt verimi ve Bileşimi

Buchanan ve ark. (21), et sığırlarında artan yağ depolanması ve yağ dokuda daha yüksek seviyede leptin mRNA'sı ilişkili olduğu bilinen leptin geni ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizminin, süt sığırlarında süt verim özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla 416 Holştayn ineğin genetik ve laktasyon verilerini karşılaştırarak yaptıkları çalışmada, tüm laktasyon dönemi boyunca TT genotipli ineklerin CC genotiplilere göre günlük 1.5 kg, TC genotipli ineklerin CC genotiplilere göre günlük 0.91 kg fazla süt verdiğini bildirmişlerdir. Laktasyonun ilk 100 günlük döneminde TT genotipli ineklerin CC genotiplilere göre günlük 2.44 kg, TC genotipli ineklerin CC genotiplilere göre günlük 1.74 kg fazla süt verdiğini; laktasyonun 100-200. günleri arası bu farkın TT genotipli ineklerde 1.74 kg'a, TC genotipli ineklerde 1.38 kg'a ve laktasyonun 200. gününden sonraki dönemde TT genotipli ineklerde 0.24 kg'a, TC genotipli ineklerde 0.22 kg'a kadar düştüğünü tespit etmişlerdir. TT genotipli ineklerin tüm laktasyon boyunca sütün yağ ya da protein içeriğini önemli derecede değiştirmeksizin, CC genotipli ineklere göre günlük ortalama 1.5 kg daha fazla süt verdiklerini, leptin genindeki SNP'nin süt verimine etkisinin laktasyonun özellikle ilk 100 günlük döneminde daha belirgin olduğunu ortaya koymuşlardır. Laktasyon dönemi boyunca TT genotipli ineklerin süt protein miktarlarındaki artışı (43 g/gün) da önemli düzeyde bulmuşlardır. Özellikle laktasyonun ilk 100 günündeki artışı (TT=72 g/gün, TC=50 g/gün, P<0.02), 100-200. günlere (TT=47 g/gün, TC=37 g/gün, P<0.08) göre daha belirgin bulmuşlar ve yağ içeriğindeki azalmanın ise önemli düzeyde

olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmalarında leptin geninin sadece Holştayn ırkı inekler üzerindeki etkilerini ölçmelerine rağmen tüm sütçü ırklarda arzu edilen T allelinin değişik frekanslarda (Holştayn ırkında T=0.46 C=0.54; Ayrshire ırkında T= 0.62 C=0.38; Esmer ırkta T=0.45 C=0.55; Canadienne ırkında T=0.11 C=0.89; Guernsey ırkında T=0.06 C=0.94; Jersey ırkında T=0.53 C=0.47) bulunduğu da işaret etmişlerdir. Sonuçta, TT genotipinin sütün yağ miktarını değiştirmeksizin süt verimi ve protein verimindeki artışla ilişkili olduğunu ve T alleli bakımından homozigot hayvanların göstermiş olduğu süt verimi üstünlüğünün ekonomik yönden büyük önem taşıdığını öne sürmüşlerdir.

Sadeghi ve ark. (74), 134 İran Holştaynı boğada leptin geni ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizminin süt verim özellikleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, genotip frekansını CC=0.366, CT=0.418, TT=0.216 ve allel frekansını C=0.575 ve T=0.425 olarak tespit etmişlerdir. TT genotipinin CT ve CC genotiplilere göre daha yüksek süt, protein ve yağ verimine sahip olduğunu, CC genotipinin ise CT ve TT genotiplerine göre süt protein oranının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (P<0.05). Leptin geni ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizmi ile süt verim özellikleri arasındaki ilişkinin genotipik seleksiyon uygulamalarında marker olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Alashawkany ve ark. (3), leptin geni ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* (*Bsp13I*) polimorfizmini süt verimi ve reproduktif özellikler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla 161 İran Holştaynı inek üzerinde yaptıkları çalışmada, T allelinin süt verimini önemli derecede etkilediğini, bu etkinin özellikle laktasyonun 60-100

günlük döneminde belirgin olduğunu ($P<0.028$), TT genotipli hayvanların laktasyonun 60-100 günlük dönemde CC genotipli hayvanlara göre günlük 1.6 kg fazla süt vermesine karşın T allelinin 305 günlük süt verimine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Leptin geninin ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizmi sonucu bir aminoasitin argininden sisteine dönüşmesi bazı fonksiyonel değişikliklere yol açmaktadır. Bu durumun leptin molekülünün alfa heliks yapısında sistein bulunmasının, hormonun reseptörlerine bağlanmasını olumsuz etkilemesinden ya da leptin molekülünde fazladan eşleşmemiş bir sistein bulunmasının hormonun biyolojik fonksiyonları açısından kritik öneme sahip 2 sistein arasındaki disülfid bağın dengesini bozma ihtimalinden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Sonuç itibariyle C alleli bakımından homozigot hayvanlarda, yapısında arginin bulunan leptin hipotalamustaki reseptörler tarafından rahatlıkla tanınabilmekte ve kandaki konsantrasyonunun yüksek olması durumunda iştahı baskılayıp, metabolizmayı hızlandırmaktadır. T alleli bakımından homozigot hayvanlarda yapısında arginin yerine sistein bulunan leptin hipotalamustaki reseptörler tarafından daha zor tanınmakta ve iştah sınırlı olarak baskılanmaktadır. TC genotipli heterozigot hayvanlar normal ve tanınması zor her iki tipteki leptini de salgılayabilmektedir (6, 20). Sığırlarda leptin konsantrasyonunun yüksek olduğu gebeliğin son dönemlerinde vücut kondisyonu ve yağ depolanmasının yüksek seviyede olması, özellikle laktasyonun erken dönemlerindeki yüksek süt veriminin devam ettirilmesi açısından önemlidir (6, 20, 21, 75).

Moussavi ve ark. (65), leptin geni intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* polimorfizminin (A ve B allelleri yönünden) süt verimi, döl verimi, vücut

kondisyon skoru ve plazma glukoz seviyesi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 238 İnan Holştaynı üzerinde yaptıkları çalışmada, genotip frekansını AA=0.89, AB=0.11 ve allel frekansını A=0.947, B=0.053 olarak tespit etmişler, AA ve AB genotiplerinin 60 günlük süt verimi benzer bulmalarına karşın AB genotipinin 305 günlük süt veriminin yüksek olduğunu ($P<0.05$), B allelinin yüksek süt verimi ile birlikte döl verimi özellikleri yönünden daha iyi olma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir.

Zwierzchowski ve ark. (85), 102 Polonya Alacası inek üzerinde yaptıkları çalışmada, leptin geni intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* polimorfizmi yönünden genotip frekansını AA=0.61, AB=0.14, BB=0.04, BC=0.01, AC=0.20 ve allel frekansını A=0.79, B=0.11, C=0.10 olarak tespit etmişler, polimorfizmlerin süt verimine etkisini önemsiz bulurken, sütün yağ, protein, laktoz oranına etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Sütün yağ, protein ve laktoz oranı yönünden genotiplerin AC>AA>AB şeklinde sıralandığını, AC genotipli hayvanların günlük süt yağı, protein ve laktoz veriminin AA ve AB genotipli hayvanlardan yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir.

Liefers ve ark. (56), iki farklı sürüden toplam 595 Holştayn ineğin leptin geni intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* ve ekzon 3 bölgesindeki *HphI* polimorfizmlerinin laktasyonun ilk 15 haftasında süt verim özellikleri, canlı ağırlık ve yem tüketimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada, *Sau3AI* polimorfizmi açısından AA ve AB genotipleri arasında süt verimi, protein verimi, laktoz verimi ve yem tüketimi arasındaki farklılıkları önemli bulmuşlar, AB genotipli hayvanların AA genotiplilere göre günlük 1.23 ila 1.32 kg arasında daha fazla süt verdiklerini, günlük 0.73 kg daha fazla yem

tükettiklerini, günlük 0.39 kg daha fazla kuru madde alma eğiliminde olduklarını ve laktasyonun 15. haftasında ortalama 9.1 kg daha ağır olduklarını ortaya koymuşlardır. AB genotipinin süt verimi üstünlüğünü kuru madde alımı yönünden değerlendirdiklerinde, AA genotipine göre 0.39 kg/gün fazla kuru madde alımının 0.36 kg/gün'lük süt verimi artışına karşılık gelmesi gerekirken AB genotipinin 0.96 (1.32-0.36) kg/günlük fazla süt veriminin negatif enerji dengesi, daha düşük canlı ağırlık ve yemden daha iyi yararlanma gibi diğer kaynaklardan karşılanması gerektiğini, fakat yüksek süt verimine karşın AB genotipinin şaşırtıcı şekilde daha ağır ve daha az negatif enerji dengesinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun, AB genotipli hayvanların daha fazla yem tüketmesi ve daha az bazal enerji kullanmasına neden olan düşük leptin konsantrasyonuna sahip olmalarından ya da yemi daha iyi değerlendirmelerinden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Sonuçta *Sau3AI* polimorfizminin süt verimiyle ilişkili olduğunu, fakat aynı zamanda yem tüketimi ve canlı ağırlığı da etkilediğini, *HphI* polimorfizminin ise sütün yağ oranını etkilediğini ve *Sau3AI* polimorfizmi yönünden B allelinin enerji dengesi ve dölverimini negatif etkilemeksizin süt verimini arttırdığını bildirmişlerdir.

Madeja ve ark. (61), leptin geni üzerindeki *Kpn2I*, *HphI* ve *Sau3AI* polimorfizmlerinin süt verimi üzerine öne sürülen etkilerini kontrol etmek amacıyla 117 Polonya alacası boğa üzerinde yaptıkları çalışmada ekzon 3 bölgesindeki *HphI* polimorfizminin süt ve protein verimini önemli derecede etkilediğini, TT genotipli hayvanların süt ve protein verimi açısından yaklaşık 2 kat daha fazla damızlık değerine sahip olduklarını ve bu genotipteki hayvanların

yağ veriminin de yüksek olma eğiliminde olduğunu bildirmişler ve diğer iki polimorfizm ile ilgili bir etkiye rastlayamamışlardır.

Kulig H. (52), leptin geninin ekzon 3 bölgesindeki *HphI* ve intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* polimorfizm kombinasyonları (*HphI* / *Sau3AI*) ile süt verim özellikleri (süt verimi, yağ verimi, protein verimi, yağ oranı ve protein oranı) arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla 5 farklı çiftlikte yetiştirilen, farklı oranlarda Holştayn genotipi taşıyan (ortalama %68), en az bir laktasyon dönemini tamamlamış 860 inek üzerinde yaptığı araştırmada genotip kombinasyonları (*HphI* / *Sau3AI*) ile süt, protein ve yağ verimi arasındaki ilişkiyi önemli bulmuş ($P \leq 0.01$) ve bu verim özelliklerinin CC/BB genotipli hayvanlarda daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Leptin geninin ekzon 3 bölgesindeki *HphI* ve intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* polimorfizlerinin süt verimi, sütün protein ve yağ içeriği yönünden moleküler marker olarak kullanılabileceğini öne sürmüştür.

Kulig ve ark. (53), leptin geni intron 2 bölgesindeki *Sau3AI* ve ekzon 3 bölgesindeki *HphI* polimorfizmlerinin süt verim özellikleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla 19 babadan gelen 181 Jersey üzerinde yaptıkları çalışmada, genotip frekanslarını *HphI* polimorfizmi yönünden CC=0.52, CT=0.40, TT=0.08, *Sau3AI* polimorfizmi yönünden CC=0.30, CT=0.57, TT=0.13, allel frekanslarını *HphI* polimorfizmi yönünden C=0.72, T=0.28, *Sau3AI* polimorfizmi yönünden C=0.59, T=0.41 olarak tespit etmişler ve *HphI* polimorfizminin süt, protein ve yağ verimini önemli derecede etkilediğini ve süt verim özellikleri yönünden C allelinin üstün olduğunu bildirmişlerdir. *Sau3AI* polimorfizmi ile süt verim özellikleri arasında herhangi bir ilişki tespit edememişlerdir. Jersey ırkında *HphI* polimorfizmi yönünden CC ve CT genotipli hayvanların seleksiyonunun süt

verimi, yağ ve protein veriminin arttırılmasına katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, İngiltere ve Brezilya'da faaliyet gösteren ticari Igenity Test Servisi, IGENITY-L test adı verilen bir test yardımıyla leptin geni üzerindeki C/T baz değişikliğini moleküler olarak belirleyerek, hayvanları taşıdıkları genetik yapıya (CC, TC ve TT) göre sınıflandırabilmektedir. Test Servisi 416 sağmal inek üzerinde yapılan araştırma verilerine dayanarak tüm laktasyon dönemi boyunca TT genotipli ineklerin CC genotiplilere göre günlük 1.5 kg daha fazla süt verdiğini ve özellikle ineklerin negatif enerji dengesinde oldukları laktasyonun ilk 100 günlük döneminde süt verimi üstünlüğünün daha belirgin olduğunu öne sürmektedir. Süt verimi üstünlüğünü, TT genotipli hayvanların CC genotiplilere göre hipotalamus tarafından daha zor tanınan bir leptin yapısına sahip olmasına bağlayarak, leptin konsantrasyonunun yüksek olduğu gebeliğin son dönemlerinde iştahın daha az baskılanması ve metabolizmanın yavaşlaması sonucu vücut kondüsyonu ve yağ rezervlerinin artması ve bu rezervlerin laktasyonun erken dönemlerinde yüksek süt verimi için kullanılması esasına dayandırmaktadır. Yetiştiricilerin kuyruk ucundan aldıkları 20-30 adet kıl örneğini laboratuvara göndererek uyguladıkları test, A.B.D, Kanada, İngiltere ve Brezilya'daki yetiştiricilere buzağılık döneminden itibaren hem inek hem de boğalar üzerinde süt verimi yönünde genotipik seleksiyon uygulama imkânını sunmaktadır (6).

3.3.3.1.2. Et Verimi ve Karkas Bileşimi

Buchanan ve ark. (20), 4 farklı etçi sığır ırkından oluşan (Angus, Hereford, Simental ve Şarole) toplam 154 boğa üzerinde leptin geninin ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizmini PCR-RFLP yöntemiyle tespit etmek ve *Kpn2I* polimorfizminin et sığırlarında karkas yağlanması üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, T allelini artan yağ depolanması ve yağ dokuda daha yüksek seviyede leptin mRNA'sı ile ilişkili bulmuşlar ve aynı genetik varyasyonun süt sığırlarında da mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Erken gelişme özellikleriyle tanınan Britanya ırklarının (Angus, Hereford) daha yüksek oranda T alleli taşımalarına karşın Avrupa ırklarının (Simental, Şarole) ağırlıklı olarak C alleli taşıdıklarını ortaya koymuşlardır.

Schenkel ve ark. (77), et sığırları üzerinde yaptıkları araştırmada leptin geni *Kpn2I* polimorfizmi yönünden allel frekanslarını Angus ırkında C=0.454, T=0.546, Limozin ırkında C=0.517, T=0.483, Şarole ırkında C=0.546, T=0.454, Simental ırkında C=0.588, T=0.412 olarak tespit etmişler ve C allelinin karkas yağlanmasında azalma ve yağsız et miktarında artış, T alelinin karkas yağlanmasında artış ve yağsız et miktarındaki azalma ile ilişkili olduğunu ve artan yağ miktarının kaslar arasında dağılmadığını bildirmişlerdir.

Kononoff ve ark. (50), Avrupa ve Britanya orijinli 1577 baş melez et sığırı üzerinde leptin geni *Kpn2I* polimorfizminin karkas verimi, karkas kalitesi ve karkas ağırlığı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada *Kpn2I* polimorfizmi yönünden genotip frekanslarını CC=0.248, CT=0.507, TT=0.245 olarak tespit etmişler ve Kanada karkas kalite değerlendirme sistemine göre TT genotipli karkasların CT ve CC genotipli karkaslara göre sırasıyla % 7.6 ve % 7.1

daha yüksek oranda AAA veya daha yüksek değerlendirme notu ile sınıflandırıldığını ve TT genotipli karkasların CT ve CC genotiplilere göre daha yüksek oranda yağ içerdiğini bildirmişlerdir.

3.3.3.1.3. Döl Verimi

Brickell ve ark. (19), İngiltere’de 18 farklı sürüden toplam 385 Holştayn düve üzerinde leptin geni polimorfizmlerinin perinatal mortalite üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ekzon 2 bölgesindeki *Kpn2I* polimorfizmi yönünden genotip frekansını CC=0.35, CT=0.48, TT=0.17 ve allel frekansını C=0.59 ve T=0.41 olarak tespit etmişlerdir. İlk doğumda C alleli yönünden homozigot bireylerin perinatal mortalite oranının T alleli yönünden homozigot bireylere göre 2 kat daha düşük olduğunu belirtmişler ve süt verimi yönünden üstün T alleleline sahip bireylerin seleksiyonu ile sürünün ilk doğumdaki perinatal mortalite oranının yükselebileceğini bildirmişlerdir.

Komisarek ve Antkowiak (48), 219 Jersey inekte leptin geni polimorfizmlerinin döl verimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında, allel frekanslarını *Kpn2I* polimorfizmi yönünden C=0.80 ve T=0.20, *HphI* polimorfizmi yönünden C=0.67 ve T=0.33 olarak tespit etmişler ve *HphI* polimorfizmi yönünden TT genotipine sahip ineklerin buzağılama aralığı ve servis periyodunun CC ve CT genotipine sahip ineklere göre daha kısa olduğunu, aynı zamanda TT genotiplilerde gebelik başına tohumlama sayısının da diğer genotiplere oranla daha düşük olduğunu bildirmişler ve *Kpn2I* polimorfizminin döl verimi üzerine etkisini önemsiz bulmuşlardır.

3.4. Amaç

Bu çalışma, Türkiye’de yıllık süt üretiminin büyük bir bölümünü karşılayan kültür ırk sığırların (Holştayn, Esmer, Jersey) ve gen kaynakları olarak kabul edilen yerli ırk sığırların (Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı) leptin geni polimorfizmlerinin belirlenmesi, polimorfizmler yönünden sahip oldukları genetik yapı ve allel frekanslarının tespit edilmesi, polimorfizmlerin kültür ırk sığırlarda süt verimi ve bileşimi (protein, yağ, laktoz, kuru madde, yağsız kuru madde oranları ve yoğunluğu), yerli ırk sığırlarda süt bileşimi üzerine etkilerinin ortaya çıkartılması amacıyla yapılmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Kan ve Süt Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada; TİGEM Ceylanpınar, Sultansuyu ve Karaköy Tarım İşletmelerinde süt verimi yönünde yetiştirilen 160 Holştayn, 120 Esmer ve 140 Jersey ırkı sağmal inekten, TAGEM Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen 35 Doğu Anadolu Kırmızısı ve İç Anadolu Bölgesinde halk elinde yetiştirilen 25 Yerli Kara ırkı sağmal inekten kan ve süt örneği toplanmıştır. Ayrıca leptin geni polimorfizmlerinin boğalarda da belirlenebilmesi amacıyla Tarım İşletmelerinde yetiştirilen kültür ırk 10 boğadan kan örneği alınmıştır. Boğalardan alınan kan örnekleri ile birlikte çalışma kapsamında toplam 490 adet kan örneği ve 480 adet süt örneği toplanmıştır. Toplanan kan ve süt örneklerinin ırklara göre dağılımı Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kan ve Süt Örneklerinin Irklara Göre Dağılımı

İrk	Kan	Süt
İnek		
Holştayn	160	160
Esmer İrk	120	120
Jersey	140	140
Doğu Anadolu Kırmızısı	35	35
Yerli Kara	25	25
Toplam	480	480
Boğa		
Holştayn	4	-
Esmer İrk	4	-
Jersey	2	-
Toplam	10	-
Genel Toplam	490	480

Kültür ırk sığırlardan kan ve süt örneklerinin toplanması amacıyla Esmer ırk sığırların yetiştirildiği Malatya/Akçadağ'daki Sultansuyu Tarım İşletmesi'nden, Holştayn ırkı sığırların yetiştirildiği Urfa/Ceylanpınar'daki Ceylanpınar Tarım İşletmesi'nden, Jersey ırkı sığırların yetiştirildiği Samsun/Bafra'daki Karaköy Tarım İşletmesi'nden, süt verim kayıtları düzenli olarak tutulan, buzağılama yaşı ve mevsimi birbirine yakın, sağlıklı hayvanlardan kan ve süt örnekleri toplanmıştır.

Ceylanpınar ve Karaköy Tarım İşletmelerinden kan ve süt örnekleri toplanan Holştayn ve Jersey ırkı sağmal ineklerin işletmelerin bilgisayarlı sağım sistemlerinde tutulan “doğum tarihi, buzağılama tarihi, laktasyon sayısı ve 100, 200, 305 günlük süt verimi” kayıtları dijital ortamda alınmış, ayrıca işletmelerin doğum ve laktasyon (süt kontrol) defterlerinin de birer nüshası temin edilmiştir.

Sultansuyu Tarım İşletmesinde sağım sistemi ile verilerin kaydedildiği bilgisayar arasındaki bağlantıyı sağlayan ilgili donanımın olmaması ve sağım sistemi tarafından ölçülen verilerin anlık olarak izlenebilmesine rağmen kayıt edilememesi nedeniyle kayıtlar dijital ortamda alınamamış, “doğum tarihi, buzağılama tarihi, laktasyon sayısı” gibi kayıtlar işletmenin doğum ve laktasyon defterlerinden temin edilirken, “100, 200, 305 günlük süt verimi” kayıtları 30 günlük aralıklarla yapılan kontrol sağımları sırasında, sağım sistemi tarafından ölçülen verilerin manuel olarak kaydedilmesi ile oluşturulan süt kontrol defterlerinden, Trapez yöntemi (test interval) kullanılarak hesaplanmıştır (76).

Süt verimlerinin Trapez yöntemi ile hesaplanmasında, bir denetim gününden onu izleyen denetim gününe kadar geçen süre bir denetim periyodu olarak alınmış, söz konusu iki denetimde saptanan süt verimlerinin ortalaması

alınarak o periyot içindeki gün sayısı ile çarpılmış ve o periyoda ilişkin toplam verim hesaplanmıştır. Aynı işlem tüm denetim periyotları için yapılmıştır. Laktasyonun ilk günü ile ilk denetim günü arasındaki verim, ilk denetimde saptanan süt miktarı kullanılarak hesaplanmıştır. Laktasyon süresi 305 günden uzun olduğunda, 305. günden önceki son denetimde saptanan süt miktarı kullanılarak, son denetim günü ile 305. gün arasındaki süt verimi hesaplanmıştır. Sonuçta ilgili periyotlar için hesaplanan verimler toplanarak 100, 200 ve 305 günlük süt verimleri bulunmuştur (28, 30, 44, 76).

Holştayn ve Jersey ırkı ineklerin süt verim kayıtları Ceylanpınar ve Karaköy Tarım İşletmelerinin kullandıkları Westfaliasurge (WestfaliaSurge GmbH, Bönen, Germany) sağım sisteminden temin edilirken, Esmer ırk ineklerin süt verim kayıtları Sultansuyu Tarım İşletmesinin kullandığı Delaval (Delaval International AB, Tumba, Sweden) sağım sisteminden temin edilmiştir.

Yerli ırk sığırlardan kan ve süt örneklerinin toplanması amacıyla Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı için bu sığırların koruma altında tutulduğu Erzurum/Ilıca'daki TAGEM Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden, Yerli Kara ırkı için halk elinde yetiştirildiği İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan taramalar sonucu Kırşehir ili Akçakent ilçesi Kilimli ve Yaylaözü köylerinde saf ırk karakteri gösteren, sağlıklı hayvanlardan kan ve süt örnekleri toplanmış ayrıca örnek alınan hayvanların 4 açıdan fotoğraf ve videoları çekilerek kayıt altına alınmıştır.

Yerli ırklardan kan ve süt örneklerinin toplanması esnasında hayvan sahiplerinden hayvanın yaşı, laktasyon sayısı, buzağılama yaşı ve buzağılama tarihi ile ilgili bilgiler alınmış, şüpheli durumlarda ineklerin kesici dişlerinin sayı

ve yapısı ile boynuzlarındaki halka sayısı göz önüne alınarak yaş tayini yapılmış ve hayvan sahibinin verdiği bilgilerle örtüşüp örtüşmediği kontrol edilmiştir.

Yerli ve kültür ırklardan sabah ve akşam sağımlarından 15'er ml olmak üzere toplam 30 ml süt örneği alınmıştır. Sağım ortasında steril plastik tüpler (15 ml, USA Scientific, Orlando, FL, USA) içerisine alınan süt örnekleri vakit geçirilmeden soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmıştır. Toplanan kan ve süt örneklerinin saha şartlarında ve seyahatler sırasında soğuk zincirde muhafazası için taşınabilir oto buzdolabı (Waeco Tropicool TC-35, Germany) kullanılmış, gerekli durumlarda buz kalıpları ile takviye yapılarak dolap içi ısının +4 °C'nin üzerine çıkmamasına özen gösterilmiştir.

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknoloji Anabilim Dalı laboratuvarında süt örneklerinin fiziksel ve kimyasal muayeneleri yapıldıktan sonra sütün % protein, yağ, laktoz, mineral madde, yağsız kuru madde oranları ve yoğunluğu (kg/m^3) süt analizatöründe (Lactoscan Milk Analyzer 60, Bulgaria) tespit edilmiştir.

Kan örnekleri, sığırların vena jugularis veya vena subcutanea abdominalis damarlarından 2 ml'lik EDTA'lı (Vacutainer K₂EDTA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) tüpler içerisine alınmış, soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılarak DNA izolasyonuna kadar - 20 °C de muhafaza edilmiştir. Genetik Analizler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

4.2. Polimorfizmlerin Belirlenmesinde Kullanılan Malzemeler

4.2.1. Makine-Teçhizat

Thermal Cycler (Biometra TProfessional GmbH, Goettingen, Germany)

Mikrosantrifüj (Heraeus Multifuge 3 SR, Langenselbold, Germany)

Su Banyosu (GFL 1086, Burgwedel, Germany)

Elektroforez Sistemi; Güç Kaynağı ve Tank (Consort E 815, Turnhout, Belgium)

Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Photo Print IP 008-SD, Cedex, France)

Otomomatik Mikropipetler (Eppendorf Research 2100, Hamburg, Germany)

Vorteks (Labnet VX-200, Woodbridge, NJ, USA)

Etüv (Nüve EN 400, Ankara, Türkiye)

Otoklav (Nüve OT 4060V, Ankara, Türkiye)

Hassas Terazi (AND GX-6100, San Jose, CA, USA)

Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 500, Gebze, Kocaeli, Türkiye)

Buzdolabı (Beko BK 7250 T, Gebze, Kocaeli, Türkiye)

Derin Dondurucu (Arçelik 2041 D, Gebze, Kocaeli, Türkiye)

4.2.2. Kimyasal Malzemeler

4.2.2.1. Genel Kimyasallar

Etil Alkol (Merck, Frankfurt, Germany)

İzopropil Alkol (Merck, Frankfurt, Germany)

Borik Asit (Merck, Frankfurt, Germany)

EDTA (Merck, Frankfurt, Germany)

Tris HCL (Merck, Frankfurt, Germany)

4.2.2.2. Moleküler Biyoloji

DNA İzolasyon Kiti (Wizard Genomic #A1125, Promega, Madison, WI, USA)

Taq DNA Polimeraz (Fermentas #EP0402, Vilnius, Lithuania)

MgCl₂ (25mM) (Fermentas #EP0402, Vilnius, Lithuania)
10X PCR Buffer (10mM) (Fermentas #EP0402, Vilnius, Lithuania)
dNTP Set (Fermentas #R0186, Vilnius, Lithuania)
Primerler, Desalting (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA)
Primerler, HPLC (Metabion GmbH, Martinsried, Germany)
Hot Start Taq DNA Polimeraz (GoTaq #M5005, Promega, Madison, WI, USA)
MgCl₂ (25mM) (GoTaq #M5005, Promega, Madison, WI, USA)
5X GoTaq Flexi Buffer (GoTaq #M5005, Promega, Madison, WI, USA)
Agaroz (Lonza SeaKem LE, Rockland, ME, USA)
Etidium Bromide S₁V₁ (Merck, Frankfurt, Germany)
Ficoll (MP Biomedicals, France)
Bromofenol Blue (Sigma, Germany)
Xylene Cyanol (Sigma, Germany)
DNA Boyut Markeri (Fermentas, GeneRuler 100 bp, Vilnius, Lithuania)
DNA Boyut Markerleri (Ambresco K180, Cochran Solon, OH, USA)

4.2.2.3. Restriksiyon Enzimleri

*Kpn*2I Restriksiyon Enzimi (10u/μl) (Fermentas #ER0532, Vilnius, Lithuania)
*Bsp*13I Restriksiyon Enzimi (10u/μl) (Vivantis #RE1186, Selangor DE, Malaysia)
*Msp*I Restriksiyon Enzimi (10u/μl) (Fermentas #ER0541, Vilnius, Lithuania)
*Pst*I Restriksiyon Enzimi (10u/μl) (Fermentas #ER0611, Vilnius, Lithuania)
*Hph*I Restriksiyon Enzimi (10u/μl) (Fermentas #ER1102, Vilnius, Lithuania)
*Sau*3AI Restriksiyon Enzimi (10u/μl) (Fermentas #ER0782, Vilnius, Lithuania)

4.2.2.4. Tampon Çözeltiler

Agaroz jel yükleme tamponu (6X, 10 ml)

1.5 gr Ficoll

25 mg Bromofenol Blue

25 mg Xylene Cyanol

ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır.

Tris-Borik Asit-EDTA Tamponu (TBE) (10X, 1 lt)

108 gr Tris HCl

55 gr Borik asit

20 ml 0.5 M EDTA

ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

EDTA Çözeltisi (0.5 M, 50 ml)

18.6 gr EDTA ddH₂O ile 50 ml'ye tamamlanır. EDTA çözülünceye kadar

NaOH eklenerek pH=8.0'e ayarlanır.

4.2.3. Plastik Sarf Malzemeler

PCR Tüpleri (1.5, 0.5 ve 0.2 ml) (USA Scientific, Orlando, FL, USA)

Pipet Uçları (mavi, sarı, beyaz) (USA Scientific, Orlando, FL, USA)

4.3. DNA İzolasyonu

Toplanan kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu DNA izolasyon kiti (Wizard® Genomic DNA Purification Kit #A1125, Promega Corp., Madison, WI, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinden genomik DNA'nın ekstrakte edilmesinde uygulanan izolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir.

4.3.1. İzolasyon aşamaları:

1. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lysis solüsyonu eklendi.
2. 300 µl kan, cell lysis solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kan ve cell lysis solüsyonununun karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.

3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi ve bu esnada da tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13.000-16.000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Tüpün alt kısmında görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakılacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar vortekslendi.
6. 300 µl nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kez pipetlendi. Visköz bir hale gelen solüsyon hücre çökeltileri çözülene kadar solüsyon 37 °C de inkübe edildi.
7. 1.5 µl Rnase solüsyonu eklendi ve tüp 2-5 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37 °C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslendi.
9. 13.000-16.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl izopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırıldı.
11. Solüsyon altüst edilerek DNA kütlesi ağ şeklinde görülünceye kadar karıştırıldı.
12. 13.000-16.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA tüpün alt kısmında küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü. DNA'ya dokunmadan en fazla 10-20 µl sıvı kalacak şekilde süpernatant pipetle dikkatlice alınarak atıldı.

13. DNA pelleti üzerine 300 µl %70 lik etanol eklendi. 13.000 - 16.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA tüpün alt kısmında küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.

14. DNA pelletine dokunmadan etanol dikkatlice alındı. Tüpün ağzı 10-15 dakika açık bırakılarak kalan alkolün buharlaşması beklendi.

15. 100 µl DNA rehidratasyon solüsyonu eklendi ve DNA'nın solüsyon içerisinde çözünmesi için oda sıcaklığında 1 gece bekletildi.

16. DNA 2 - 8 °C'de muhafaza edildi.

4.4. Polimorfizmlerin İsimlendirilmesi

Bu çalışmada, leptin geni ekzon 2, intron 2 ve ekzon 3 bölgelerindeki polimorfizmlerin isimlendirilmesinde bu 3 bölgeyi de kapsayan GenBank #U50365 erişim numaralı dizi referans alınmıştır. Referans dizideki nükleotid sırasının başına "wild" sonuna "mutant" nükleotidin baş harfleri getirilerek polimorfizmler isimlendirilmiştir. GenBank #U50365 erişim numaralı dizide 1180. nükleotidin sitozinden (C) → timine (T) dönüşmesi C1180T, 2059. nükleotidin sitozinden (C) → timine (T) dönüşmesi C2059T, 2584. nükleotidin adeninden (A) → guanine (G) dönüşmesi A2584G ve 3100. nükleotidin sitozinden (C) → timine (T) dönüşmesi C3100T olarak adlandırılmıştır.

Leptin geni ekzon 2 bölgesindeki C1180T polimorfizmi, *Kpn2I* (*Kpn2I* enzimi tanıma bölgesi oluşturarak belirlenmesi) (20), Arg25Cys (25. kodonda Arg→Cys amino asit değişikliğine yol açması) (20), R4C (proteinin 4. amino asitinde Arg→Cys amino asit değişikliğine yol açması) (48), EXON2FB veya E2FB (ekzon 2 bölgesinde Fiona BUCHANAN tarafından bildirilen bir polimorfizm olması) (12) gibi farklı isimlerle de tanınmaktadır.

Leptin geni intron 2 bölgesindeki C2059T ve A2584G polimorfizmleri, *Sau3AI* polimorfizmi (polimorfizmlerin *Sau3AI* enzimi tarafından tanınması) (72) olarak da adlandırılmaktadır.

Leptin geni ekzon 3 bölgesindeki C3100T polimorfizmi, *HphI* polimorfizmi (polimorfizmlerin *HphI* enzimi tarafından tanınması) (35), Ala59Val veya A59V (proteinin 59 amino asitinde Ala→Val amino asit değişikliğine yol açması) (48) olarak da adlandırılmaktadır.

4.5. PCR ve RFLP Optimizasyonu

Leptin geni ekzon 2, intron 2 ve ekzon 3 bölgelerindeki 94, 1820 ve 331 bp lik fragmentlerin PCR ile amplifikasyonuna sırasıyla Buchanan ve ark. (20), Pomp ve ark. (72) ve Haegeman ve ark. (35) tarafından dizayn edilen primerler kullanılarak başlanmıştır. PCR sonucu zayıf bant oluşumu, simir oluşumu ve atipik bant oluşumu gibi çeşitli PCR hataları ile karşılaşılması üzerine primerlerde bazı modifikasyonlar yapılmış, hatta bazıları tamamen değiştirilerek yeniden dizayn edilmiştir. Yeni primerlerin dizayn edilmesinde ve polimorfizmlerin isimlendirilmesinde GenBank #U50365 erişim numaralı dizi referans alınmıştır.

Her bir primer çiftinin en uygun bağlanma ısısını belirlemek amacıyla primer T_M değerlerinin 5-10 °C aşağısı ve 5 °C yukarısını kapsayacak şekilde bir çok gradient PCR denemesi yapılmış, aynı zamanda optimum reaksiyon karışımın belirlenmesi amacıyla denemelerde farklı miktar ve yoğunluklarda DNA, $MgCl_2$, Buffer, Taq, dNTP, Primer ve ddH₂O kullanılmıştır.

4.5.1. Ekzon 2 - C1180T

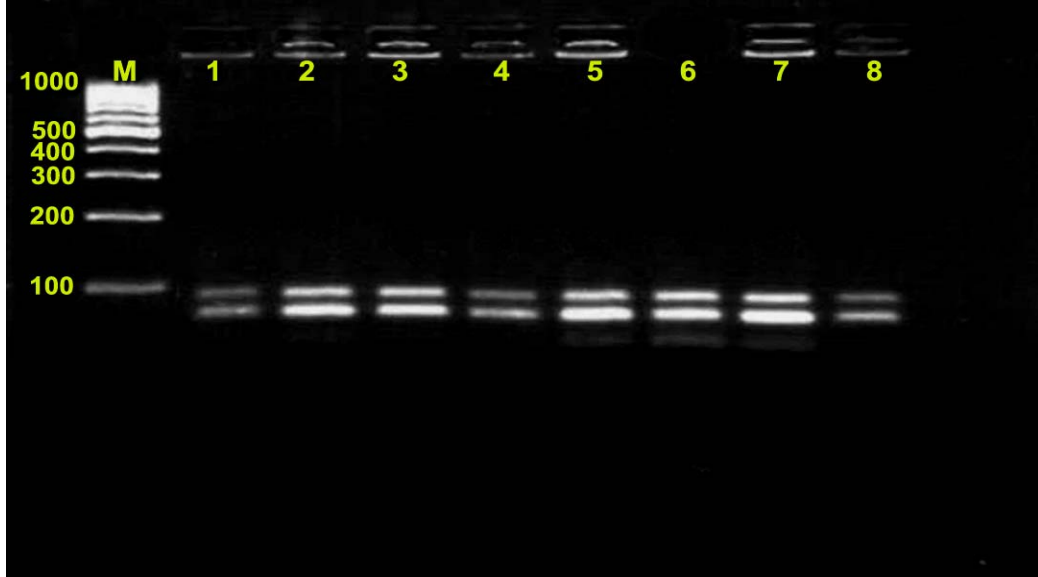
Leptin geni ekzon 2 bölgesindeki 94 bp lik fragment öncelikle Buchanan ve ark. (20) tarafından dizayn edilen primerler (Tablo 2 - K₁) kullanılarak

çoğaltılmış (Şekil 5) ve PCR ürünlerinin *Kpn2I* enzimi ile kesimi sonucu ortaya çıkan bant profillerine göre genotipler belirlenmiştir (Şekil 1). Fakat zamanla *Kpn2I* enzimi ile kesim sonucu atipik bant oluşumu problemi ile karşılaşmıştır (Şekil 2). Öncelikle problemin *Kpn2I* enziminden kaynaklandığı düşünülerek *Kpn2I* enzimi yerine aynı tanıma bölgesinden kesim yapan izoşimeri *Bsp13I* ve izoşimeri olmamasına rağmen *Kpn2I* enzimi tanıma bölgesi içinden kesim yapabilen *MspI* enzimleri kullanılmış fakat sonuç değişmemiştir. Bunun üzerine PCR setinde kullanılan maddelerin miktar ve yoğunluklarının değiştirilmesi, primer bağlanma (annealing) ısı ve süresinin değiştirilmesi, kandan tekrar DNA izole edilmesi, kontaminasyon riskine karşı tüm bu işlemlerin farklı bir laboratuvarında gerçekleştirilmesi gibi pek çok farklı yönteme başvurulmuş ve bütün bu denemeler sonucunda problemin primer çiftinden kaynakladığı tespit edilmiştir. Primerler farklı bir firmaya tekrar sentezletilmiş fakat liyofilize halde teslim edilen yeni primerler ile primerlerin sulandırıldığı ilk anda sonuç alınmasına rağmen ilerleyen periyotta primerlerin dondurulup çözülmesi ile aynı problemle tekrar karşılaşmıştır. Bunun üzerine forward primer tamamen değiştirilmiş ve reverse primerin 5' ucuna birkaç nükleotid eklenerek primer çiftinin (Tablo 2 - K₂) spesifikliğı arttırılmaya çalışılmıştır (Şekil 6). Yeni primerler ile polimorfizmin tespitinde daha iyi bir performans elde edilmesine rağmen bir süre sonra aynı problemle tekrar karşılaşılması üzerine reverse primer üzerinde Buchanan ve ark. (20) tarafından *Kpn2I* enzimi tanıma bölgesi oluşturmak amacıyla yapılan mismatch in primerin 3' ucuna çok yakın bir noktada (1 nükleotid önce) yer alması nedeniyle primerin kısa sürede degrade olduğu ihtimali üzerinde durulmuş ve Buchanan ve ark. (20) tarafından dizayn

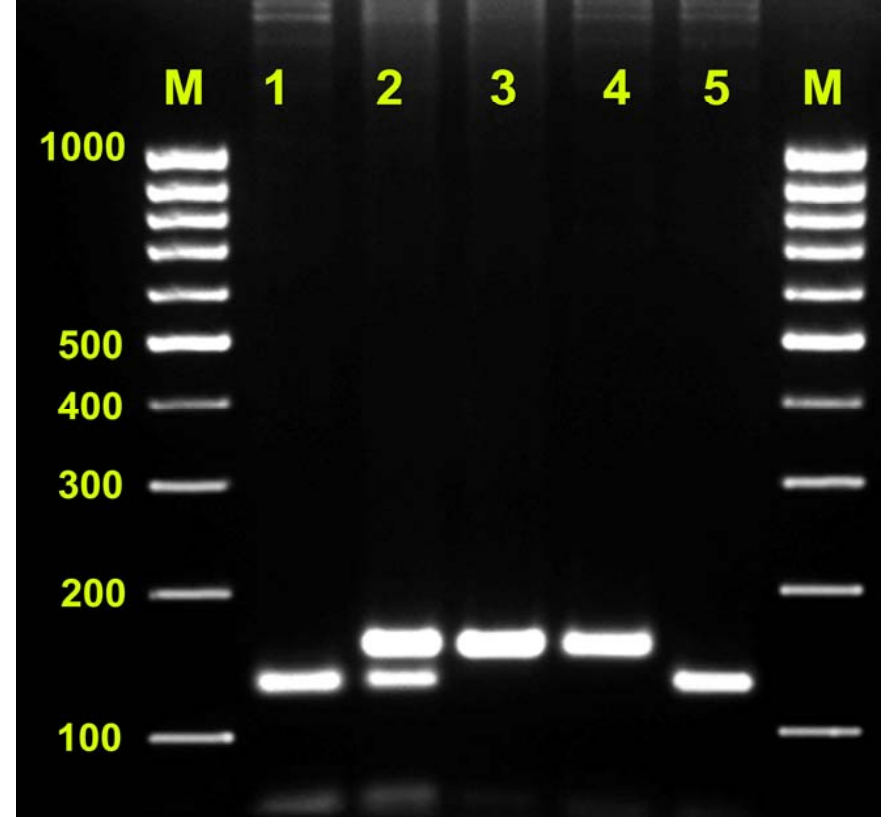
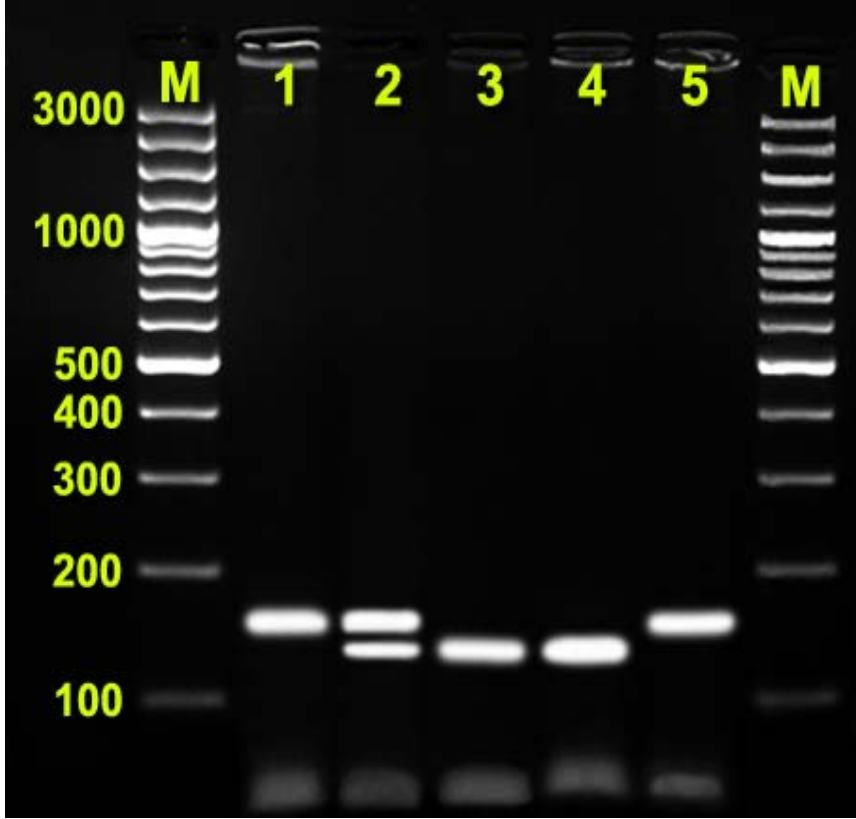
edilen primerlerin gerek çalışmaların tamamlanması gerekse tekrarlanabilirliği açısından uygun bir primer çifti olmadığı kanaatine varılmıştır. Leptin geni ekzon 2 bölgesi C1180T polimorfizminin tespit edilebilmesi için yeni bir primer çifti dizayn edilmesine, polimorfizm bölgesinin wild ve mutant baz dizisinin bilinen restriksiyon enzimleri ile kesime elverişli olmadığından restriksiyon enzimi tanıma bölgesi oluşturmak amacıyla yapılacak mismatch in primerin 3' ucundan 2-3 nükleotid önce yapılandırılmasına ve polimorfizm noktasından birkaç baz önce veya sonra yapılacak bir mismatch ile polimorfizmin tespit edilmesine olanak sağlayacak bir restriksiyon enzimi kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi sonuç reverse primerin 3' ucundan 3 nükleotid önce yapılan bir mismatch ile birlikte *PstI* enzimi kullanımı ile elde edilmiştir. *PstI* enzimi kullanımı ile birlikte forward ve reverse primerler yeniden dizayn edilmiş (Tablo 2 - P₁), mismatch in primerin 3' ucundan 3 nükleotid öne alınması mümkün hale gelmiş ve degradasyon önlenmiştir. Yeni dizayn edilen primerler (P₁) ile leptin geni ekzon 2 bölgesindeki C1180T polimorfizm alanını içeren 155 bp lik fragment başarı ile çoğaltılmıştır (Şekil 7). 155 bp lik fragmentin *PstI* enzimi ile kesimi sonucu ortaya çıkan bantların sayı ve büyüklüklerine (CC=155, CT=155+133+22, TT=133+22) göre genotipler belirlenmiştir (Şekil 4). Polimorfizmin mutant T allelini kesen *PstI* enzimi wild C allelini kesen *Kpn2I* enziminin tam tersi bir bant profili oluşturmuştur (Şekil 3 ve 4).



Şekil 1. 94 bp lik PCR Ürünlerinin *Kpn2I* Enzimi ile Kesimi. % 3'lük agaroz jel, M: 100bp DNA ladder (Fermentas SM0241). Örnek 11, 13 = T/T; 1, 3, 6, 12, 14, 15 = C/T; 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 = C/C genotipi.



Şekil 2. 94 bp lik PCR Ürünlerinin *Kpn2I* Enzimi ile Kesimi Sonucu Atipik Bant Oluşumu. % 3'lük agaroz jel, M: 100bp DNA ladder (Fermentas SM0241).



Şekil 3 ve 4. 166 bp lik PCR Ürünlerinin *Kpn2I* Enzimi ile Kesimi (sol) ve 155 bp lik PCR Ürünlerinin *PstI* Enzimi ile Kesimi (sağ). % 3'lük agaroz jel, M: 100bp DNA ladder. Örnek 1, 5 = T/T; 2 = C/T; 3, 4 = C/C genotipi.

4.5.2. İtron 2 - C2059T ve A2584G

Leptin geni intron 2 bölgesindeki 1820 bp lik fragment öncelikle Pomp ve ark. (72) tarafından dizayn edilen primerler (Tablo 2 - S₁) kullanılarak çoğaltılmış fakat PCR sonucu zayıf bant oluşumu ve atipik bant oluşumu problemleri ile karşılaşmıştır. Bölgenin 1820 bp uzunluğunda olduğu göz önüne alınarak ana bandı güçlendirmek ve atipik bantları ortadan kaldırmak amacıyla Hot Start Taq DNA Polimeraz Enzimi kullanılmıştır. Hot Start Taq DNA Polimeraz Enzimi ile daha iyi bir performans elde edilmesine rağmen 1820 bp büyüklüğündeki bant enzimle kesilecek derecede güçlendirilemediği gibi genetik değerlendirmeyi engelleyen atipik bantlar da ortadan kaldırılamamıştır. Bunun üzerine Pomp ve ark. (72) tarafından dizayn edilen primerler ile çalışmanın gerçekleştirilemeyeceği düşünülerek yeni bir primer çifti dizayn edilmesine karar verilmiştir. Çalışmalar sonucunda leptin geni intron 2 bölgesindeki C2059T ve A2584G polimorfizm alanlarını içeren 1683 bp lik fragmenti çoğaltacak nitelikte yeni bir primer çifti dizayn edilmiştir (Tablo 2 - S₂). Yeni dizayn edilen primerlerin kullanılması ile atipik bant oluşumu önlenerek 1683 bp büyüklüğündeki fragment başarı ile çoğaltılmıştır (Şekil 8).

4.5.3. Ekzon 3 – C3100T

Leptin geni ekzon 3 bölgesindeki 331 bp lik fragment Haegeman ve ark. (35) tarafından dizayn edilen primerler (Tablo 2 - H₁) kullanılarak çoğaltılmış fakat PCR sonucu zayıf bant oluşumu ve simir oluşumu problemleri ile karşılaşmıştır. Simir oluşumunun azaltılması ve bant kalitesinin yükseltilmesi amacıyla Haegeman ve ark. (35) tarafından dizayn edilen forward ve reverse primere 5-6 nükleotid eklenerek HPLC olarak sentezletilmiştir (Tablo 2 - H₂).

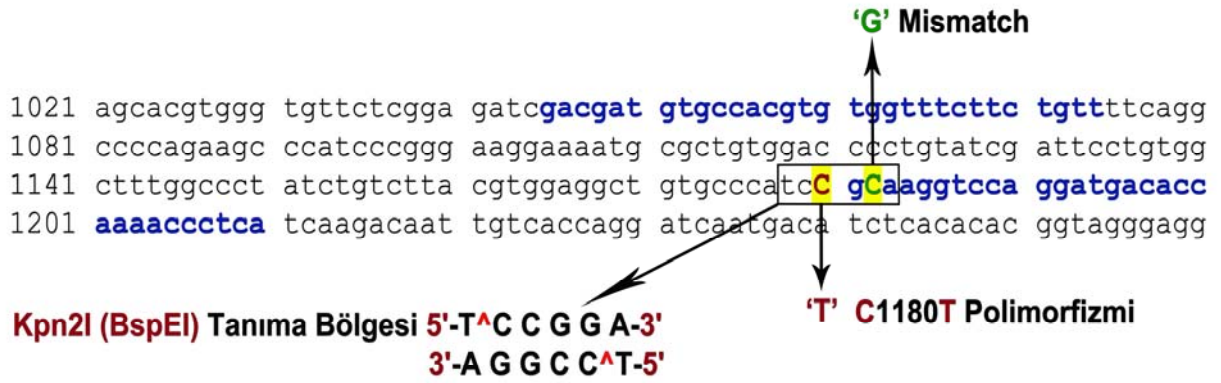
Spesifikliği arttırılan ve daha saf hale getirilen yeni primerler ile simir oluşumu önlenirken bant kalitesi de oldukça yükseltilmiştir. Yeni primerler ile 343 bp büyüklüğindeki fragment başarı ile çoğaltılmıştır (şekil 9). 343 bp büyüklüğindeki PCR ürünlerinin *HphI* enzimi ile kesimi sonucu ortaya çıkan bantların sayı ve büyüklüklerine (CC=343, CT=343+317+26, TT=317+26) göre genotipler belirlenmiştir.

Tablo 2. Polimorfizmlerinin Belirlenmesinde Kullanılan Primerler

Primerler ve Nükleotid Dizileri	PCR Ürünü
<i>C1180T Polimorfizmi</i>	
K ₁ F = 5'-ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC-3'	94 bp
R = 5'-TGGTGTCATCCTGGACCTTCC-3'	
K ₂ F = 5'-GACGATGTGCCACGTGTGGTTTCTTCTGT-3'	166 bp
R = 5'-TGAGGGTTTTGGTGTCATCCTGGACCTTCC-3'	
P ₁ F = 5'-GTGCCACGTGTGGTTTCTTCTGT-3'	155 bp
R = 5'-GTTTTGGTGTCATCCTGGACCCTG-3'	
<i>C2059T ve A2584G Polimorfizmleri</i>	
S ₁ F = 5'-GTCACCAGGATCAATGACAT-3'	1820 bp
R = 5'-AGCCCAGGAATGAAGTCCAA-3'	
S ₂ F = 5'-TGGCATAAAGACAGCTCCTCTCCT-3'	1683 bp
R = 5'-TGAAGTCCAAACCAGTGACCCTCT-3'	
<i>C3100T Polimorfizmi</i>	
H ₁ F = 5'-GGGAAGGGCAGAAAGATAG-3'	331 bp
R = 5'-TGGCAGACTGTTGAGGATC-3'	
H ₂ F = 5'-GTGGTTTGGGAAGGGCAGAAAGAT-3'	343 bp
R = 5'-CTGGAAGGCAGACTGTTGAGGATC-3'	



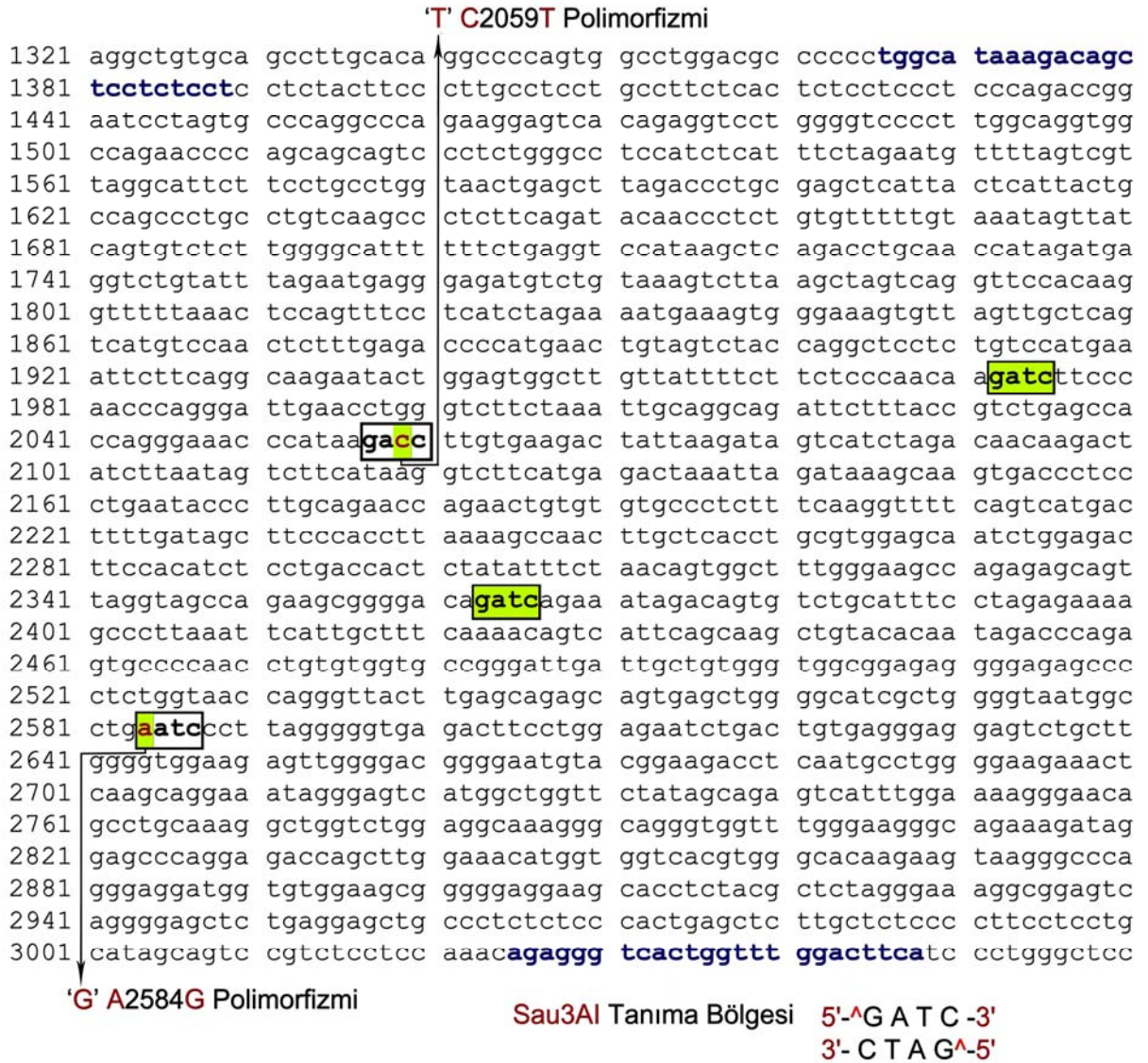
Şekil 5. C1180T Polimorfizminin K₁ Primeri ve *Kpn2I* Enzimi ile Belirlenmesi



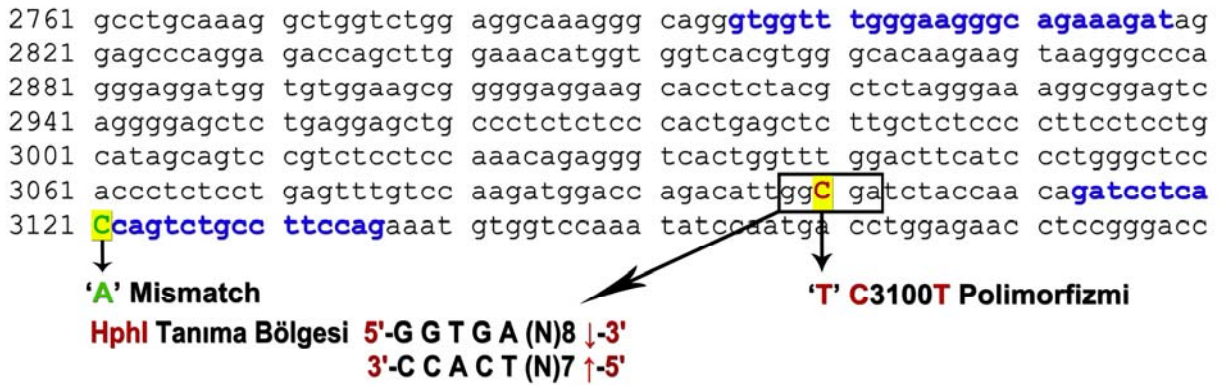
Şekil 6. C1180T Polimorfizminin K₂ Primeri ve *Kpn2I* Enzimi ile Belirlenmesi



Şekil 7. C1180T Polimorfizminin P₁ Primeri ve *PstI* Enzimi ile Belirlenmesi



Şekil 8. C2059T / A2584G Polimorfizmlerinin *Sau3AI* Enzimi ile Belirlenmesi



Şekil 9. C3100T Polimorfizminin *HphI* Enzimi ile Belirlenmesi

4.6. PCR

4.6.1. Ekzon 2 - C1180T

Leptin geni ekzon 2 bölgesindeki 155 bp lik fragmentin amplifikasyonunda PCR 0.5 ml'lik PCR tüplerinde toplam hacim 30 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir tüpe 3 µl genomik DNA ve üzerine 3 µl MgCl₂ (25mM), 3 µl 10X buffer [(NH₄)₂SO₄], 0.2 µl Taq DNA polimeraz (5u/µl), 3 µl dNTP (2.5mM), 1 µl forward primer (20 pmol), 1 µl reverse primer (20 pmol) ve 16 µl ddH₂O konulmuş, hazırlanan tüpler vortekslendikten sonra PCR cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen amplifikasyon programı ile PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon Programı

94 °C	2 dakika	Başlangıç Denatürasyonu	1 siklus
94 °C	30 saniye	Denatürasyon	} 35 siklus
60 °C	30 saniye	Bağlanma	
72 °C	30 saniye	Uzama	
72 °C	5 dakika	Son Uzama	1 siklus

4.6.2. İtron 2 - C2059T ve A2584G

Leptin geni intron 2 bölgesindeki 1683 bp lik fragmentin amplifikasyonunda PCR 0.5 ml'lik PCR tüplerinde toplam hacim 50 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir tüpe 5 µl genomik DNA ve üzerine 5 µl MgCl₂ (25mM), 10 µl 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer, 0.25 µl Hot Start Taq DNA polimeraz (5u/µl), 4 µl dNTP (2.5mM), 1 µl forward primer (30 pmol), 1 µl reverse primer (30 pmol) ve 24 µl ddH₂O konulmuş, hazırlanan tüpler vortekslendikten sonra PCR cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen amplifikasyon programı ile PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon Programı

94 °C	2 dakika	Başlangıç Denatürasyonu	1 siklus
94 °C	25 saniye	Denatürasyon	} 35 siklus
60 °C	30 saniye	Bağlanma	
72 °C	40 saniye	Uzama	
72 °C	7 dakika	Son Uzama	1 siklus

4.6.3. Ekzon 3 – C3100T

Leptin geni ekzon 3 bölgesindeki 343 bp lik fragmentin amplifikasyonunda PCR 0.5 ml'lik PCR tüplerinde toplam hacim 30 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir tüpe 4 µl genomik DNA ve üzerine 3 µl MgCl₂ (25mM), 3 µl 10X buffer [(NH₄)₂SO₄], 0.3 µl Taq DNA polimeraz (5u/µl), 3 µl dNTP (2.5mM), 1 µl forward primer (25 pmol), 1 µl reverse primer (25 pmol) ve 15 µl ddH₂O konulmuş, hazırlanan tüpler vortekslendikten sonra PCR cihazına yerleştirilerek aşağıda belirtilen amplifikasyon programı ile PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon Programı

95 °C	2 dakika	Başlangıç Denatürasyonu	1 siklus
95 °C	35 saniye	Denatürasyon	} 35 siklus
60 °C	35 saniye	Bağlanma	
72 °C	40 saniye	Uzama	
72 °C	5 dakika	Son Uzama	1 siklus

4.7. RFLP

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi toplam 30 µl hacim üzerinden gerçekleştirilmiştir. 25 µl PCR ürünü, 2,5 µl 10X buffer, 0.5 U restriksiyon enzimi ve ddH₂O ile toplam hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır.

Kesim işlemi *MspI*, *PstI*, *Sau3AI* ve *HphI* enzimleri için 37 °C’de, *Bsp13I* enzimi için 50 °C’de, *Kpn2I* için 55 °C’de 16 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirilmiş ve tüm enzimler için aynı kesim protokolü uygulanmıştır.

Leptin geni ekzon 2, intron 2 ve ekzon 3 bölgelerindeki 155, 1683 ve 347 bp lik fragmentlerin sırasıyla *PstI*, *Sau3AI* ve *HphI* enzimleri ile kesimi sonucu farklı genotiplere karşılık gelen fragmentlerin sayı ve büyüklükleri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu farklı genotiplere karşılık gelen fragmentlerin sayı ve büyüklükleri (20, 35, 52, 72).

155 bp / <i>PstI</i>	343 bp / <i>HphI</i>	1683 bp / <i>Sau3AI</i>
CC = 155	CC = 343	AA = 686+606+391
CT = 155+133+22	CT = 343+317+26	AB = 686+606+391+306+85
TT = 133+22	TT = 317+26	BB = 686+ 606+ 306+85
		CC = 606+465+391+221
		AC = 686+606+465+391+221
		BC = 686+606+465+391+306+221+85

4.8. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri ve restriksiyon enzimleriyle kesim ürünleri agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmıştır. PCR ürünleri % 2’lik, *PstI*, *Sau3AI* ve *HphI* restriksiyon enzimi ile kesim ürünleri sırasıyla % 3.5, % 3 ve % 3.5’lik agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılıp EtBr ile boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenmiştir.

Agaroz jelin hazırlanmasında; erlenmayer içine toz halindeki agarozdan hazırlanacak jelin yüzde agaroz miktarı kadar gram olarak alınarak üzerine

kaynama sırasındaki buharlaşma miktarı da göz önüne alınarak 140-150 ml 0.5X TBE tamponundan eklenmiştir. Karışım mikrodalga fırında 550 W'da 4-5 dk kaynatılarak çözüldükten sonra 55–60 °C'ye soğutularak içersine 0.25 µg/ml EtBr ilave edilmiştir. Kuyucukları oluşturacak olan tarak, traye yerleştirildikten sonra hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde traye dökülmüştür. Jelin polimerizasyonu için yaklaşık 20-30 dakika beklendikten sonra tarak dikkatlice çıkarılarak jel 0.5X TBE tamponu ile doldurulan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Örnekler ve Marker, 6X yükleme tamponu ile 5:1 oranında karıştırılarak kuyucuklara 20'şer µl olarak yüklenmiştir. Güç kaynağı 80 volta ayarlanarak yürütülen örnekler UV ışığı altında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (5, 18).

4.9. İstatistiksel Analiz

Süt verimi ve bileşimi üzerine çevre faktörlerinin (laktasyon sırası, buzağılama yaşı, buzağılama mevsimi ve laktasyon ayı) etkileri standardize edilmiş ve leptin geni yönünden belirlenen genotiplerin standardize edilen süt verimi ve bileşimi (protein, yağ, laktoz, mineral madde, yağsız kuru madde oranları ve yoğunluğu) üzerine etkileri En Küçük Kareler Metodu kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan matematiksel model;

Süt verimi için;

$$Y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + e_{ijklm} \text{ şeklinde olup,}$$

bu modelde yer alan terimlerden

$$Y_{ijklm} = \text{herhangi bir ineğin 100, 200 veya 305 günlük süt verimi,}$$

μ = popülasyonun beklenen ortalaması,

a_i = i. genotip etki miktarını,

b_j = j. laktasyon sırası etki miktarını,

c_k = k. buzağılama yaşı etki miktarını,

d_l = l. buzağılama mevsimi etki miktarını,

e_{ijklm} = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi) temsil etmektedir.

Süt bileşimi için;

$Y_{ijklmn} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + f_m + e_{ijklmn}$ şeklinde olup,

bu modelde yer alan terimlerden

Y_{ijklmn} = herhangi bir ineğin incelenen süt bileşimi parametresine ait değeri,

μ = popülasyonun beklenen ortalaması,

a_i = i. genotip etki miktarını,

b_j = j. laktasyon sırası etki miktarını,

c_k = k. buzağılama yaşı etki miktarını,

d_l = l. buzağılama mevsimi etki miktarını,

f_m = m. laktasyon ayı etki miktarını,

e_{ijklmn} = incelenen faktörler dışındaki faktörlerin etki miktarını (hata terimi) temsil etmektedir.

Veriler laktasyon sırası, buzağılama yaşı, buzağılama mevsimi ve laktasyon ayı için aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır.

Laktasyon sırası: 1. laktasyon sırası birinci, 2. laktasyon sırası ikinci, 3. laktasyon sırası üçüncü, 4. laktasyon sırası dördüncü, 5. ve üzeri laktasyon sıraları; beşinci laktasyon sırası grubu.

Buzağılama yaşı: buzağılama yaşı 2 olanlar, 1. buzağılama yaşı; buzağılama yaşı 3 olanlar, 2. buzağılama yaşı; buzağılama yaşı 4 olanlar, 3.

buzagılama yaşı; buzağılama yaşı 5 olanlar, 4. buzağılama yaşı; buzağılama yaşı 6 ve üzeri olanlar, 5. buzağılama yaşı grubu.

Buzagılama mevsimi: Aralık, ocak, şubat: 1. mevsim; mart, nisan, mayıs: 2. mevsim; haziran, temmuz ağustos: 3. mevsim; eylül, ekim, kasım: 4. mevsim grubu.

Laktasyon ayı: laktasyonun 1.,2.,3. ayında olanlar, 1. laktasyon ayı; laktasyonun 4.,5.,6. ayında olanlar, 2. laktasyon ayı; laktasyonun 7.,8.,9. ayında olanlar, 3. laktasyon ayı; laktasyonun 10.,11.,12. ayında olanlar, 4. laktasyon ayı; laktasyonun 13. ayı ve üzerinde olanlar, 5. laktasyon ayı grubu.

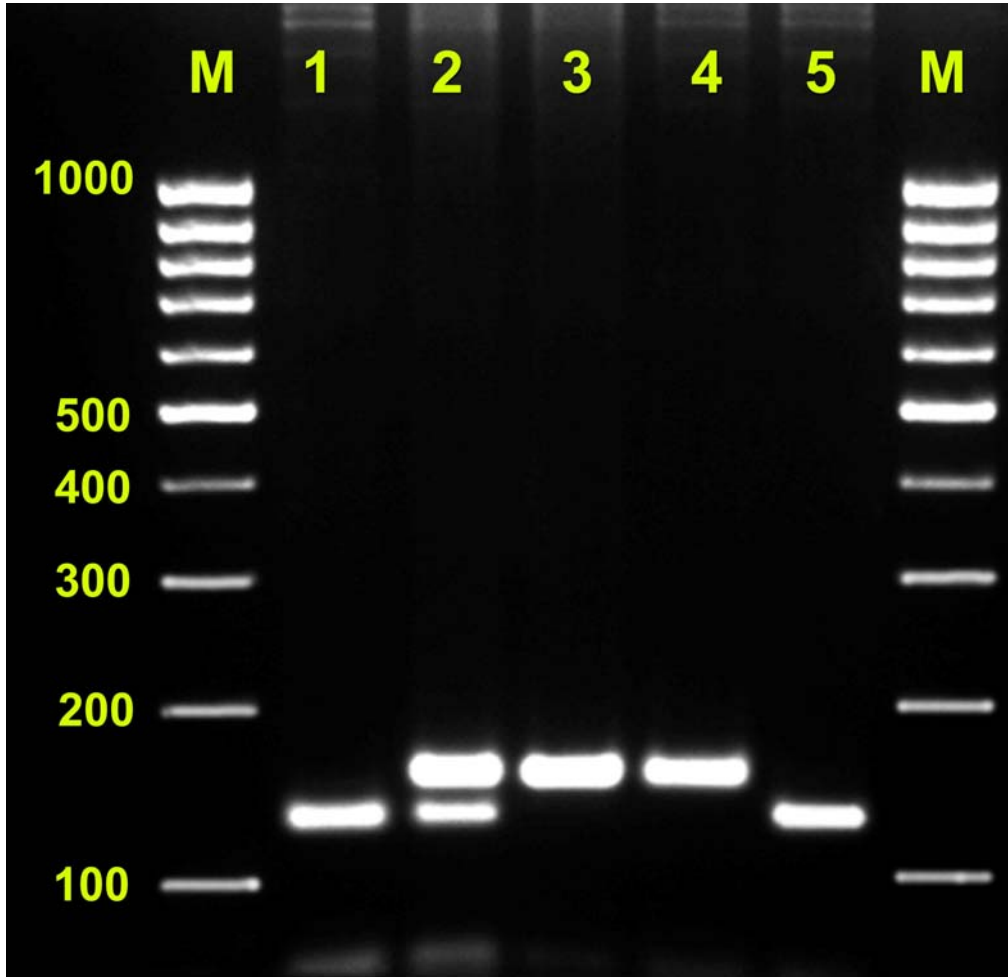
İstatistiksel analizler Minitab® 15.1.30.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak önemli bulunan parametrelerde Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (64) .

5. BULGULAR

5.1. Agaroz Jel Elektroforezi

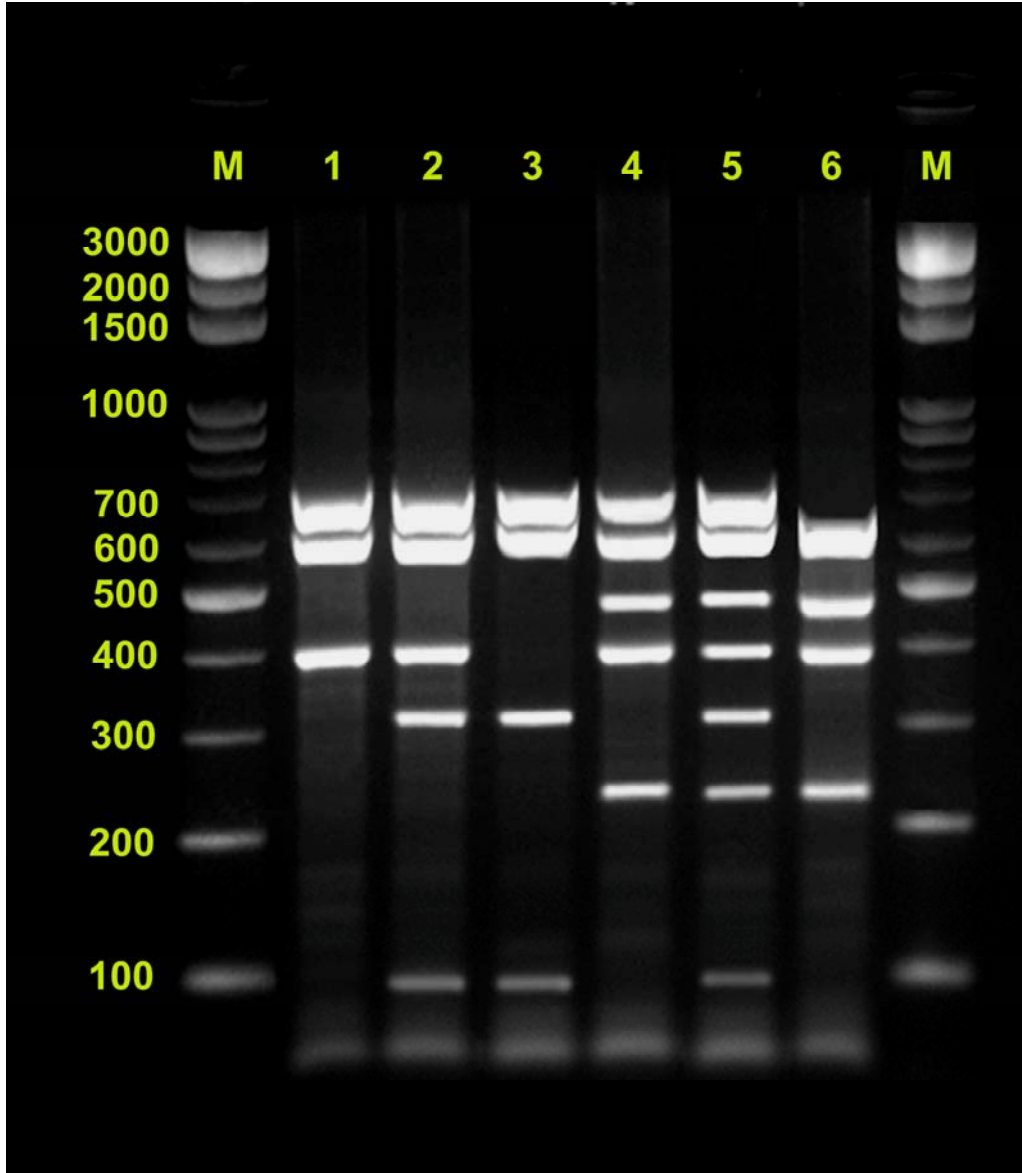
Leptin geni ekzon 2, intron 2 ve ekzon 3 bölgelerinden PCR ile amplifiye edilen 155, 1683 ve 347 bp lik fragmentlerin sırasıyla *Pst*I, *Sau*3AI ve *Hph*I enzimleri ile kesilerek, kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılıp UV ışık altında görüntülenmesi sonucu ortaya çıkan bant profilleri Şekil 10, 11 ve 12' de gösterilmiştir.

5.1.1. C1180T Polimorfizmi



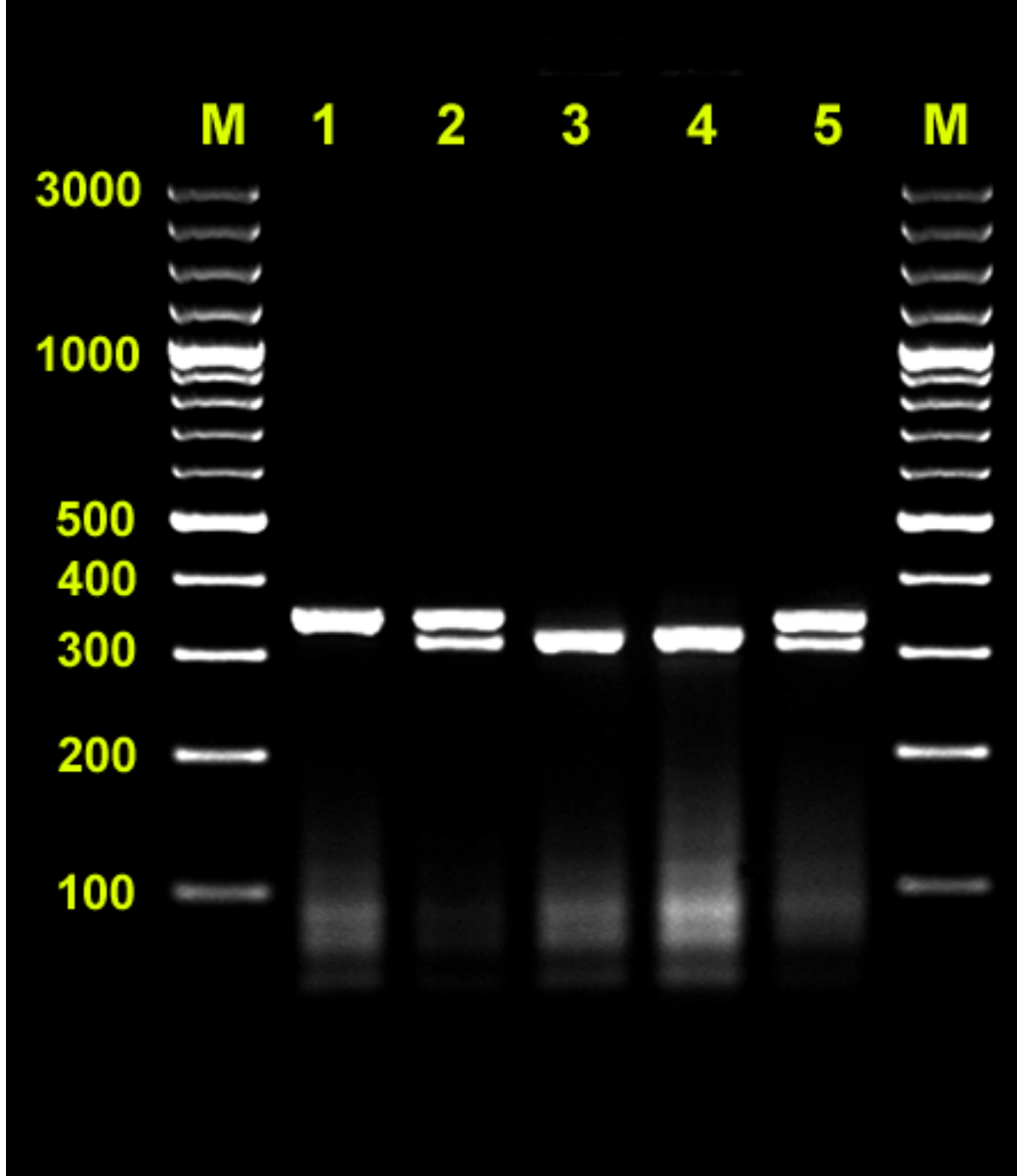
Şekil 10: 155 bp lik PCR Ürünlerinin *Pst*I Enzimi ile Kesimi. % 3.5'lik agaroz jel, M: 100bp DNA ladder (Fermentas GeneRuler, #SM0321). Örnek 1, 5 = T/T; 2 = C/T; 3, 4 = C/C genotipi.

5.1.2. C2059T ve A2584G Polimorfizmleri



Şekil 11: 1683 bp lik PCR Ürünlerinin *Sau3AI* Enzimi ile Kesimi. % 3'lük agaroz jel, M: 100bp DNA ladder (Ambresco, #K180). Örnek 1 = A/A; 2 = A/B; 3 = B/B, 4 = A/C; 5 = B/C; 6= C/C genotipi.

5.1.3. C3100T Polimorfizmi



Şekil 12: 347 bp lik PCR Ürünlerinin *HphI* Enzimi ile Kesimi. % 3.5'lik agaroz jel, M: 100bp DNA ladder (Fermentas GeneRuler, #SM0321). Örnek 1 = C/C; 2, 5 = C/T; 3, 4 = T/T genotipi.

5.2. Genotip ve Allel Frekansları

5.2.1. C1180T Polimorfizmi

C1180T polimorfizmi yönünden genotip sayı ve frekansları Tablo 4’te, allel sayı ve frekansları Tablo 5’te özetlenmiştir. C1180T polimorfizmi yönünden belirlenen genotipler incelendiğinde Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırkında CC, CT ve TT genotipleri tespit edilmiştir. Holştayn, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında genotip frekansı CT>CC>TT şeklinde sıralanırken Esmer ırkta CC>CT>TT şeklinde bulunmuştur. Genotip frekansları ile doğru orantılı olarak C allelinin tüm ırklarda T allele göre daha yüksek frekansta olduğu tespit edilmiştir. T alleli en yüksek frekansta Jersey ırkında görülürken bunu sırasıyla Yerli Kara, Doğu Anadolu Kırmızısı, Holştayn ve Esmer ırk izlemiştir.

Tablo 4. C1180T Polimorfizmi Genotip Sayı ve Frekansları

Genotip	Holştayn		Esmer Irk		Jersey		Yerli Kara		DAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	55	34.4	57	47.5	44	31.4	8	32.0	12	34.3
CT	90	56.2	48	40.0	63	45.0	12	48.0	18	51.4
TT	15	9.4	15	12.5	33	23.6	5	20.0	5	14.3
Toplam	160	100	120	100	140	100	25	100	35	100

Tablo 5. C1180T Polimorfizmi Allel Sayı ve Frekansları

Allel	Holştayn		Esmer Irk		Jersey		Yerli Kara		DAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C	200	62.5	162	67.5	151	53.9	28	56.0	42	60.0
T	120	37.5	78	32.5	129	46.1	22	44.0	28	40.0
Toplam	320	100	240	100	280	100	50	100	70	100

5.2.2. C2059T ve A2584G Polimorfizmleri

C2059T ve A2584G polimorfizmleri yönünden genotip sayı ve frekansları Tablo 6’da, allel sayı ve frekansları Tablo 7’de özetlenmiştir. C2059T ve A2584G polimorfizmleri yönünden belirlenen genotipler incelendiğinde Esmer ırkta AA, AB, BB, AC, BC ve CC olmak üzere 6 genotipin hepsi tespit edilirken, Holştayn ırkında AA, AB, AC, BC ve CC, Yerli Kara ırkında AA, AB, BB ve AC, Doğu Anadolu Kırmızısı ırkında AA, AB, BB ve BC, Jersey ırkında AA, AB ve BB genotipleri tespit edilmiştir. Holştayn, Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında nadir görülen C alleli tespit edilirken, Jersey ırkında bu allele rastlanmamıştır. Holştayn, Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında allel frekansları A>B>C şeklinde sıralanırken Jersey ırkında A>B şeklinde bulunmuştur.

Tablo 6. C2059T / A2584G Polimorfizmleri Genotip Sayı ve Frekansları

Genotip	Holştayn		Esmer Irk		Jersey		Yerli Kara		DAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AA	108	67.1	43	35.8	91	65.0	14	56.0	19	54.3
AB	25	15.5	51	42.5	45	32.1	5	20.0	12	34.2
BB	-	-	4	3.3	4	2.9	3	12.0	3	8.6
AC	22	13.7	13	10.8	-	-	3	12.0	-	-
BC	2	1.2	6	5.0	-	-	-	-	1	2.9
CC	3	1.9	3	2.5	-	-	-	-	-	-
Toplam	160	100	120	100	140	100	25	100	35	100

Tablo 7. C2059T / A2584G Polimorfizmleri Allel Sayı ve Frekansları

Allel	Holştayn		Esmer Irk		Jersey		Yerli Kara		DAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A	263	82.2	150	62.5	227	81.1	36	72.0	50	71.4
B	27	8.4	65	27.1	53	18.9	11	22.0	19	27.1
C	30	9.4	25	10.4	-	-	3	6.0	1	1.4
Toplam	320	100	240	100	280	100	50	100	70	100

5.2.3. C3100T Polimorfizmi

C3100T polimorfizmi yönünden genotip sayı ve frekansları Tablo 8’de, allel sayı ve frekansları Tablo 9’de özetlenmiştir. C3100T polimorfizmi yönünden belirlenen genotipler incelendiğinde Holştayn ve Jersey ırklarında CC, CT ve TT olmak üzere 3 genotipin hepsi tespit edilirken, Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında CC ve CT genotipleri tespit edilmiştir. Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında CC, Holştayn ırkında ise CT genotipi yüksek frekansta bulunmuştur. Tüm ırklarda C alleli daha yüksek frekansta bulunurken, özellikle Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında allel frekansı % 90’lara ulaşmıştır.

Tablo 8. C3100T Polimorfizmi Genotip Sayı ve Frekansları

Genotip	Holştayn		Esmer Irk		Jersey		Yerli Kara		DAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	69	43.1	98	81.7	64	45.7	19	76.0	28	80.0
CT	71	44.4	22	18.3	55	39.3	6	24.0	7	20.0
TT	20	12.5	-	-	21	15.0	-	-	-	-
Toplam	160	100	120	100	140	100	25	100	35	100

Tablo 9. C3100T Polimorfizmi Allel Sayı ve Frekansları

Allel	Holştayn		Esmer Irk		Jersey		Yerli Kara		DAK	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C	209	65.3	218	90.8	183	65.4	44	88.0	63	90.0
T	111	34.7	22	9.2	97	34.6	6	12.0	7	10.0
Toplam	320	100	240	100	280	100	50	100	70	100

5.2.4. Boğa Genotipleri

Leptin geni polimorfizmlerinin boğalarda da araştırılması amacıyla Ceylanpınar, Sultansuyu ve Karaköy Tarım İşletmelerinde yetiştirilen 4 Holştayn, 4 Esmer ve 2 Jersey ırkı olmak üzere toplam 10 boğanın C1180T, C2059T/A2584G ve C3100T polimorfizmleri yönünden genotipleri belirlenmiştir. Boğaların polimorfizmler yönünden belirlenen genotipleri Tablo 10'da özetlenmiştir. C1180T polimorfizmi yönünden Holştayn ve Esmer ırk boğalarda CC ve CT genotipleri, Jersey ırkı boğalarda CT ve TT genotipleri tespit edilmiştir. C2059T/A2584G polimorfizmleri yönünden Holştayn ve Esmer ırk boğalarda AA, AB ve AC genotipleri, Jersey ırkı boğalarda AA ve AB genotipleri belirlenmiştir. C3100T polimorfizmleri yönünden Jersey ırkı boğalarda sadece CC genotipi ile karşılaşılırken, Holştayn ve Esmer ırk boğalarda CC ve CT genotipleri tespit edilmiştir.

Tablo 10. Boğa Genotipleri

Polimorfizler	Holştayn				Esmer				Jersey	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
C1180T	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CC	CC	CT	TT
C2059T/A2584G	AA	AA	AC	AB	AB	AA	AC	AB	AB	AA
C3100T	CT	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CT	CC	CC

5.3. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Süt Verimi

5.3.1. C1180T Polimorfizmi

C1180T polimorfizminin süt verimi üzerine etkisi Tablo 11’de özetlenmiştir. Leptin geni polimorfizmlerinin süt verimi üzerine etkilerini tespit etmek amacıyla yapılan istatistiksel analizlerde, C1180T polimorfizminin Holştayn ve Jersey ırklarında 100 günlük süt verimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken ($P<0.05$), 200 günlük süt verimine etkisi ise $P<0.1$ düzeyinde kalmış ($P<0.1$), 305 günlük süt verimine etkisi ise önemsiz bulunmuştur. Esmer ırkta ise 100 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunmuştur. Genotipler arasında süt verimi düzeylerine göre karşılaştırma yapılacak olursa Holştayn ve Jersey ırklarında 100, 200 ve 305 günlük, Esmer ırkta ise 100 ve 200 süt verimi yönünden genotiplerin $TT>TC>CC$, Esmer ırkta 305 günlük süt verimi yönünden genotiplerin $TC>TT>CC$ şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir.

Tablo 11. C1180T Polimorfizminin Süt Verimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

İrk	Genotip	n	100 Gün (lt)	200 Gün (lt)	305 Gün (lt)
Holştayn	CC	55	2589±79.34 ^b	4971±156.00	7061±222.50
	CT	90	2779±64.21 ^a	5295±126.20	7378±180.10
	TT	15	2861±142.58 ^a	5435±280.30	7493±399.90
	<i>P-değeri</i>		<i>0.046</i>	<i>0.097</i>	<i>0.342</i>
Jersey	CC	44	1308±44.30 ^b	2567±83.55	3767±108.86
	CT	63	1412±40.60 ^a	2745±76.55	3927±99.75
	TT	33	1471±50.82 ^a	2813±95.83	4019±124.87
	<i>P-değeri</i>		<i>0.029</i>	<i>0.086</i>	<i>0.242</i>
Esmer	CC	57	1558±45.03	2943±80.54	4129±112.20
	CT	48	1661±45.59	3088±81.55	4329±113.60
	TT	15	1694±80.99	3160±144.85	4296±201.80
	<i>P-değeri</i>		<i>0.093</i>	<i>0.189</i>	<i>0.312</i>

^{a, b} = aynı sütünde farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (P<0.05).

5.3.2. C2059T ve A2584G Polimorfizmleri

C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin süt verimi üzerine etkisi Tablo 12’de özetlenmiştir. C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin Holştayn, Jersey ve Esmer ırkta 100, 200 ve 305 günlük süt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0.05). Genotipler arasında süt verimi düzeylerine göre karşılaştırma yapılacak olursa 100, 200 ve 305 günlük süt verimi yönünden genotiplerin Holştayn ırkında AC>AA>AB, Jersey ırkında AA>AB, Esmer ırkta BC>AC>AA>AB şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir.

Tablo 12. C2059T/A2584G Polimorfizmlerinin Süt Verimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

İrk	Genotip	n	100 Gün (lt)	200 Gün (lt)	305 Gün (lt)
Holştayn	AA	108	2729±59.30	5309±117.20	7372±177.50
	AB	25	2689±96.22	5118±190.10	6942±288.10
	AC	22	2863±107.25	5368±211.90	7458±321.10
	<i>P-değeri</i>		<i>0.382</i>	<i>0.563</i>	<i>0.311</i>
Jersey	AA	91	1447±33.30	2732±61.99	3904±84.09
	AB	45	1403±48.29	2706±89.91	3895±121.95
	<i>P-değeri</i>		<i>0.397</i>	<i>0.795</i>	<i>0.948</i>
Esmer	AA	44	1627±48.07	3059±84.76	4268±119.00
	AB	51	1549±45.82	2913±80.78	4057±113.50
	AC	13	1679±76.76	3169±135.33	4396±190.10
	BC	6	1710±116.62	3193±205.61	4385±288.80
	<i>P-değeri</i>		<i>0.244</i>	<i>0.193</i>	<i>0.244</i>

5.3.3. C3100T Polimorfizmi

C3100T polimorfizminin süt verimi üzerine etkisi Tablo 13'de özetlenmiştir. C3100T polimorfizminin Holştayn, Jersey ve Esmer ırkta 100, 200 ve 305 günlük süt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Genotipler arasında süt verimi düzeylerine göre karşılaştırma yapılacak olursa 100, 200 ve 305 günlük süt verimi yönünden genotiplerin Holştayn, Jersey ve Esmer ırkta $TT>CT>CC$ şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir.

Tablo 13. C3100T Polimorfizminin Süt Verimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

İrk	Genotip	n	100 Gün (lt)	200 Gün (lt)	305 Gün (lt)
Holştayn	CC	69	2728±68.30	5132±135.10	7096±202.50
	CT	71	2776±66.26	5310±131.10	7508±196.40
	TT	20	2894±119.47	5498±236.30	7573±354.20
<i>P-değeri</i>			<i>0.412</i>	<i>0.271</i>	<i>0.169</i>
Jersey	CC	64	1395±37.71	2632±74.57	3769±101.15
	CT	55	1428±36.93	2731±73.03	3946±99.06
	TT	21	1445±55.69	2735±110.13	3932±149.39
<i>P-değeri</i>			<i>0.677</i>	<i>0.528</i>	<i>0.348</i>
Esmer	CC	98	1584±33.95	2988±61.55	4176±86.46
	CT	22	1654±60.59	3138±109.86	4418±154.31
	<i>P-değeri</i>		<i>0.301</i>	<i>0.220</i>	<i>0.157</i>

5.4. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Süt Bileşimi

C1180T polimorfizminin süt bileşimi üzerine etkisi Tablo 14 ve 15'te özetlenmiştir. Leptin geni polimorfizmlerinin süt bileşimi [% protein, yağ, laktoz, mineral madde, yağsız kuru madde oranları ve yoğunluğu (kg/m³)] üzerine etkilerini tespit etmek amacıyla yapılan istatistiksel analizlerde, C1180T polimorfizminin Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında süt bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0.05).

C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin süt bileşimi üzerine etkisi Tablo 16 ve 17'de özetlenmiştir. C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin Holştayn,

Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızıısı ırklarında süt bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin Jersey ırkında sütün yağ oranı üzerine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunurken, polimorfizmlerin sütün yağ oranı üzerine etkileri incelendiğinde genotiplerin AB>AA şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir.

C3100T polimorfizminin süt bileşimi üzerine etkisi Tablo 18 ve 19'da özetlenmiştir. C3100T polimorfizminin Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızıısı ırklarında süt bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$).

5.4.1. C1180T Polimorfizmi

Tablo 14. C1180T Polimorfizminin Kültür Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

İrk	Genotip	n	Yağ (%)	YKM (%)	Yoğunluk (kg/m³)	Protein (%)	Laktoz (%)	Mineral Mad. (%)
Holştayn	CC	55	4.171±0.4466	9.215±0.1909	1032.81±0.8491	3.373±0.07044	5.055±0.1052	0.7597±0.01598
	CT	90	4.032±0.4460	9.175±0.1907	1032.24±0.8480	3.357±0.07035	5.032±0.1050	0.7549±0.01596
	TT	15	3.956±0.5674	9.168±0.2426	1032.16±1.0788	3.355±0.08950	5.028±0.1336	0.7555±0.02031
	<i>P-değeri</i>		0.797	0.920	0.432	0.908	0.912	0.856
Jersey	CC	44	4.557±0.2793	9.710±0.1646	1034.17±0.5766	3.553±0.06018	5.327±0.09091	0.8006 0.01360
	CT	63	4.202±0.2765	9.616±0.1630	1033.47±0.5710	3.519±0.05959	5.276±0.09002	0.7910 0.01347
	TT	33	4.167±0.3768	9.567±0.2221	1033.68±0.7779	3.504±0.08119	5.246±0.12265	0.7870 0.01835
	<i>P-değeri</i>		0.511	0.821	0.600	0.835	0.819	0.760
Esmer	CC	57	4.362±0.2718	9.378±0.1057	1033.00±0.4513	3.431±0.03887	5.142±0.05802	0.7706±0.008823
	CT	48	4.171±0.2653	9.241±0.1032	1032.74±0.4404	3.382±0.03793	5.070±0.05663	0.7595±0.008610
	TT	15	4.127±0.4340	9.203±0.1688	1032.39±0.7207	3.368±0.06206	5.045±0.09265	0.7571±0.014087
	<i>P-değeri</i>		0.759	0.385	0.665	0.400	0.396	0.422

Tablo 15. C1180T Polimorfizminin Yerli Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

İrk	Genotip	n	Yağ (%)	YKM (%)	Yoğunluk (kg/m³)	Protein (%)	Laktöz (%)	Mineral Mad. (%)
YK	CC	8	5.285±0.4539	9.847±0.2374	1033.62±0.9308	3.601±0.08721	5.397±0.1296	0.8096±0.01941
	CT	12	5.090±0.4000	9.434±0.2092	1033.10±0.8203	3.451±0.07685	5.171±0.1142	0.7747±0.01711
	TT	5	5.015±0.5302	9.393±0.2773	1032.56±1.0872	3.436±0.10186	5.145±0.1514	0.7696±0.02268
<i>P-değeri</i>			<i>0.557</i>	<i>0.410</i>	<i>0.578</i>	<i>0.419</i>	<i>0.432</i>	<i>0.475</i>
DAK	CC	12	4.482±0.2815	9.748±0.2813	1034.31±0.7577	3.568±0.10857	5.353±0.1500	0.8042±0.02307
	CT	18	4.380±0.2298	9.565±0.2297	1033.82±0.6187	3.476±0.08865	5.286±0.1225	0.7906±0.01883
	TT	5	4.360±0.4361	9.402±0.4358	1033.26±1.1738	3.438±0.16820	5.166±0.2323	0.7760±0.03573
<i>P-değeri</i>			<i>0.954</i>	<i>0.778</i>	<i>0.739</i>	<i>0.742</i>	<i>0.796</i>	<i>0.789</i>

5.4.2. C2059T ve A2584G Polimorfizmleri

Tablo 16. C2059T ve A2584G Polimorfizmlerinin Kültür Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Irak	Genotip	n	Yağ (%)	YKM (%)	Yoğunluk (kg/m³)	Protein (%)	Laktöz (%)	Mineral Mad. (%)
Holştayn	AA	108	4.155±0.5862	9.214±0.1981	1032.53±0.8603	3.370±0.07301	5.054±0.1088	0.7587±0.01651
	AB	25	4.261±0.6707	9.036±0.2267	1031.81±0.9843	3.305±0.08353	4.956±0.1245	0.7446±0.01889
	AC	22	3.964±0.6838	9.259±0.2311	1032.94±1.0035	3.389±0.08516	5.082±0.1270	0.7638±0.01926
	<i>P-değeri</i>		<i>0.851</i>	<i>0.391</i>	<i>0.341</i>	<i>0.379</i>	<i>0.382</i>	<i>0.395</i>
Jersey	AA	91	4.210±0.2425	9.664±0.1322	1033.96±0.4794	3.537±0.04833	5.300±0.07258	0.7959±0.01099
	AB	45	4.754±0.3339	9.598±0.1820	1033.50±0.6603	3.510±0.06656	5.263±0.09996	0.7911±0.01513
	<i>P-değeri</i>		<i>0.094</i>	<i>0.708</i>	<i>0.469</i>	<i>0.675</i>	<i>0.704</i>	<i>0.744</i>
Esmer	AA	43	4.203±0.2341	9.323±0.1147	1033.07±0.4798	3.411±0.04203	5.112±0.06286	0.7662±0.009419
	AB	51	4.300±0.2160	9.247±0.1059	1032.55±0.4427	3.384±0.03878	5.073±0.05799	0.7603±0.008690
	AC	13	4.172±0.3464	9.435±0.1698	1033.52±0.7100	3.454±0.06219	5.177±0.09301	0.7753±0.013937
	BC	6	4.185±0.5155	9.461±0.2527	1033.85±1.0565	3.462±0.09255	5.193±0.13841	0.7795±0.020740
	<i>P-değeri</i>		<i>0.974</i>	<i>0.671</i>	<i>0.421</i>	<i>0.673</i>	<i>0.665</i>	<i>0.664</i>

Tablo 17. C2059T ve A2584G Polimorfizmlerinin Yerli Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

İrk	Genotip	n	Yağ (%)	YKM (%)	Yoğunluk (kg/m³)	Protein (%)	Laktoz (%)	Mineral Mad. (%)
YK	AA	14	5.188±0.2780	9.666±0.1490	1033.72±0,5751	3.541±0.05506	5.306±0.08172	0.7960±0.01236
	AB	5	5.314±0.4098	9.607±0.2196	1033.26±0,8477	3.516±0.08116	5.269±0.12046	0.7896±0.01822
	<i>P-değeri</i>		<i>0.777</i>	<i>0.802</i>	<i>0.613</i>	<i>0.775</i>	<i>0.777</i>	<i>0.747</i>
DAK	AA	19	4.341±0.2196	9.666±0.2161	1034.43±0.6564	3.541±0.08404	5.311±0.1149	0.7995±0.01779
	AB	12	4.473±0.2763	9.523±0.2719	1033.74±0.8259	3.444±0.10575	5.278±0.1446	0.7858±0.02239
	<i>P-değeri</i>		<i>0.709</i>	<i>0.683</i>	<i>0.519</i>	<i>0.479</i>	<i>0.859</i>	<i>0.637</i>

5.4.3. C3100T Polimorfizmi

Tablo 18. C3100T Polimorfizminin Kültür Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

İrk	Genotip	n	Yağ (%)	YKM (%)	Yoğunluk (kg/m³)	Protein (%)	Laktoz (%)	Mineral Mad. (%)
Holştayn	CC	69	4.217±0.5772	9.206±0.2180	1032.38±0.8712	3.368±0.08020	5.050±0.1196	0.7588±0.01817
	CT	71	4.152±0.5719	9.162±0.2160	1032.49±0.8631	3.351±0.07946	5.026±0.1185	0.7549±0.01800
	TT	20	3.981±0.6890	9.128±0.2602	1032.91±1.0398	3.339±0.09573	5.010±0.1427	0.7517±0.02169
	<i>P-değeri</i>		<i>0.886</i>	<i>0.885</i>	<i>0.768</i>	<i>0.874</i>	<i>0.895</i>	<i>0.865</i>
Jersey	CC	64	4.733±0.3389	9.636±0.1683	1033.95±0.6365	3.527±0.06140	5.284±0.09225	0.7923±0.01396
	CT	55	4.582±0.3103	9.551±0.1540	1034.29±0.5826	3.496±0.05620	5.237±0.08444	0.7860±0.01278
	TT	21	4.295±0.4184	9.428±0.2077	1034.51±0.7857	3.451±0.07580	5.171±0.11388	0.7771±0.01724
	<i>P-değeri</i>		<i>0.685</i>	<i>0.697</i>	<i>0.790</i>	<i>0.690</i>	<i>0.697</i>	<i>0.752</i>
Esmer	CC	98	4.394±0.1824	9.355±0.0835	1032.85±0.3486	3.423±0.03073	5.131±0.04589	0.7698±0.006996
	CT	22	4.270±0.3524	9.259±0.1613	1033.50±0.6736	3.388±0.05937	5.081±0.08867	0.7614±0.013516
	<i>P-değeri</i>		<i>0.744</i>	<i>0.580</i>	<i>0.372</i>	<i>0.588</i>	<i>0.604</i>	<i>0.566</i>

Tablo 19. C3100T Polimorfizminin Yerli Irkların Süt Bileşimi Üzerine Etkisi ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)

Irak	Genotip	n	Yağ (%)	YKM (%)	Yoğunluk (kg/m³)	Protein (%)	Laktoz (%)	Mineral Mad. (%)
YK	CC	19	5.280±0.2960	9.761±0.1218	1033.54±0.5451	3.572±0.04370	5.350±0.06519	0.8016±0.009488
	CT	6	5.098±0.4731	9.568±0.1947	1033.78±0.8714	3.503±0.06986	5.250±0.10420	0.7878±0.015167
	<i>P-değeri</i>		<i>0.706</i>	<i>0.337</i>	<i>0.781</i>	<i>0.340</i>	<i>0.352</i>	<i>0.376</i>
DAK	CC	28	4.485±0.1884	9.682±0.1891	1033.52±0.5200	3.510±0.07872	5.366±0.09560	0.7996±0.01571
	CT	7	4.317±0.3489	9.516±0.3502	1034.02±0.9629	3.473±0.14576	5.224±0.17702	0.7857±0.02910
	<i>P-değeri</i>		<i>0.676</i>	<i>0.679</i>	<i>0.654</i>	<i>0.824</i>	<i>0.486</i>	<i>0.678</i>

6. TARTIŞMA

Türkiyede yetiştirilen bazı kültür (Holştayn, Esmer ve Jersey) ve yerli (Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı) sığır ırklarında leptin geni polimorfizmlerinin belirlenmesi ve süt verimi ile bileşimi üzerine etkilerinin ortaya çıkartılması amacıyla yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar konu ile ilgili yapılan diğer araştırmalar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

6.1. Genotip ve Allel Frekansları

6.1.1. C1180T Polimorfizmi

Leptin geni C1180T polimorfizmi yönünden Hoştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında CC, CT ve TT genotipleri tespit edilmiştir. Holştayn, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında genotip frekansı CT>CC>TT şeklinde sıralanırken, Esmer ırkta CC>CT>TT şeklinde bulunmuştur. Genotip frekansları ile doğru orantılı olarak C allelinin tüm ırklarda T allele göre daha yüksek frekansta olduğu tespit edilmiştir. Holştayn ırkında allel frekansı, Banos ve ark. (12) tarafından bildirilen C=0.650, T=0.350; Choudhary ve ark. (23) tarafından bildirilen C=0.600, T=0.400; Brickell ve ark. (19) tarafından bildirilen C=0.590, T=0.410; Buchanan ve ark. (21) tarafından bildirilen C=0.540, T=0.460; Madeja ve ark. (61) tarafından bildirilen C=0.540, T=0.460 ve İran Holştaynlarında Sadeghi ve ark. (74) ve Nassiry ve ark. (66) tarafından bildirilen sırasıyla C=0.575, T=0.425 ve C=0.570, T=0.430 değerleri ile benzer (C=0.625 ve T=0.375) bulunmuştur. Esmer ırkının allel frekansı da Buchanan ve ark. (21) tarafından bildirilen C=0.550 ve T=0.450 ve Nassiry ve ark. (66) tarafından bildirilen C=0.550 ve T=0.450 değerleri ile benzer şekilde C=0.675 ve T=0.325 olarak tespit edilmiştir. Jersey ırkının allel frekansı

Choudhary ve ark. (23) tarafından bildirilen $C=0.440$, $T=0.560$ ve Komisarek ve Antkowiak (48) tarafından bildirilen $C=0.800$ ve $T=0.200$ değerlerinden farklı, Buchanan ve ark. (21) tarafından bildirilen $C=0.530$ ve $T=0.470$ değerleri ile benzer şekilde $C=0.539$ ve $T=0.461$ olarak bulunmuştur.

Çalışma ile gen kaynakları olarak kabul edilen yerli ırkların allel frekansları da belirlenmiştir. Yerli Kara ırkının allel frekansı ilk kez bu çalışma ile $C=0.560$, $T=0.440$ olarak belirlenirken, Doğu Anadolu Kırmızısı ırkının allel frekansı Özbatak ve ark. (69) tarafından bildirilen $C=0.487$, $T=0.512$ değerlerinden farklı ($C=0.600$, $T=0.400$) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Özbatak ve ark. (69) tarafından yapılan çalışmada T allelinin frekansı C allelinden yüksek bulunmuştur. Bu farkın çalışmalarda kullanılan Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı sığırların farklı kaynaklardan temin edilmesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Özbatak ve ark. (69) tarafından yapılan çalışmada Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı sığırların kan örneklerinin nereden toplandığı ayrıntılı olarak verilmezken, Türkiye'nin doğusundan alındığı belirtilmiştir. Bu çalışma kapsamında Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı sığırların kan ve süt örnekleri, Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı sığırların yok olma tehlikesine karşı koruma altında tutulduğu Erzurum/Ilıca'daki TAGEM Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden toplanmıştır.

6.1.2. C2059T ve A2584G Polimorfizmleri

C2059T ve A2584G polimorfizmleri yönünden Esmer ırkta AA, AB, BB, AC, BC ve CC olmak üzere 6 genotipin hepsi tespit edilirken, Holştayn ırkında AA, AB, AC, BC ve CC, Yerli Kara ırkında AA, AB, BB ve AC, Doğu Anadolu Kırmızısı ırkında AA, AB, BB ve BC, Jersey ırkında AA, AB ve BB genotipleri

tespit edilmiştir. Holştayn, Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında nadir görülen C alleli tespit edilirken, Jersey ırkında bu allele rastlanmamıştır. Holştayn, Esmer ırk, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında allel frekansı $A>B>C$ şeklinde sıralanırken Jersey ırkında $A>B$ şeklinde bulunmuştur. Holştayn ırkında allel frekansları $A=0.822$, $B=0.084$, $C=0.094$ olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç Polonya Alacası ırkında Zwierzchowski ve ark. (85), Kulig (52) ve Madeja ve ark. (61) tarafından tespit edilen sırasıyla $A=0.790$, $B=0.110$, $C=0.100$; $A=0.805$, $B=0.114$, $C=0.081$ ve $A=0.860$, $B=0.110$, $C=0.030$ değerleri ile oldukça benzerdir. Bu çalışma ile Esmer ırkta C2059T ve A2584G polimorfizmleri ilk kez belirlenmiş ve allel frekansları $A=0.675$, $B=0.271$, $C=0.104$ olarak tespit edilmiştir. Esmer ırkta C allelinin frekansı diğer ırklara oranla biraz daha yüksek bulunmuştur. Jersey ırkında allel frekansı Kulig ve ark. (53) tarafından Polonya Jerseylerinde bildirilen $A=0.590$ ve $B=0.410$ değerlerinden biraz farklı $A=0.811$ ve $B=0.189$ olarak bulunmuştur. Jersey ırkında C1180T polimorfizminden sonra C2059T ve A2584G polimorfizmleri yönünden de allel frekansı Polonya Jerseylerinden farklı bulunmuştur. Bu durumun, seleksiyon ve ıslah çalışmaları sonucunda genetik yapıda meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Türkiye’de Jerseylerinin süt verimi ortalamasının yaklaşık 3900 kg olmasına karşın Polonya’da 4500 kg olması da bu görüşü destekler niteliktedir.

Yerli Kara ırkının allel frekansı ilk kez bu çalışma ile $A=0.720$, $B=0.220$, $C=0.060$ olarak belirlenirken, Doğu Anadolu Kırmızısı ırkının allel frekansı Özbatak ve ark. (69) tarafından bildirilen $A=0.712$, $B=0.262$, $C=0.025$ allel frekansları ile benzer şekilde $A=0.714$, $B=0.271$, $C=0.014$ olarak tespit edilmiştir.

6.1.3. C3100T Polimorfizmi

C3100T polimorfizmi yönünden Holştayn ve Jersey ırklarında CC, CT ve TT olmak üzere 3 genotipin hepsi tespit edilirken, Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında CC ve CT genotipleri tespit edilmiştir. Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında CC, Holştayn ırkında ise CT genotipi yüksek frekansta bulunmuştur. Tüm ırklarda C alleli daha yüksek frekansta bulunurken, özellikle Esmer, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında allel frekansı % 90'lara ulaşmıştır. Holştayn ırkında $C=0.653$, $T=0.347$ olarak tespit edilen allel frekansı, Madeja ve ark. (61) tarafından Polonya Alacası boğalarda $C=0.660$, $T=0.340$ olarak tespit edilen allel frekansı ile oldukça yakın bulunurken, Kulig (52) tarafından Polonya Alacası sığırlarda $C=0.760$, $T=0.240$ olarak tespit edilen allel frekansıyla da benzer bulunmuştur. Bu çalışma ile Esmer ırkta C3100T polimorfizmi ilk defa belirlenmiş, allel frekansı $C=0.908$, $T=0.092$ olarak tespit edilirken, C allelinin frekansı oldukça yüksek bulunmuştur. Jersey ırkında $C=0.654$, $T=0.346$ olarak tespit edilen allel frekansı, Polonya Jerseylerinde Kulig ve ark. (53) ve Komisarek ve Antkowiak (48) tarafından tespit edilen sırasıyla $C=0.720$, $T=0.280$ ve $C=0.670$, $T=0.330$ değerleri ile benzer bulunmuştur.

Yerli Kara ırkının allel frekansı ilk kez bu çalışma ile $C=0.880$, $T=0.120$ olarak belirlenmiştir. Doğu Anadolu Kırmızısı ırkının allel frekansı Özbatak ve ark. (69) tarafından bildirilen $C=0.137$, $T=0.862$ değerlerinin tam tersi şeklinde $C=0.900$, $T=0.100$ olarak bulunmuştur. Bu durumun, Özbatak ve ark. (69) nın polimorfizmin tespitinde kullanılan reverse primeri değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Polimorfizmin tespitinde kullanılan reverse

primer Haegeman ve ark. (35) tarafından polimorfizm alanına oldukça yakın başka bir *HphI* enzimi tanıma bölgesini ortadan kaldırmak amacıyla mismatch yapılarak dizayn edilmiştir. Özbatak ve ark. (69) tarafından dizayn edilen yeni primerin eski primerin bağlanma bölgesini de çoğaltacak şekilde dizayn edilmesi, enzimin PCR ürünlerinde polimorfizm alanına oldukça yakın başka bir tanıma bölgesinden kesim yaparak hatalı pozitif sonuç alınmasına neden olduğu sanılmaktadır. C allelinin frekansının T alleleline göre oldukça yüksek bulunduğu birçok çalışmadan [Kulig (52), Kulig ve ark. (53), Madeja ve ark. (61), Komisarek ve Antkowiak (48), Almeida ve ark. (4)], farklı olarak Özbatak ve ark. (69) tarafından Güney Anadolu Kırmızısı (C=0.112, T=0.887) ve Boz ırkta (C=0.112, T=0.887) da Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı (C=0.137, T=0.862) ile benzer şekilde T allelinin frekansının C alleleline göre oldukça yüksek bulunması bu görüşü destekler niteliktedir.

6.2. Leptin Geni Polimorfizmleri ve Süt Verim Özellikleri

6.2.1. C1180T Polimorfizmi

Leptin geni polimorfizmlerinin süt verimi ve bileşimi üzerine etkilerini tespit etmek amacıyla yapılan istatistiksel analizlerde, C1180T polimorfizminin Holştayn ve Jersey ırklarında 100 günlük süt verimine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken ($P<0.05$), 200 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde kalmış, 305 günlük süt verimine etkisi ise önemsiz bulunmuştur. Benzer şekilde, Buchanan ve ark. (21), Holştayn ırkında C1180T polimorfizminin süt verimine etkisinin önemli olduğunu, laktasyon dönemi boyunca TT genotipli ineklerin CC genotiplilere göre günlük 1.5 kg, laktasyonun ilk 100 günlük döneminde günlük 2.44 kg daha fazla süt verdiğini, T allelinin süt verimi üstünlüğünün özellikle

laktasyonun ilk 100 günlük döneminde daha belirgin olduğunu ve laktasyonun ilerleyen günlerinde bu farkın giderek düştüğünü bildirmişlerdir. Alashawkany ve ark. (3), İran Holştaynlarında T allelinin süt verimini önemli derecede etkilediğini, bu etkinin özellikle laktasyonun 60-100 günlük döneminde belirgin olduğunu ($P<0.028$), TT genotipli hayvanların laktasyonun 60-100 günlük dönemde CC genotipli hayvanlara göre günlük 1.6 kg fazla süt vermesine karşın T allelinin 305 günlük süt verimine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Chebel ve ark. (22), Holştayn ırkında C1180T polimorfizminin süt verimi ve bileşimi üzerine etkisinin önemli olduğunu, CC genotipli hayvanların süt verim özelliklerinin CT ve TT genotiplilere göre düşük olduğunu, CC genotipli hayvanların CT genotiplilere göre 305 günlük süt veriminin 258 kg, yağ veriminin 12 kg ve protein veriminin 10.7 kg daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Esmer ırkta T allelinin 100 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunmuştur. Alashawkany ve ark. (3), Buchanan ve ark. (21) ve Chebel ve ark. (22), Holştayn ırkında T allelinin süt verimi üzerine etkisini önemli bulurken, bu çalışmada Holştayn ırkı ile birlikte Jersey ırkında da T allelinin etkisinin önemli bulunurken, Esmer ırkta önemliye yakın bulunmuştur.

C1180T polimorfizminin Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında süt bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$).

Holştayn ve Jersey ırklarında C1180T polimorfizmi yönünden T allelinin süt bileşiminde önemli bir değişikliğe neden olmaksızın laktasyonun erken döneminde süt verimini arttırdığı tespit edilmiştir. T alleli süt verimi üstünlüğünü, C→T nükleotid değişikliği sonucu leptin proteininin yapısındaki bir amino asitin

argininden sisteine dönüşmesi ile gerçekleştirmektedir. Leptin molekülünün alfa heliks yapısında fazladan eşleşmiş bir sistein bulunması hormonun biyolojik fonksiyonları açısından kritik öneme sahip 2 sistein arasındaki disülfid bağın dengesini bozarak bazı fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Bu fonksiyonel değişiklikler sonucunda leptin hormonunun hipotalamustaki reseptörler tarafından tanınması zorlaşmakta ve özellikle kanda yüksek seviye olduğu gebeliğin son dönemlerinde iştahın baskılanmaması ve enerji harcamasının azalması sonucu yağ depolanması artmaktadır. Gebeliğin son döneminde depolanan bu yağlar laktasyonun erken dönemlerinde negatif enerji dengesinde enerji deposu olarak kullanılarak yüksek süt veriminin devam ettirilmesinde önemli rol oynamaktadır (6, 20, 21, 75).

6.2.2. C2059T ve A2584G Polimorfizmleri

C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin Holştayn, Jersey ve Esmer ırkta 100, 200 ve 305 günlük süt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Bu çalışma ile benzer olarak Zwierzchowski ve ark. (85) ve Madeja ve ark. (61), Polonya Alacası ırkında C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin süt verimi üzerine etkisini önemsiz bulmuşlardır ($P>0.05$). Benzer şekilde Kulig ve ark. (53), Jersey ırkında C2059T polimorfizminin süt verim özellikleri üzerine etkisini önemsiz bulmuşlardır. Bu çalışmalardan farklı olarak Moussavi ve ark. (65), C2059T polimorfizminin İran Holştaynlarında 305 günlük süt verimi üzerine etkisini istatistiksel olarak önemli bulmuş ($P<0.05$) ve heterozigot (AB) hayvanların süt veriminin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kulig (52), Polonya Alacasında C2059T polimorfizminin süt verimi ve bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulmuş ve BB genotipinin süt, protein ve

yağ verimi yönünden üstün olduğunu bildirmiştir. Liefers ve ark. (56), C2059T polimorfizmi yönünden AB genotipinin günlük süt, protein ve laktoz veriminin AA genotipine göre daha yüksek olduğunu, AB genotipli hayvanların AA genotiplilere göre günlük 1.23 ila 1.32 kg arasında daha fazla süt verdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada bahsedilen çalışmalardan farklı olarak C2059T ve A2584G polimorfizmleri birlikte değerlendirilmiş ve değerlendirmede C alleli de göz önüne alınmıştır. C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin süt verimi ve bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmasına rağmen Holştayn ve Esmer ırkta C allelinin 100, 200 ve 305 günlük süt verimini yükseltme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir.

C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında süt bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Bununla birlikte, polimorfizmlerinin Jersey ırkında sütün yağ oranı üzerine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunmuş ve sütün yağ oranı yönünden genotiplerin AB>AA şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Zwierzchowski ve ark. (85), Polonya Alacası ırkında C2059T ve A2584G polimorfizmlerinin sütün yağ, protein, laktoz oranına etkisinin önemli olduğunu ($P<0.05$), sütün yağ ve protein oranı yönünden genotiplerin AC>AA>AB şeklinde sıralandığını bildirmişlerdir.

6.2.3. C3100T Polimorfizmi

C3100T polimorfizminin Holştayn, Esmer ırk ve Jersey ırkında 100, 200 ve 305 günlük süt verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Bu çalışma ile benzer olarak Liefers ve ark. (56), da C3100T polimorfizminin süt verimine etkisini önemsiz bulmuşlardır. Bu

çalışmalardan farklı olarak Madeja ve ark. (61), Polonya Alacası boğalar üzerinde yaptıkları çalışmada C3100T polimorfizminin süt ve protein verimini önemli derecede etkilediğini, TT genotipli hayvanların süt ve protein verimi açasından yaklaşık 2 kat daha fazla damızlık değere sahip olduklarını ve bu genotipteki hayvanların yağ veriminin de yüksek olma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Kulig (52), Polonya Alacası ırkında C3100T polimorfizminin süt verimi ve bileşimini üzerine etkisini önemli bulmuş ve CC genotipinin süt verimi ve bileşimi yönünden daha üstün olduğunu öne sürmüşlerdir. Kulig ve ark. (53), Jersey ırkında C3100T polimorfizminin süt verimi ve bileşimini önemli derecede etkilediğini ve süt verim özellikleri yönünden C allelinin üstün olduğunu bildirmişlerdir. Liefers ve ark. (56), Holştayn ırkında C3100T polimorfizminin sütün yağ oranı üzerine etkisinin önemli olduğunu ve C3100T polimorfizminin sütün yağ oranı yönünden marker olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalardan farklı olarak C3100T polimorfizminin Holştayn, Esmer, Jersey, Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarında süt bileşimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). C3100T polimorfizminin süt verimi ve bileşimi üzerine etkileri önemsiz çıkmasına rağmen T alleleline sahip bireylerin süt verimi, C alleleline sahip bireylerin süt bileşimi değerlerinin daha yüksek olma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir.

6.3. Sonuç

Bu çalışma ile Türkiye’de yıllık süt üretiminin önemli bir bölümünü karşılayan kültür ırk sığırların (Holştayn, Esmer, Jersey) ve gen kaynakları olarak kabul edilen yerli ırk sığırların (Yerli Kara ve Doğu Anadolu Kırmızısı) leptin geni polimorfizmleri belirlenmiş, polimorfizmler yönünden sahip oldukları

genetik yapı ve allel frekansları tespit edilmiş, polimorfizmlerin kültür ırk sığırlarda süt verimi ve bileşimi (protein, yağ, laktoz, kuru madde, yağsız kuru madde oranları ve yoğunluğu), yerli ırk sığırlarda süt bileşimi üzerine etkileri ortaya çıkartılmıştır.

Türkiye’de yetiştirilen kültür ırk sığırların (Holştayn, Esmer, Jersey) ve gen kaynakları olarak kabul edilen yerli ırk sığırlardan Yerli Kara ırkının leptin geni polimorfizmleri, polimorfizmler yönünden sahip oldukları genotip ve allel frekansları ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Ayrıca Esmer ırkta leptin geni C2059T/A2584G ve C3100T polimorfizmleri ve Jersey ırkında C1180T polimorfizminin süt verimi ve bileşimi üzerine etkisi uluslararası alanda ilk defa araştırılmıştır. Elde edilen bilgiler, yerli ve yabancı literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmasının yanında genetik çeşitliliğin araştırılması ve gen kaynaklarının korunması çalışmalarına ve FAO’nun geniş çaplı ve uluslararası DAD-IS veri tabanına da önemli katkılar sağlayacaktır.

Çalışma ile leptin geni ekzon 2 bölgesindeki C1180T polimorfizminin Buchanan ve ark. (20), tarafından dizayn edilen primer çifti ve *Kpn2I* restriksiyon enzimi ile belirlenmesinde primer degradasyonu sonucu çeşitli PCR hataları ile karşılaşılması üzerine çalışmaların tamamlanması ve tekrarlanabilirliği açısından polimorfizmin tespitinde daha stabil sonuçlar veren yeni bir yöntem arayışına girilmiştir. Çalışmalar sonucunda *PstI* enzimi kullanımı ve *PstI* enzimi tanıma bölgesi oluşturmak amacıyla reverse primerin 3’ ucundan 3 nükleotid önce yapılan mismatch ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yeni geliştirilen yöntemle, reverse primerdeki mismatch ın 3’ ucundan 3 nükleotid öne alınması ve *PstI* enzimi gibi metilasyondan etkilenmeyen bir enzim kullanılması ile

birlikte daha stabil sonuçlar alınmaya başlanmış, *PstI* enziminin *Kpn2I* enzimi ve izoşizomerlerine göre oldukça ucuz olması enzim masraflarını yaklaşık 6-8 kat azaltmıştır. Yeni yöntem, süt verimi üzerine etkisi önemli bulunan C1180T polimorfizminin tespit edilmesini kolaylaştırmasının yanında, maliyetini oldukça düşürerek ıslah programlarında rutin kullanımı için yeni bir olanak sağlamıştır.

Leptin geni C1180T polimorfizminin, Holştayn ve Jersey ırklarında 100 günlük süt verimine etkisi önemli bulunurken ($P<0.05$), 200 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde kalmış, 305 günlük süt verimine etkisi ise önemsiz bulunmuştur. Esmer ırkta ise 100 günlük süt verimine etkisi $P<0.1$ düzeyinde bulunmuştur. T allelinin süt bileşiminde önemli bir değişikliğe neden olmaksızın laktasyonun erken döneminde süt verimini arttırdığı tespit edilmiştir. C2059T/A2584G ve C3100T polimorfizmlerinin süt verimi ve bileşimi üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmazken, C3100T polimorfizmi T alleli ve C2059T/A2584G polimorfizmleri C allelinin süt verimi yükseltme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçta, leptin geni C1180T polimorfizmi ile süt verimi arasındaki ilişki C1180T polimorfizminin marker destekli seleksiyon gibi genotipik seleksiyon uygulamalarında yararlı bir marker olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. C1180T polimorfizmi yönünden T allelinin seleksiyonu süt veriminin artırılması yönünde önemli bir ekonomik avantaj sağlayacaktır. Leptin geni C1180T polimorfizminin MAS gibi genotipik seleksiyon uygulamalarında kullanılması ile birlikte laktasyonun erken döneminde süt veriminin artırılması için yeni bir imkân sağlanmış olacaktır. İneklerin yanında boğalar veya spermalarının da süt verimi yönünden seleksiyonu mümkün hale gelecektir. Boğaların seleksiyonu ile

ülke çapında hızlı ve etkin bir genetik ilerleme ile birlikte kısa sürede ekonomik değeri yüksek hayvanlar geliştirilebilecektir.

6.4. Öneriler

Çalışma Sonucunda;

1. leptin geni C1180T polimorfizminin özellikle laktasyonun erken dönemlerinde süt veriminin artırılması yönünde yapılacak genotipik seleksiyon uygulamalarında marker olarak kullanılmasının popülasyonun süt verimi ortalamasını arttırabileceği, diğer taraftan leptin geni C1180T polimorfizminin süt verimi ve bileşimi üzerine etkili diğer gen polimorfizmleri ile birlikte değerlendirilmesinin seleksiyonun isabet derecesinin artırılması açısından daha doğru olacağı,
2. süt verimi ve bileşimi üzerine etkileri istatistiksel olarak önemsiz bulunan fakat süt verimini yükseltme eğiliminde olan leptin geni C2059T/A2584G ve C3100T polimorfizmlerinin süt verimi üzerine etkilerinin süt verimi yüksek elit sürülerde araştırılmasının faydalı olacağı,
3. damızlık değerinin tespitinde, polimorfizmlerin belirlenmesi ile elde edilecek genotipik verilerin fenotipik verilerle birleştirilerek kullanılmasının daha doğru olacağı,
4. Türkiye’de yıllık 11 milyon ton civarında olan süt üretiminin yaklaşık % 90’ının sığırlardan karşılandığı göz önüne alındığında, sığırlarda süt verimi ve bileşimi üzerine etkili diğer polimorfizmlerin de araştırılmasının gerek süt endüstrisi gerekse ülke ekonomisi açısından oldukça faydalı olacağı,

5. leptin geni polimorfizmlerinin iştah, enerji metabolizması, karkas yağlanması dolayısıyla besi performansı üzerine öne sürölen etkilerinin et verimi yönünde yetiştirilen hayvanlar üzerinde de araştırılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Ahima RS, Kelly J, Elmquist KJ, Flier SJ. (1999). Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140: 4923-31.
2. Ahima RS, Flier JS. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-32.
3. Alashawkany AR, Shahroudi FE, Nassiry MR, Moussavi AH, Heydarpour M, Sadeghi B. (2008). Association of SNP in the exon II of leptin gene with milk and reproduction raits in Holstein Iranian Cows. *Biotechnology* 7(2): 347-350.
4. Almeida SEM, Almeida EA, Moraes JCF, Weimer TA. (2003): Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 106-113.
5. Andrews AT. (1986). *Electrophoresis*. 2nd ed. Clarendon press. Oxford. UK.
6. Anonim. (2009). Igenity Test Servisi. Erişim: (<http://www.igenity.com>). Erişim tarihi: 15.04.2009.
7. Anonim. (2010). INRA Biotechnology Laboratories Bovmap Database. Erişim: (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/mapping/common/intro2.pl?BASE=cattle>). Erişim tarihi: 05.03.2010.
8. Anonim. (2010). Howard Hughes Medikal Enstitüsü, Enstitü Haberleri. Erişim: (<http://www.hhmi.biz/news/friedman20090616.html>) Erişim Tarihi: 14.02.2010.
9. Anonim. (2010). Rockefeller Üniveristesi, Bilim İnsanları ve Araştırma. Erişim: (<http://www.rockefeller.edu/research/faculty/abstract.php?id=41>). Erişim Tarihi: 14.02.2010.
10. Ashwell MS, Da Y, Vanraden PM, Rexroad CE, Miller RH. (1998) Detection of putative loci affecting conformational type traits in an elite population of United States Holsteins using microsatellite markers. *J. Dairy Sci.* 81: 1120-1125.
11. Ashwell MS, Heyen DW, Da Y, Sonstegard TS, Tassel CP, Lewin HA. (2002). Detection of QTL affecting milk production in 6 Dairy Bull DANN Repository grandsire families. *Proc. XXVIII Int. Conf. on Anim. Gen.* August 11-15, 2002. Göttingen, Germany.
12. Banos G, Woolliams JA, Woodward BW, Forbes AB, Coffey MP. (2008). Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor and diacylglycerol acyltransferase (dgat1) gene loci on milk production, feed and body energy traits of UK Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91: 3190-3200.
13. Barb CR, Hausman GJ, Houseknecht KL. (2001). Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology* 21: 297-317.
14. Baskin DG, Breninger FJ, Schwartz MW. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of NPY neurons activated by fasting in the hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-33.

15. Blache D, Tellam RL, Chagas LM, Blackberry MA, Vercoe PE, Martin GB. (2000). Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J. Endocrinol.* 165: 625-637.
16. Block SS, Butler WR, Ehrhardt RA, Bell AW, Van Amburgh ME, Boisclair YR. (2001). Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.* 171: 339-348.
17. Blum WF. (1997). Leptin: the voice of the adipose tissue. *Horm Res* 48: 2-8.
18. Bottema CD, Sommer SS. (1993). PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutation and polymorphisms. *Mutat. Res.* 288: 93-102.
19. Brickell JS, Pollott GE, Clempson AM, Otter N, Wathes DC. (2010). Polymorphisms in the bovine leptin gene associated with perinatal mortality in Holstein-Friesian heifers. *J. Dairy Sci.* 93: 340-347.
20. Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, Winkelman-Sim DC, Schmutz SM. (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* 34: 105-116.
21. Buchanan FC, Van Kessel AG, Waldner C, Christensen DA, Laarveld B, Schmutz SM. (2003). An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *J. Dairy Sci.* 86: 3164-3166.
22. Chebel RC, Susca F, Santos JEP. (2008). Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91: 2893-2900.
23. Choudhary V, Kumar P, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A. (2005). DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Genetics and Molecular Biology* 28(4): 740-742.
24. Coleman DL. (1978). Obese And Diabetes: Two Mutant Genes Causing Diabetes-Obesity Syndromes in Mice. *Diabetologia* 14: 141-8.
25. Coppieters W, Riquet J, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Nezer C, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Georges M. (1998). A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mam. Genome.* 9: 540-544.
26. Dandapat A, Kumar D, Ghosh AK, Umapathi V. (2010). A note on a DNA polymorphism study of leptin gene in Sahiwal and crossbred cattle using PCR-RFLP technique. *Livestock Research for Rural Development* 22(1): Article Number 7.
27. Delavaud C, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. (2000). Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J. Endocrinol.* 165: 519-526.

28. Düzgüneş O, Eker M. (1955). Kontrol sağlımlarında en uygun aralık. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı. 5 (1): 1-29.
29. Ehrhardt RA, Slepatis RM, Siegal-Willott J, Van Amburgh ME, Bell AW, Boisclair YR. (2000). Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J. Endocrinol.* 166: 519-528.
30. Everett RW, Carter HW. (1968). Accuracy of test interval method of calculating Dairy Herd Improvement Association records. *J. Dairy Sci.* 51: 1936-1941.
31. Forhead AJ, Fowden AL. (2009). The hungry fetus? The role of leptin as a nutritional signal before birth. *J. Physiol.* 587:1145-1152.
32. Friedman JM, Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of the body weight in mammals. *Nature* 395: 763-70.
33. Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, Hoeschele I. (1994). Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139: 907-920.
34. Gonzalez RR, Simon C, Caballero-Campo P, Norman R, Char-donnens D, Devoto L, Bischof P. (2000). Leptin and reproduction. *Hum. Reprod.* 6: 290-300.
35. Haegeman A, van Zaveren A, Peelman LJ. (2000). New mutation in exon 2 of bovine leptin gene. *Anim. Genet.* 31: 79.
36. Henderson CR. (1984). *Applications of Linear Models in Animal Breeding.* University of Guelph. Guelph, Canada.
37. Hickey MS, Calsbeek DJ. (2001). Plasma leptin and exercise: Recent findings. *Sports Med* 31: 583-589.
38. Hillel J, Dunnington EA, Siegel PB. (1992). DNA markers in poultry breeding and genetic analyses. *Poultry Science* 4: 169-186.
39. Houseknecht KI, Raile CA, Matteri RI, Spurlock MF. (1999). The biology of leptin. *J Anim Sci.* 76(5): 1405-20.
40. Ingvarsten KL, Boisclair YR. (2001). Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21: 215-250.
41. Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N. (2008). Polymorphism within the Intron Region of the Bovine Leptin Gene in Iranian Sarabi Cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 2008, Vol. 44, No. 4, pp. 495-497.
42. Jawasreh KIZ, Awawdeh F, Rawashdeh I, Hejazeen F, Al-Talib M. (2009). The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and leptin genes in

- jordanian cattle population by using PCR-RFLP. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 1601-1606.
43. Kadokawa H, Blache D, Yamada Y, Martin GB. (2000). Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first post-partum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 405-411.
 44. Kaya A, Uzmay C, Akbaş Y, Kaya İ, Tümer S. (2002). Süt sığırlarında farklı süt verim denetim uygulamaları ve hesaplama yöntemleri üzerine araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci.* 26: 193-199.
 45. Kaygısız A, Vanlı Y, Özbeyaz C. (1997). İsviçre Esmeri sığırlarda kan protein polimorfizmi ile süt verimi arasındaki ilişkiler. *Trakya Bölgesi 2. Hayvancılık Kongresi.* 9-10 Ocak 1997. Tekirdağ, Türkiye.
 46. Kinghorn BP, Van Arendonk JAM, Hetzel J. (1994). Detection and use of major genes in animal breeding. *AgBiotech News and Information* 6 (12): 297-302.
 47. Kokot F, Ficek R. (1999). Effects of neuropeptide Y on appetite. *Miner Electrolyte Metab* 25: 303-305.
 48. Komisarek J, Antkowiak I. (2007). The relationship between leptin gene polymorphisms and reproductive traits in Jersey cows. *Pol J Vet Sci.* 10(4): 193-197.
 49. Konfortov BA, Licence VE, Miller JR. (1999). Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mamm Genome* 10(12): 1142-1145.
 50. Kononoff PJ, Deobald HM, Stewart EL, Laycock AD, Marquess FLS. (2005). The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. *J Anim Sci* 83: 927-932.
 51. Kozanoğlu H. (2002). *Hayvan Islahı ve Genetiğinde Kullanılan Moleküler Teknolojiler.* Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
 52. Kulig H. (2005) Association between leptin combined genotypes and milk performance traits of Polish Black-and-White cows. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 48(6): 547-554.
 53. Kulig H, Kmiec M, Kowalewska-Luczak I, Andziak G. (2009). Effect of leptin gene polymorphisms on milk production traits of Jersey cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(2): 143-146
 54. Lagonigro R, Wiener P, Pilla F, Woolliams JA, Williams JL. (2003). A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim. Genet.* 34: 371-374.
 55. Lara MAC, Gama LT, Bufarah G, Sereno JRB, Celegato EML, de Abreu UP. (2002). Genetic polymorphisms at the k-casein locus in Pantaneiro cattle. *Arch. Zootec.* 51: 99-105.

56. Liefers SC, te Pas MFW, Veerkamp RF, van der Lende T. (2002). Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 85: 1633-1638
57. Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MFW, Delavaud C, Chilliard Y, van der Lende T. (2003). Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cows. *J Dairy Sci.* 86(3): 799-807.
58. Lien S, Sundvold H, Klungland H, Våge DI. (1997). Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). *Animal Genetics* 28: 238-246.
59. Lin CY, Sabour MP, Lee AJ. (1992). Direct typing to milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: A review. *Animal Breeding Abstracts.* 60: 1-10.
60. Lindersson M, Andersson-Eklund L, Koning DJ, Lunden A, Maki-Tanila A, Andersson L. (1998). Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome 4. *J. Dairy Sci.* 81: 1454-1461.
61. Madeja Z, Adamowicz T, Chmurzynska A, Jankowski T, Melonek J, Switonski M, Strabel T. (2004). Short communication: effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. *J. Dairy Sci.* 87: 3925-3927
62. Magni P, Motta M and Martini L. (2000). Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regulatory Peptides* 92: 51-56.
63. Marle-Köster EV, Nel LH. (2003). Genetic markers and their application in livestock breeding in South Africa: A Review. *South African Journal of Animal Science* 33(1): 1-10.
64. Minitab Statistical Software (2009). Minitab for Windows 15.1.30.0. Minitab Inc. State College, PA, USA.
65. Moussavi AH, Ahouei M, Nassiry MR, Javadmanesh A. (2006). Association of leptin polymorphism with production, reproduction and plasma glucose level in Iranian Holstein cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(5): 627.
66. Nassiry MR, Shahroudi FE, Mousavi AH, Sadeghi B, Javadmanesh A. (2008). The diversity of leptin gene in Iranian Native, Holstein and Brown Swiss cattle. *African Journal of Biotechnology* 7(15): 2685-2687.
67. Nicholas FW. (1996). *Introduction to Veterinary Genetics.* Oxford University Press, Oxford, UK.
68. Nielsen V, Guldbrandtsen MS, Jensen J, Sorensen DA, Bendixen C. (2002). Proc. XXVIII Int. Conf. on Anim. Gen. August 11-15, 2002. Göttingen, Germany.
69. Öztabak K, Toker NY, Ün C, Akış I, Mengi A, Karadağ O, Soysal D. (2006). Leptin Gene Allele Frequencies of Turkish Grey, South Anatolian Red and East Anatolian Red cattle. Joint Scientific Symposium of the Veterinary Faculties of Ludwig Maximilians Universitaet München and Istanbul University. October 5-6, 2006. İstanbul, Turkey.

70. Palmiter RD, Frickson JC, Hollopeter G, Raraban SC, Schwartz MW. (1998). Life without NPY. *Recent Prog Horm Res* 53: 163-99.
71. Pfister-Genskow M, Hayes H, Eggen A, Bishop MD. (1996). Chromosomal localization of the bovine obesity (OBS) gene. *Mamm. Genome* 7: 398-399.
72. Pomp D, Zou T, Clutter AC, Barendse W. (1997). Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *J. Anim. Sci.* 75(5): 1427.
73. Ron M, Band M, Yanai A, Weller JL. (1994). Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Animal Genetics* 25(4): 259-264.
74. Sadeghi M, Babak MMS, Rahimi G, Javaremi AN. (2008). Effect of leptin gene polymorphism on the breeding value of milk production traits in Iranian Holstein. *Animal* 2(7): 999-1002.
75. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sa'nchez-Margalet V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell. Immunol.* 194: 6-11.
76. Sargent FD, Lytton VH, Wall OG. (1968). Test interval method of calculating Dairy Herd Improvement Association records. *J. Dairy Sci.* 51: 170-179.
77. Schenkel FS, Miller SP, Ye X, Moore SS, Nkrumah JD, Li C, Yu J, Mandell IB, Wilton JW, Williams JL. (2005). Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci.* 83: 2009-2020.
78. Schwerin M, Brockmann G, Vanselow J, Seyfert HM. (1995). Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement. *Arch Tierz Dummerstorf* 38: 21-31.
79. Silva LFP, VandeHaar MJ, Weber Nielsen MS, Smith GW. (2002). Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 85: 3277-3286.
80. Sonstegard TS, Van Tassel CP, Ashwell MS. (2001). Dairy cattle genomics: tools to accelerate genetic improvement? *J. Anim. Sci.* 79(E. Suppl.): 307-315.
81. Vaiman D. (1999). *The Molecular Genetics of Cattle*. "The Genetics of Cattle" R Fries, A Ruvinsky (Editors). CABI Publishing. CAB International. UK.
82. Vanlı Y. (1987). Atatürk Üniversitesi Koyun Sürülerinde Beta-Globulin Polimorfizminin Genetiği ve Kantitatif Karakterlerle Bağlantısı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü (Profesörlük Takdim Tezi). Erzurum.
83. Walsh B. (2000). Minireview: Quantitative Genetics in the Age of Genomics. *Theor Pop Biol* 59: 175-184.
84. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-32.

85. Zwierzchowski L, Krzyzewski J, Strzalkowska N, Siadkowska E, Ryniewicz Z. (2002). Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 20: 213-227.

8. ÖZGEÇMİŞ

14.06.1979 tarihinde Manisa'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Denizli'de tamamladım. 1998 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldum. Aynı yıl F.Ü. Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladım. 2004 yılında F.Ü. Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi (50/d) olarak göreve başladım. 2010 yılında F.Ü. Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi (33/a) olarak atandım. Halen F.Ü. Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım.