

157577

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'DEKİ BAZI KOYUN İRKLARININ GENETİK YAPILARININ
MİKROSATELLİTLERLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN
Zafer BULUT

DANIŞMAN
Prof.Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. İnci TOGAN

KONYA-2004

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI
BAP Proje No: 2001/097

TÜRKİYE'DEKİ BAZI KOYUN İRKLARININ GENETİK YAPILARININ
MİKROSATELLİTLERLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

ZAFER BULUT

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 14 / 10 / 2004 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği* ile kabul edilmiştir. (S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No:)

Tez Jürisi:

Jüri başkanı Prof. Dr. İnci TOGAN

İnci Togan

Danışman Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

Mehmet Nizamlıoğlu

Üye Prof. Dr. Behiç SERPEK

Behiç Serpek

Üye Prof. Dr. Şeref İNAL

Şeref İnal

Üye Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR

Nuri Başpınar

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	I-IV
Tablo Listesi.....	V
Şekil Listesi	VI
Resim Listesi	VII
Kısaltmalar	VIII
1. GİRİŞ.....	1-3
2. LİTERATÜR BİLGİ.....	4-46
2.1. Koyunun Önemi ve Evcilleştirilmesi.....	4
2.1.1. Evcilleştirmenin genetik ve fizyolojik etkileri.....	5
2.2. Türkiye’de Koyunculuk Islah Çalışmaları.....	6
2.3. Gen Kaynaklarının Korunması ve Önemi.....	9
2.4. Genetik Çalışmalar ve Biyokimyasal Genetik.....	11
2.5. Populasyonların Genetik Yapılarının Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi.....	13
2.6. Moleküler Genetik Analiz Metotları.....	16
2.6.1. Enzim elektroforezi.....	16
2.6.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction).....	19
2.6.2.1. Hedef DNA (Target DNA).....	20
2.6.2.2. DNA polimeraz (DNA polymerase).....	20
2.6.2.3. Primerler (Primers).....	21
2.6.2.4. Deoksitükleotid trifosfatlar (Deoxynucleosid triphosphates, dNTPs).....	22
2.6.2.5. Reaksiyon solüsyonu (Tampon).....	22
2.6.2.6. PCR’ın çalışma prensibi.....	23
2.6.2.6.A. Hedef DNA’nın denatürasyonu.....	24

2.6.2.6.B. Primerlerin bağlanması.....	24
2.6.2.6.C. Polimerizasyon.....	24
2.6.2.6.D. PCR sonuçlarının değerlendirilmesi.....	25
2.6.3. DNA dizi analizi (DNA sequencing).....	25
2.6.4. Kantitatif özellik lokusları (Quantitative Trait Loci, QTLs).....	26
2.7. Moleküler Markerlar.....	27
2.7.1. Protein markerları.....	28
2.7.2. DNA markerları.....	28
2.7.2.1. Restriksiyon enzimleri uzunluk polimorfizmi (RFLP).....	29
2.7.2.2. Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP).....	29
2.7.2.3. Rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı (RAPD).....	30
2.7.2.4. Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP).....	31
2.7.2.5. Dizisi etiketlenmiş alanlar (STS).....	33
2.7.2.6. Tek nükleotit polimorfizmleri (SNPs).....	33
2.7.2.7. Mitokondrial DNA (mt DNA).....	33
2.7.2.8. Değişken sayılı ardarda tekrarlar (VNTR).....	34
2.7.2.9. Basit dizi tekrarları veya mikrosatellitler (SSR veya STR).....	35
2.8. İstatistiksel Analizler.....	36
2.9. Koyun ve Diğer Bazı Evcil Hayvanlarda Yapılan Genetik Çalışmalar.....	37
2.10. Çalışmanın Amaçları.....	45
3. MATERYAL ve METOT.....	47-59
3.1. Materyal.....	47
3.2. Metot.....	48

3.2.1. Kan örneklerinin toplanması.....	48
3.2.2. Kandan DNA ekstraksiyonu.....	49
3.2.3. DNA bantlarının gözlemlenmesi.....	51
3.2.4. Absorbans tayini.....	51
3.2.5. PCR safhası.....	52
3.2.6. PCR ürünlerinin varlığının tespiti.....	54
3.2.7. Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile PCR ürünlerinin değerlendirilmesi.....	54
3.2.7.1. Cam plakaların temizlenmesi.....	54
3.2.7.2. Poliakrilamit jelin hazırlanışı.....	55
3.2.7.3. Poliakrilamit jelin dökülmesi.....	55
3.2.7.4. Numunelerin jele yüklenmesi ve yürütme işlemi.....	56
3.2.8. Otoradyografi ile DNA bantlarının görüntülenmesi ve bant uzunluklarının hesaplanması.....	56
3.3. Veri Analizinde Kullanılacak İstatistiksel Metotlar.....	57
4. BULGULAR.....	60-72
4.1. DNA Ekstraksiyonu Sonuçları.....	60
4.2. Populasyon İçi Genetik Varyasyon ve Heterozigotluk Düzeyleri.....	60
4.3. F Parametreleri.....	62
4.4. Filogenetik İlişkileri Gösterir Şema Ağaçlar.....	63
4.5. Faktöriyel Birleştirici Analiz Sonuçları (Factorial Correspondence Analysis; FCA).....	66
4.6. Bireylerin Hangi Populasyona Ait Olduğunu Belirleme Testi (Assignment Test).....	66
4.7. Sunulan Çalışmadaki Bulguların Kıvrıcık ve Dağlıç Populasyonlarıyla Birlikte Değerlendirilmesi.....	67
4.7.1. Populasyon içi genetik varyasyon ve heterozigotluk düzeyleri.....	67
4.7.2. F parametreleri.....	68

4.7.3. Filogenetik ilişkileri gösterir şema ağaçlar.....	69
4.7.4. Faktöriyel birleştirici analiz sonuçları (Factorial Correspondence Analysis; FCA)..	71
4.7.5. Bireylerin hangi populusyona ait olduğunu belirleme testi (Assignment Test).....	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	73-92
5.1. Genetik Çeşitlilik ve Hardy-Weinberg Dengesi.....	75
5.2. Populusyonlar ve Bireyler Arasındaki Genetik Farklılıklar.....	83
6. ÖZET.....	93-94
7. SUMMARY.....	95-96
8. LİTERATÜR LİSTESİ.....	97-110
9. ÖZGEÇMİŞ.....	111
10. TEŞEKKÜR.....	112
11. EKLER.....	113-126

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Kan örnekleri sayıları ve örneklerin alındığı yerler.....	48
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ırklar için yapılan melezlemeler.....	48
Tablo 3.3. OarFCB20, OarJMP29 ve OarJMP58 lokuslarına ait PCR işleminde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	53
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan mikrosatellitlere ait bilgiler.....	53
Tablo 3.5. Mikrosatellit bölgelerine ait PCR koşulları.....	53
Tablo 4.1. Populasyonlarda Görülen Genetik Çeşitlilik.....	62
Tablo 4.2. F_{IS} Değerleri Tablosu.....	62
Tablo 4.3. F_{ST} ve D_A Değerleri Tablosu.....	63
Tablo 4.4. Populasyonlarda Görülen Genetik Çeşitlilik.....	67
Tablo 4.5. F_{IS} Değerleri Tablosu.....	68
Tablo 4.6. F_{ST} ve D_A Değerleri Tablosu.....	68
Tablo 5.1. Bazı evcil hayvan populasyonlarında mikrosatellitler ile yapılan çalışmaların karşılaştırılması	77

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. AFLP Prosedürü.....	32
Şekil 2.2. DNA'daki mikrosatellit tekrarları [(CA) ₈ ve (GT) ₈].....	36
Şekil 4.1. Neighbor Joining Metodu İle D _A Ölçütü Kullanılarak Çizilen Ağaç.....	63
Şekil 4.2. ASD ile Neighbor Joining Metodu Kullanılarak Çizilen Ağaç.....	65
Şekil 4.3. Neighbor Joining Metodu İle Çizilen Ağacın Başka Bir Görünümü.....	65
Şekil 4.4. FCA Grafiği.....	66
Şekil 4.5. Neighbor Joining Metodu İle D _A Ölçütü Kullanılarak Çizilen Ağaç.....	69
Şekil 4.6. Neighbor Joining Metodu İle Çizilen Ağacın Başka Bir Görünümü.....	70
Şekil 4.7. ASD ile Neighbor Joining Metodu Kullanılarak Çizilen Ağaç.....	71
Şekil 4.8. FCA Grafiği.....	72

RESİM LİSTESİ

Resim 4.1. DNA'nın % 0,6'lık agaroz jeldeki görünümü.....	60
Resim 4.2. OarFCB20 lokusuna ait allellerin otoradyografik görünümü.....	60
Resim 4.3. OarJMP29 lokusuna ait allellerin otoradyografik görünümü.....	61
Resim 4.4. OarJMP58 lokusuna ait allellerin otoradyografik görünümü.....	61



VIII

KISALTMALAR

- AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism
APS : Ammonium persulphate
cDNA : Complementer DNA
DİE : Devlet İstatistik Enstitüsü
DNA : Deoxyribonucleic Acid
dNTP : Deoxynucleosid triphosphates
EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acide
FAO : Food and Agricultural Organization of the United Nations
FCA : Factorial Correspondence Analysis
KETİ : Konya Ereğli Tarım İşletmesi
KGTİ : Konya Gözli Tarım İşletmesi
KHMAE : Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü
MHAE : Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü
mtDNA : Mitokondrial DNA
NJT : Neighbor Joining Tre
OD : Optik Dansite
PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR : Polymerase Chain Reaction
QTL : Quantitative Trait Loci
RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA : Ribonucleic Acid
RT : Reverse Transcriptase
SDS : Sodium dodecyl sulphate
SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism
SSR : Simple Sequence Repeat
STR : Short Tandem Repeat
STS : Sequence-Tagged Sites
TBE : Tris – Borik Asit - EDTA
TE : Tris -EDTA
TEMED : N,N,N',N'-tetratetramethylethylendiamine
TİTİ : Tekirdağ İnanlı Tarım İşletmesi
TNE : Tris – NaCl - EDTA
VNTR : Variable Number of Tandem Repeats

1. GİRİŞ

Beslenme, hızla büyüyen ve gelişen dünyada insanlığın vazgeçilmez önceliklerinden birisidir. Hayvansal ürünler dengeli beslenmede oldukça önemli bir yere sahiptir. Çiftlik hayvanlarının et ve sütlerinin yanında yapağı, deri ve gübre gibi ürünlerinden de yararlanılmaktadır. Bu yüzden hayvancılık sektörü dünya ülkelerinin ekonomilerinde üst sıralarda yerini alır.

Sosyo-ekonomik ve coğrafi özellikleri bakımından hayvancılık için çok elverişli ülkelerden biri olan ülkemizde, Devlet İstatistik Enstitüsü (DİE)'nin 2001 yılı verilerine göre 10.548.000 baş sığır, 26.972.000 baş koyun ve 7.022.000 baş keçi mevcudu ile dünya ülkeleri arasında önemli bir yere sahiptir (DİE 2002).

Hayvancılıkta temel hedef birim hayvandan alınan verim miktarını artırmaktır. Bu da ancak ıslah çalışmalarıyla mümkün olmaktadır. Koyunculukta yapılan ıslah çalışmaları saf yetiştirme ve melezleme yoluyla olmaktadır. Ülkemizde uygulanan tarım politikalarında genelde hayvancılık tarımın bir alt kolu olarak değerlendirilmiş ve gereken özen ve önem gösterilememiştir. Bu yüzden de hayvancılığın ekonomimiz içerisindeki payı son yıllarda giderek düşmüştür.

Yerli koyun ırklarımız aynı zamanda bizim yerli gen kaynaklarımızdır. Son yıllarda birçok ülkede hayvan gen kaynaklarını koruma konusundaki çalışmalarda hızlı bir artış gözlemlenmektedir.

Gen kaynaklarının korunması; para, insan gücü, ve iyi bir organizasyon gerektirmektedir. Gen kaynaklarının korunma nedenlerinden bazıları ; yerli ırklar, tarıma elverişli olmayan arazileri kullanarak, bu alanları et, süt ve güç kaynağına dönüştürürler. Yerli ırklar genetik çeşitliliğin devamını sağlar ve gelecekte oluşturulacak yeni tipler için temel genetik materyali oluştururlar. Ayrıca melez tiplerde ortaya çıkabilecek çeşitli

duyarlılıklara (hastalık, yaşama gücü vs.) karşı direncin artırılmasında yerli ırklar kullanılabilir (Soysal ve ark 2001).

Çok yönlü verime sahip olan (et, süt, yapağı, deri, gübre) ırklarımıza sahip çıkılarak, et, süt, yapağı verimlerini hızla artıracak ve yetiştiricilerin koyunlardan daha fazla ekonomik gelir sağlayacağı stratejiler geliştirilmelidir.

Biyoteknolojinin her alanda hızla geliştiği günümüzde, bu teknolojinin hayvancılığımıza da aynı hızla aktarılması kaçınılmaz hale gelmiştir.

İslah çalışmalarında genellikle bazı genetik özellikler hayvanların dış görünüşüne ve verimlerine bakılarak seçilmekteyken, genetik alanında sağlanan gelişmeler sayesinde artık DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) düzeyinde istenilen özellikler seçilerek hayvanlara aktarılabilir.

Biyoteknoloji sayesinde ıslah çalışmaları hem daha kısa sürede hem de etkili olarak yapılabilir.

Bütün canlılarda hayatsal olayların şifresini taşıyan bir molekül olan DNA, hücrenin kontrol merkezi ya da kütüphanesi olarak tanımlanabilir. DNA'nın yapı taşı nükleotid denilen moleküllerden oluşmaktadır. DNA'da depolanan ve nesilden nesile belirli mekanizmalarla aktarılan bilgiler, bir hücre veya organizmanın oluşumu ve devamlılığı için gerekli bilgilerin tümünü içerir (Konuk ve Babaoğlu 2001). Hücreler hem küçük hem de karmaşık yapıları olduklarından moleküler organizasyonlarını ve içerdikleri moleküllerin hücresel işlevlerini belirlemek üzere etkileşimlerini anlamak oldukça zordur. Moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler moleküllerin araştırılmasına olanak veren yeni yöntemlerin geliştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu yöntemler, temelde biyokimyasal ve biyofiziksel tekniklerin hücre ve dokulara uygulanmalarının sonucudur. Ayrıca, son 25-30 yılın olağanüstü teknolojisi olan genetik mühendisliği (rekombinant DNA teknolojisi) nükleik asit ve protein moleküllerinin hücrelerden bol miktarda elde edilmelerine olanak vermesi

nedeniyle, bu moleküllerle yapılacak çalışmalara büyük kolaylıklar sağlamış ve moleküler biyolojideki bilgi birikiminin hız kazanmasına büyük ölçüde yardımcı olmuştur. Zaten moleküler biyoloji de, önceleri birbirinden ayrı olarak düşünülen biyokimya, hücre biyolojisi ve genetik gibi bilim dallarındaki gelişmeler ve bunların birbirine karışmaları sonucu ortaya çıkmıştır (Temizkan 2004).

Genetik mühendisliği alanındaki çalışmaların temelini DNA ve RNA oluşturmaktadır. Bitki, insan, hayvan ve gıda biyoteknolojisinin günümüzde ulaştığı ve ileride ulaşacağı sonuçlar DNA'nın ne kadar bilinebilmesi ve değiştirilebilmesiyle doğru orantılı olarak gerçekleşecektir. DNA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri ve bu özellikleri kullanarak DNA izolasyonu, zincirlerin birbirlerinden ayrılması, enzimlerle çeşitli fragmentlerin ayrılıp tekrar birleştirilmesi ve belirli bir fonksiyona sahip bir DNA parçasının (gen) bir hücreden başka bir hücreye, bir canlıdan başka bir canlıya aktarılması en çok karşılaşılan uygulamalardır (Konuk ve Babaoğlu 2001).

Mikrosatellitler genom boyunca 2-5 bp (baz çifti) uzunluğunda tekrarlarla dağılmış basit dizi tekrarları olup en sık görülen ve tekrarlanan DNA biçimleridir. Yüksek derecede polimorfiktirler ve önemli bir genetik işaretleme (marker) sistemini oluştururlar. Bu dizileri incelemek için iki aşama gerekir. Bunlar; PCR ile çoğaltma ve elektroforez tekniğiyle görüntüleme işlemleridir. Bu özellikleriyle populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan ideal markerlardan biridir (Goldstein and Schlötterer 1998).

Sunulan çalışmada da mikrosatellitler kullanılarak yerli ve melez koyun ırklarında genetik çeşitlilik, populasyonların genetik olarak birbirlerine yakınlıkları (veya uzaklıkları) araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Koyunun Önemi ve Evcilleştirilmesi

Dünyada yaklaşık 1.028 milyon civarındaki sayısı (FAO 2003) ile koyun, tarımsal ve hayvansal faaliyetler açısından, ekonomik olarak çok değerli bir çiftlik hayvanıdır. Çeşitli ülkelerde başka amaçlar için kullanılmayan mera ve otlaklar koyun yetiştiriciliği ile uygun bir biçimde değerlendirilebilmektedir. Koyunlar, bu alanları insanların beslenmesi için kullanılan et ve süt gibi besin ürünlerine dönüştürürler. Ayrıca koyunlar insanlar için gerekli olan giyim eşyalarının ham maddesi olan yapağı, deri ve tarımda kullanılan gübre gibi ürünleri de üretirler (Yalçın 1990).

Koyun yetiştiriciliği genellikle bütün dünya ülkelerinde yaygın halde olup, bazı ülkelerde en önde gelen üretim kolunu oluşturur. Koyun yetiştiriciliği, iklim ve tabiat şartları ile teknik ve ekonomik imkanlar ölçüsünde büyük sürüler halinde, orta veya küçük gruplar şeklinde veya birkaç baş olarak yapılır. Dünyada hiç ağılda yaşamayan milyonlarca koyun yetiştirildiği gibi, yılın önemli kısmını veya tamamını ağılda geçiren yetiştirme şekilleri de vardır (Akçapınar 1994).

İlk evcilleştirilen hayvan türlerinden birisi olan koyun çok yönlü verim özelliklerine (et, süt, yapağı, deri, gübre) sahiptir. Bu yüzden belki de hiçbir evcil hayvan türü koyun kadar değişik amaçlarla kullanılmamıştır (Piper 1997).

Koyun, Omurgalılar (Vertebrata) grubunun memeliler (Mammalia) sınıfına bağlı Tırnaklılar (Ungulata) takımının, Bovidae familyasına dahil olan Ovis cinsine (genus Ovis) bağlı bir türdür. Evcil koyunun tür adı Ovis aries'dir (Yalçın 1990).

Mevcut bilgilere göre koyun Yakın Doğu'da özellikle Akdeniz'in kuzey doğusundaki bölgede evcilleştirilmiştir. Arkeolojik bilgiler, evcil koyunun bundan 10 750 yıl önce bugünkü Irak topraklarında, 9000 yıl önce Anadolu'da ve 7000 yıl önce de Mısır'da mevcut olduğunu göstermektedir (Yalçın 1986). Avrupa'daki Neolitik Devir insanının

evcilleşmiş koyuna sahip olduğu kesinlikle bilinmektedir. Dünyada var olan evcil koyun ırklarının büyük çoğunluğunun *Ovis mussimon* (Muflon Koyunu), *Ovis orientalis vignei* (Urial Koyunu) ve *Ovis ammon* (Argali Koyunu) isimli yabancı koyunlardan kök aldıkları kabul edilmektedir. Bunlardan *Ovis mussimon* diye adlandırılan Muflon Koyunu, Sardinya ve Korsika adalarında hala yabancı olarak yaşamaktadır. *Ovis orientalis vignei* diye adlandırılan Urial Koyunu, Anadolu ve Türkistan'da bulunmuştur. *Ovis ammon*'un ise, Hazar Denizi doğusundaki bölgede yabancı olarak yaşadığı bildirilmektedir. Bu yabancı koyun ırklarının evcilleştirilmesi ile elde edilen koyun ırkları, daha sonraları melezlemelere tabi tutularak başka koyun ırkları elde edilmiştir. Bu nedenle, bugün dünyada var olan evcil koyun ırklarının hangisinin hangi yabancı koyundan kökenini aldığını söylemek oldukça zordur (Yalçın 1990, Maciejowski and Zieba 1982)

2.1.1. Evcilleştirmenin genetik ve fizyolojik etkileri

Evcilleştirme ile genetik evrim mekanizmalarının (seleksiyon, mutasyon, rastlantısal salınım ve göç) bazıları insan eliyle yönlendirilerek insanların kullanımına uygun popülasyonların elde edilmesi hızlı bir şekilde olmuştur. Hayvanların morfolojik ve fizyolojik özelliklerinde meydana gelen değişiklikler, büyük ölçüde bunların bu özellikleri yönünden önceden sahip oldukları varyasyonun bir sonucudur. Çevre değişiklikleri ve rastlantısal olaylar genetik farklılıklara izin vermiş ve farklı bireylerin (varyasyonlar) sayısı artmış, seleksiyon ve istenmeyen verim karakterlerinde şansın etkisi azalmıştır. İnsan bu varyasyonlardan faydalanarak kendi özelliklerine ve ekonomik yararlarına uygun fertleri seçip bunları damızlıkta kullanmış ve böylece yabancı koyunlara göre oldukça farklılık gösteren evcil koyun ırkları ortaya çıkmıştır (Maijala 1997, Akçapınar 1994).

Evcilleştirme ile doğal seleksiyon etkisinin azaltılması yanı sıra, farklı evcil koyun ırkları arasındaki ilişkilerin daha yakınlaşması ve buna bağlı olarak değişik ırk ve tiplerin ortaya çıkması sağlanmıştır. Tüm bu işlemler evcil koyunlarda yeni genler yaratmamasına

karşın, var olan genler arasından istenilen uygun genlerin frekansını artırmıştır. Ancak evcil hayata geçişte çevre şartlarında meydana gelen önemli değişikliklerin evcil yaşamda sınırlı da olsa etkisi olmuştur (Akçapınar 1994).

Evcilleştirme ile koyunun birçok özelliği değişmiş, evcil koyun ile yabani koyunlar arasında özellikle kemik yapıları, yapağı özellikleri, boynuz yapıları ve davranışlarında büyük farklılıklar ortaya çıkmıştır. Yabani yaşamda uzun ve zarif yapıda, geniş boynuzlu, kısa kuyruklu, renkli yapağılı, yapağı kalitesi düşük koyunların evcilleştirme ile birlikte bir yandan boyları kısalmış, boynuzlar küçülmüş ve kuyruk yapıları değişirken, diğer yandan yapağının tek renge dönüştüğü ve kalitesinin yükseldiği görülmüştür. Keza seleksiyon ve ıslah çalışmaları ile evcil koyunlarda bir yandan yemden yararlanma gücünün artışına bağlı olarak etçi ırklar ortaya çıkarken, diğer yandan çoklu yavru doğumlarına bağlı olarak üreme performansları ve süt verimleri de yükselmiştir (Maijala 1997, Akçapınar 1994).

Evcilleştirme sonucu geliştirilen ırklar tek yönlü (et, süt, yapağı) ya da çok yönlü (et-süt, et-yapağı) olabilirler. Özellikle tek yönlü yetiştirilen ırklarda verim artarken, çevre şartlarına dayanma ve hastalıklara direncin düştüğü gözlenmiştir. Evcilleştirme tüm hayvanlarda olduğu gibi koyunların da zeka yapılarını etkilemiş ve insanların yönetmesine bağlı olarak koyunların kendilerini yönetmeleri yeteneği ve bunu izleyerek zeka gerilemiştir (Akçapınar 1994).

2.2. Türkiye’de Koyunculuk Islah Çalışmaları

Koyunculuk sektörüne bakıldığında 1982 yılı istatistiklerine göre 49,6 milyon olan koyun varlığımızın 1992 yılında yaklaşık 39,4 milyon, 2001 yılı istatistiklerine göre ise 26,9 milyona kadar gerilediği bildirilmektedir (DİE 2002). Sayısal açıdan çarpıcı görülen bu azalmaya karşın, bu kaybı kapatabilecek koyunculuk ıslah çalışmalarının yeterli olmadığı ve üretimde istenilen artışlara ulaşamadığı görülmektedir. Türkiye’de bulunan koyun sayısının %97’si gibi büyük bir bölümünü yerli koyun ırkları, %3’lük bir bölümünü ise,

başta Merinos ve melezleri olmak üzere yabancı koyun ırkları oluşturmaktadır (Yalçın 1990). Artan nüfus, sosyal ve ekonomik gelişmeler hayvansal ürünlere olan talebi artırmaktadır. Bu talebin karşılanmasında, hayvan başına elde edilen verimlerin artırılması büyük bir önem taşımaktadır. Verim artışı genotipin ve çevre şartlarının iyileştirilmesi ile sağlanabilir. Koyunculukta ıslah çalışmaları, koyunlardan daha fazla et, yapağı, süt vb. ürünlerin elde edilmesi amacıyla hayvanların genetik yapılarının iyileştirilmesidir. Bu amaçla koyunculukta kullanılan en iyi yöntemi, birkaç özelliğin birlikte geliştirilebilmesi, kısa sürede sonuç alınabilmesi, yerli ırkların yüksek verimli ırklara çevrilebilmesi, iki veya daha fazla ırkta bulunan iyi özelliklerin yeni bir genotip (farklı ırkların melezlenmesiyle) ya da ırkta (aynı ırkın yüksek verimli bireylerinin çiftleştirilmesiyle) bir araya getirilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı melezleme çalışmaları oluşturmaktadır (Ünal ve Akçapınar 1996).

Saf yetiştirme genelde yerli ırkların geliştirilmesi ve ırk özelliklerinin korunması için yapılmaktadır. Melezleme de ise iki ayrı ırk çiftleştirilerek ya yeni bir ırk oluşturulmaya çalışılır ya da verim özellikleri yüksek ırkın özelliklerini düşük verimli ırklara aktarmak için yapılır. Melezleme de Türkiye’de yabancı ırk olarak daha çok Merinos ırkları üzerinde durulmuştur. Ayrıca Tarım Bakanlığı’na bağlı araştırma kuruluşlarında ve değişik üniversitelerde melezleme çalışmaları yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçların ülkemizdeki koyun popülasyonlarına tam olarak aktarıldığı söylenemez. Yani araştırma sonuçları kütüphane raflarında kalmaktan daha ileriye gitmemektedir.

Türkiye’de Cumhuriyetin kuruluşundan bu yana koyun ıslahı konusunda özellikle melezlemeye dayanan birçok çalışma yapılmıştır. Bunlar içerisinde Merinos’larla melezleme, hem ilki oluşturmakta hem de uzun yıllar sürdürülen ısrarlı çalışmalar, bugün

Türkiye'nin verimi yüksek kültür ırkı sayılabilecek bir ırk yani Türk Merinosu ortaya konmuştur (Tekin ve ark 2001).

Merinos ile yerli ırklar arasında melezlemeler yapılarak iki değişik Türk Merinosu tipi geliştirilmiştir. Bunlar; Karacabey Merinosu ve Orta Anadolu Merinosu'dur. Karacabey Merinosu 1935 yılından itibaren Karacabey Harası'nda ve çevresindeki illerde, Alman Et Merinosu koçları kullanılarak Kıvırcık ırkı sürülerinin melezleme ile Merinos'a çevrilmesi ve aynı zamanda, melez kuşaklara et ve yapağı yönünden seleksiyon uygulanması ile elde edilmiştir. Orta Anadolu (Konya) Merinosu ise 1952 yılından itibaren Konya Harası'nda yapılan Et Merinosu x Akkaraman melezlemesi ile elde edilen F1, MG1, MG2 melezlerinin kuzu verim, yapağı verim ve kalitesi yönünden seçilerek kendi aralarında yetiştirilmesi ile geliştirilmiştir (Yalçın 1990).

1986 yılında Türkiye'de et koyuncululuğunu geliştirmek amacı ile geniş çaplı bir ülkesel proje başlatılmıştır. Bu amaçla İngiltere, Almanya ve Fransa'dan 6 etçi ırkın koç ve koyunları getirilmiştir. Bugüne kadar bu ırklar ile de saf yetiştirme ve melezleme denemeleri yapılmış ve halen yapılmaktadır. Bugüne kadar konuyla ilgili dikkate değer çalışmalar Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü (KHMAE) ve Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü (BKAE)'nde yürütülmektedir. KHMAE'nde ilk çalışmalar 1989 yılında, enstitüye Alman Siyah Baş (ASB), Hampshire Down (HD) ve Lincoln (L) etçi ırklarının getirilmesi ile başlamıştır. Burada Konya Merinosu her üç kültür ırkı ile melezlenirken, Akkaraman (Akk) ve İvesi (İv) sadece ASB ve HD ile melezlenmeye başlanmıştır. Birkaç yıl F1 elde edildikten sonra G1'ler elde edilmiştir (Tekin ve ark 2001).

Konya Merinosu'nun ASB ve HD etçi ırkları ile melezlenmesinde de F1'ler, ASB G1 ve HD G1'ler elde edilmiştir. Bu iki baba hattından elde edilen melezlerin birbirinden ayırt edilemeyecek kadar benzediği bildirilmektedir. Ayrıca Akçapınar (2000)'in bildirdiğine

göre ASB'nin genotipinde HD'da bulunmaktadır. Bu yüzden bu 2 baba hattından gelen melezler kendi arasında dengeli bir tohumlama ile **Hasmer** tipi elde edilmiştir [HD(F1) x HD(G1) x ASB(F1) x ASB (G1)]. HASMER tipi için açıklanan gerekçe ve düşünceler ile ASB ve HD'un Akkaraman ile olan melezlerine **Hasak**, İvesi ile olan melezlerine de **Hasiv** ismi verilmiştir (Tekin ve ark 2001).

2.3. Gen Kaynaklarının Korunması ve Önemi

Dünyada birçok faktöre bağlı olarak hayvan gen kaynaklarının tür, ırk ve gen düzeyinde azalması veya yok olması nedeni ile biyolojik sistemlerin temel özelliği olan genetik varyasyon (çeşitlilik) giderek önemli ölçüde azalmaktadır (Ertuğrul ve Akman 2000). Genetik varyasyonun azalmasına ve nesillerin tükenmesine neden olabilen iki önemli etkenden söz edilebilir. Bunlardan ilki, son yıllarda tüketici tercihlerindeki değişikliğin azalması nedeni ile birçok ırk yerine, tek bir ırkın yetiştiriciliğinin yaygınlaşması ve artmasıdır. İkinci önemli neden ise, ekonomik önemi olan verim özelliklerini artırmak için rastgele melezleme tekniklerinin uygulanması ile ırklardaki orijinal genetik bileşimin değişmesi ve dolaylı olarak da orijinal gen kaynaklarının hızla kaybolmasıdır (Soysal ve ark 2001).

Gen kaynaklarının korunması ile ilgili görüşlerin geçmişi 1928 yılına kadar uzanmaktadır. Bu tarihte Sovyet Botanikçisi Vavilov ilk bitki gen bankasını oluşturmuştur. Hayvan gen kaynaklarının korunması gerektiği görüşü ise ilk kez 1959 yılında Chicago'da düzenlenen bir sempozyumda ortaya atılmış, daha sonra çeşitli kongrelerde konunun önemine ilişkin tebliğler ard arda sunulmaya başlanmıştır. Bu uyarılar doğrultusunda ve çeşitli ülkelerde son yıllarda iyiden iyiye yaygınlaşan çevre koruması akımlarının da etkisi ile ilgili girişimlerin hız kazandığı bildirilmiştir (Ertuğrul ve Aşkın 1988).

Özellikle bu yıllardan sonra Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Birleşmiş Milletler Çevre Projesi (UNEP) ve Avrupa Zootekni Federasyonu (EAAP) gibi

ulusal ve uluslar arası örgütler tarafından hayvan gen kaynaklarının saptanması, korunması ve değerlendirilmesi alanlarında projeler yürütülmüş ve yürütülmektedir (Ertuğrul ve Akman 2000).

Çiftlik hayvanlarının ıslahı bir ekonomik süreç olup başlıca amaç verimliliği ve elde edilen kar oranını artırmaktır. Genotipin ıslahı çalışmalarının amacı ise gelecekte en karlı üretimi sağlayacak genotipleri üretmektir. Ülkemizde yakın geçmişte bu maksatla yapılan seleksiyon ve melezleme çalışmaları sonucu bazı yerli ırklarımızın genotipleri kaybedilerek yerini yeni genotiplere bıraktığı görülmektedir. Örneğin Trakya bölgesinde Bozstep sığır ırkını bulmak artık neredeyse imkansızdır. Aynı örnek koyunlarda Kıvırcık ve Sakız ırkları için de geçerlidir (Soysal ve ark 2001).

Yerli gen kaynaklarını koruma gerekçeleri; ekonomik potansiyel, bilimsel çalışmalarda kullanım, kültürel ve tarihi ilgi olarak sıralanabilir (Ponzoni 1997).

Çiftlik hayvanlarının verimlerinden (et, süt vb.) bugün olduğu gibi gelecekte de yararlanılabilir. Yerli ırklar buldukları çevre koşullarına ve bir çok hastalığa, yabancı ve melez ırklardan daha dirençlidirler. Yerli ırkların korunmasıyla gelecekte bu hastalıklarla mücadele için alternatif kontrol metotları geliştirilebilir. Verim düzeyi diğerlerinden iyi olmayan bir yerli ırk, yüksek verimli ırklarla melezlendiğinde yüksek düzeyde heterozis gözlenebilir (Ponzoni 1997).

Yerli gen kaynakları ile sonradan geliştirilmiş gen kaynakları arasında fizyoloji, beslenme, genetik, üreme, uyum ve davranış alanlarında karşılaştırmalı olarak araştırmalar yürütülebilmektedir. Ayrıca bazı ırk ve popülasyonlar diğer türlerdeki araştırmalar için biyolojik model olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, Amerika'da Ossabaw yabani domuzlarının sahip oldukları düzensiz insülin modelleri, bu gen kaynağının şeker hastalığı ile ilgili çalışmalarda araştırma modeli olarak kullanılmasını sağlamıştır (Ertuğrul ve Akman 2000).

Birçok hayvan popülasyonu buldukları ülkelerin tarihlerinin belirli dönemlerinde önemli rol oynamışlardır. Örneğin Ankara Keçisi yetiştiriciliği ve tiftik üretimi Türkiye, İpekböceği yetiştiriciliği ve ipek üretiminin Çin'in tekelinde olduğu dönemlerde bu ülkelerin ekonomilerinde ne kadar önemli oldukları bilinmektedir. Yerli ırklar sosyal ve dinsel yapıyı yansıtılmaları açısından da önem arz ederler. Ayrıca estetik değeri olan (boynuz, benek vs.) birçok önemli tür ve ırk vardır. Yerli ırklar hayvan ıslahının tarihsel gelişimini yansıtılmaları bakımından da ayrıca bir öneme sahiptir. Örneğin Fransa'da bulunan Rambouillet Merinosları dünyadaki yapağı tipi koyun ırklarının gelişmesinde oldukça önemli rol oynamıştır (Ertuğrul ve Akman 2000, Ponzoni 1997).

2.4. Genetik Çalışmalar ve Biyokimyasal Genetik

Çiftlik hayvanlarında genetik çeşitlilik, doğal gen kaynaklarının korunması gibi olgular giderek önem ve ilgi kazanmaktadır. Başta koyun olmak üzere diğer çiftlik hayvanlarında da verim düzeylerini artırmak amacıyla yapılmakta olan melezleme çalışmaları genetik çeşitliliği azaltma eğilimindedir. Çoğunlukla kültür ırklarının kalıtsal içerikteki payını artırma doğrultusundaki melezleme çalışmaları, yerli ırkların genotiplerinin giderek azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle Türkiye'deki mevcut koyun ırklarının genetik varyasyon niteliklerini ayırıcı ve özgün yanlarının klasik teknikler dışında daha ayrıntılı moleküler tekniklerle de belirlenmesine gerek vardır (Soysal ve ark 2001).

Son yıllarda baş döndürücü bir hızla ilerleyen moleküler genetik çalışmaları, hayvancılık alanında da etkisini göstermiş ve çalışmaların fenotipik karakterler, biyokimyasal kan parametreleri gibi alanlardan moleküler düzeye inmesini sağlamıştır. Biyokimyasal tekniklerin uygulanması ile, daha ayrıntılı genetik çalışmaların yapılması mümkün olmuştur. Jel elektroforezi tekniği proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak varyasyonu gösteren bir tekniktir (Gardner ve ark 1991). Önceleri genetik çeşitlilik, bireyler ve popülasyonlar arasındaki farklılıkları belirlemek

amacıyla yapılan çalışmalar, protein ve enzim polimorfizmine dayanmaktaydı (Lewontin 1989). Bu konuda ülkemizde ve diğer ülkelerde çok sayıda ve değerli çalışmalar yapılmıştır.

Biyokimyasal enzim polimorfizmi çalışmaları değişik elektroforez teknikleri kullanılarak son 50-60 yıldır gerçekleştirilmektedir. Farklı ülkelerdeki bazı araştırmacılar kendi ülkelerine özgü çeşitli hayvan ırklarının genetik yapılarını elektroforetik yöntemlerle belirlemişler (Nizamhoğlu ve ark 2003, Altunok ve ark 2002, Altunok ve ark 1999, Casati ve ark 1990, Clarke ve ark 1989, Seixas ve ark 1988, Tucker ve Clarke 1980) ve diğer ülke koyun ırkları arasındaki genetik yakınlığı araştırmışlardır.

Hücre ve dokuların gelişimleri ve özel işlevleri için gerekli bilgi genlerde saklıdır. Gen, genetik bilginin yapı ve işlevi tanımlanmış bir bölümdür. Anne / babadan (ebeveyn) yavrulara aktarılan kalıtımın fonksiyonel ve fiziksel birimi olan genler, karmaşık uzun zincirli bir molekül olan deoksiribonükleik asit (DNA)'ten oluşmuşlardır. DNA bir nükleik asittir ve kimyasal öğeleri; nükleotid bazları, şeker (deoksiriboz) ve fosfat gruplarıdır. Bunlar, DNA'nın önemli işlevini yerine getirmesini sağlayan üç boyutlu yapısını belirler. Her gen kromozom üzerinde belirli bir yere sahiptir, genetik bilginin yer aldığı bu bölgelere gen lokusu ya da sadece lokus adı verilir. Bir gen lokusundaki genetik bilginin farklı formları da allel olarak adlandırılır (Lüleci ve ark 2000). Bir tür içinde herhangi bir genin allellerinin sayısı değişken olabilir. Fakat allel sayısı kaç olursa olsun diploid organizmalarda her kromozomdan birer çift olacağı için allel sayısı da iki olacaktır. Diploid bireylerde bir genin allelleri homolog kromozomların karşılıklı lokuslarında bulunurlar. Diploid bir bireyin taşıdığı alleller birbirinin aynı ise (AA gibi) bu birey genetik olarak homozigottur. Eğer diploid bireydeki alleller farklı ise (Aa gibi) bu bireye de heterozigot birey denir (Oraler 1990).

Genlerdeki yapı farklılıklarının ve genler arası ilişkilerin gen ürünlerine ve bu ürünlerin biyokimyasal nitelikler üzerindeki yansımaları çalışmalarına biyokimyasal genetik adı verilmektedir (Arıtürk 1977).

Yirminci yüzyılın başlarında G. Udny Yule, William Castle, Godfrey Hardy ve Wilhelm Weinberg isimli bazı araştırmacılar, popülasyon genetiği ana prensiplerini formüle etmişlerdir. Araştırmacıların yıllarca üstünde durdukları noktayı popülasyonların genetik yapısını tanımlayacak matematiksel modellerin geliştirilmesi oluşturmuş ve bu modellerin geliştirilmesinde Sewall Wright, Ronald Fisher ve J.B.S Haldane gibi teorisyenler ön planda yer almışlardır. Bu araştırmacıların çalışmalarını izleyerek deneysel çalışma ve arazi çalışması yapanlar, matematiksel modelleri denemek için biyokimyasal ve moleküler teknikleri kullanarak doğrudan doğruya DNA ve protein düzeyindeki varyasyonları ölçmüşlerdir. Allel frekansları ve bu frekansları değiştiren seçim, mutasyon, göç ve rastgele genetik sürüklenmeler gibi güçler incelenmiştir (Açık 2002).

2.5. Popülasyonların Genetik Yapılarının Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi

Popülasyon, aynı türe ait, aynı coğrafyada yaşayan ve kendiliğinden ya da potansiyel olarak birbiriyle eşleşebilen bireylerden oluşur. Çalışılan bir türün genomunda tek bir genetik lokus göz önüne alınırsa, popülasyon içinde farklı bireylerin farklı genotiplere sahip oldukları görülür (Açık 2002). Popülasyondaki bireylerin çeşitliliğine karşın her popülasyonun ortak ve sabit bir genetik yükü vardır. Bir popülasyonun genetik yapısını anlamak için o popülasyondaki bireylerin genotiplerini tanımak ve her bir genotipteki bireylerin sayısını bilmek gerekir. Çünkü popülasyonun genetik yapısı, onu oluşturan bireylerin genotipinden kaynaklanır (Oraler 1990). Popülasyonun belirli bir genotipe sahip kısmına genotip frekansı denir. Popülasyonun üreyebilen üyelerinin tümü tarafından oluşturulan gametlerin hepsine birden gen havuzu denir. Gen havuzunu oluşturan yumurtalar ve spermiler haploittir ve dolayısıyla her genetik lokus için yalnız bir allel içerir.

Tek bir lokus ele alındığında, farklı gametlerin farklı alleller taşıdığı görülür. Belirli bir alleli taşıyan gametlerin gen havuzundaki bölümü, allel frekansı olarak adlandırılır (Açık 2002). Bir lokusa ait allel frekansları, bir populasyondaki bireylerden alınan örneklerden aynı lokusun analiz edilmesiyle tahmin edilebilir. Genellikle populasyon genetikçileri bir lokusta iki veya daha fazla allel varsa ve bu allellerden en yaygın olanının frekansı 0,99'dan daha küçük ise o lokusu polimorfik olarak kabul ederler (Gardner ve ark 1991).

Gen havuzundaki allel frekansı değişiklikleri çok uzun zaman alabileceği gibi çok kısa sürede de olabilir. Populasyondaki bireylerin sayısının azalması ya da artmasında; yiyecek kaynakları, iklim, çevre ve hastalıklar rol oynarken, genetik düzeydeki bir değişimin nedenleri mutasyonlar, göç, seleksiyon ya da rastgele genetik sürüklenmelerdir. Bu doğal etkenler allel frekansının değişimine ve populasyonun yapısının tümüyle değişmesine yol açabilirler (Gardner ve ark 1991). Populasyon genetiği çalışmalarının çoğunda ilk adımı ilgilenilen lokustaki allel frekansının ölçülmesi oluşturur. Allel frekansını ölçmek için çok sayıda bireyin belirlenmesi gerekir. Araştırmacılar, genotipleri bazı durumlarda doğrudan doğruya fenotiplerden belirleyebilir. Diğer durumlarda ise, protein veya DNA dizilerinin doğrudan analizi gerekir (Açık 2002).

Allel frekanslarının ölçümüyle elde edilen veriler, incelenen lokuslar yönünden çalışılan populasyonlar hakkında bilgi verir. Elde edilen sonuçlar Hardy-Weinberg dengesi yönünden değerlendirilir. Allel frekansı nesilden nesile sabit kalan ve genotip frekansı allel frekansından hesaplanabilen bir populasyon Hardy-Weinberg dengesi durumundadır. Bir populasyonda Hardy-Weinberg dengesi; çiftleşmelerin generasyonlar boyunca şansa bağlı olduğu ve mutasyon, seleksiyon, göç, şansa bağlı genetik kayma, meiosis bölünmedeki düzensizlikler gibi gen frekansını değiştiren faktörlerin bulunmadığı durumlarda geçerlidir. Böyle bir populasyonda gen frekansları ile genotip frekansları generasyondan generasyona sabit kalmaktadır. Hardy-Weinberg dengesine göre genotip frekanslarının $p^2 + 2pq + q^2 =$

1 denkleminde uyması beklenir. Populasyon genetiği alanında genetik dağılımın Hardy-Weinberg dengesi önemli bir rol oynar. Bu öneminden dolayı araştırmacılar tarafından her zaman dikkate alınmaktadır (Erensayın 2000, Guo ve Thompson 1992).

Fenotip bir ferden morfolojik ve fizyolojik görünüşüdür, bir başka deyişle genotipin sadece bir yansımasıdır ve ancak genotipin kabaca tahminini sağlar. Genotip ise bireyin kalıtsal gücünün toplamıdır ve ancak döllerine bakarak tayin olunabilir (Arıtürk 1977).

Bitki ve hayvan populasyonlarının incelenmesinde, bireyler arasında birçok fenotipik benzerliklerin bulunduğu görülmüştür. Ancak önemli bazı veriler çoğu populasyonun yüksek oranda heterojenlik gösterdiğini de ortaya koymaktadır. Ortaya çıkan pek çok genetik farklılık fenotipik olarak gözlenemediğinden gizli kalmıştır ve bu olgu genetik çeşitliliğin belirlenmesinin çok basit olmadığına bir göstergesidir. Genetik çeşitliliğin tam olarak ortaya konması ancak protein ve DNA dizilerinin doğrudan analizi ile mümkündür (Öner 2002a).

Moleküler biyolojideki son gelişmeler DNA ve polipeptidlerdeki amino asitlerin nükleotid dizilimini tanımlamayı mümkün kılmıştır. DNA dizilimi (DNA sequencing) teknolojisi DNA molekülündeki baz (nükleotid) çiftlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bilim adamları bu teknolojiyle insan gen haritasını tamamlamanın planlarını yapmaktadır. Gen haritaları tamamlandığı zaman canlı organizmalardaki gen ve kromozomların yapı ve fonksiyonlarına ait daha detaylı bilgiler sağlanacaktır (Gardner ve ark 1991).

Populasyonun genetik analizi üç safhayı içerir. Bunlar örnek toplanması, analiz ve sonuçların yorumlanmasıdır. Örnekler rastgele ve etkili bir genişlikten populasyonu temsil edecek şekilde toplanmalıdır. Çalışmadaki spesifik soruları cevaplayacak analiz metotları ve genetik markerlar seçilmelidir (Hoelzel 1995). Elde edilen verilerin doğru şekilde yorumlanabilmesi için uygun istatistik metotlar kullanılmalıdır.

2.6. Moleküler Genetik Analiz Metotları

Genetik çeşitliliğin seviyesinin belirlendiği veya genetik çeşitliliğin araştırıldığı popülasyonlarda sağlıklı sonuçlar almak için analizler kadar örnek toplama da çok önemlidir. Örnekleme hataları, yanlış sonuçlar ve yorumlamalara neden olur. Çalışmalarda ya çok sayıda lokus kullanılmalıdır ya da çok sayıda bireyde çalışılmalıdır. Genetik çalışmalarda kullanılan analiz metotlarından bazıları şunlardır:

2.6.1. Enzim elektroforezi

Kalıtsal karakterlerin varyasyon gösterdiği ve bu varyasyonun lokal ırkları tanımlamada kullanıldığı eskiden beri bilinmektedir. Ancak doğal popülasyonlardaki genetik varyasyon 1960'lı yıllarda protein jel elektroforezinin tekniğinin geliştirilmesine kadar yeterince bilinmiyordu (Hoelzel 1995). Lewontin ve Hubby (1966) tarafından geliştirilen elektroforez yöntemi ile aynı gen lokusunun sentezlediği, yapıları farklı allellerin belirlenmesi gerçekleştirildi. Protein polimorfizmi yardımıyla yaklaşık 1000'in üzerinde canlı türünde çalışılmış ve bu türlerin varyasyon gösterdikleri tespit edilmiş ve jel elektroforezi popülasyonlar arası ve popülasyon içi genetik varyasyonun tanımlanması için rutin bir yöntem haline gelmiştir (Hoelzel 1995). Lewontin (1989)' in ifadesine göre, araştırmacının 1974 yılında yayınlanan bir kitabında protein elektroforezinin türler arası genetik varyasyonun çalışılması ve anlaşılması için bir teknik olarak geliştirildiği ve bu teknolojinin yeterli olacağı sanıldığı söylenmekte, çalışmaların başlamasıyla birlikte konuyla ilgili birçok soruya cevap bulunsa da, bazı soruların hala çözülemediği belirtilmektedir. Ayrıca 1970'li yılların ortalarında protein polimorfizminin seleksiyon, mutasyon, gen değişimi, rastgele genetik sürüklenmeler, popülasyonun yapısı gibi bazı soruların çözümünde yetersiz kaldığı bildirilmektedir. Jel elektroforezi kullanılarak yapılan protein varyasyon çalışmaları, popülasyon genetiği çalışmalarında azalsa da, türleri

karşılaştırmada, populasyonların yapısı hakkındaki bazı spesifik soruların çözümünde önemini hala korumaktadır (Lewontin 1989).

Elektroforez tekniğinde; moleküller yüklerine göre anot (+) veya katoda (-) doğru hareket ederler, jel üzerindeki aldıkları mesafe ve yöne göre tanımlanırlar. Proteinler veya nükleik asitler elektriksel yük taşıdıkları için elektroforez işlemi ile bu moleküllerin büyüklüğü, konformasyonu ve net yükleri hakkında bilgi edinilebilir. Materyal olarak kan veya bir solüsyon içerisinde homojenize edilmiş dokular kullanılabilir (Öner 2002b, Hoelzel 1995).

Elektroforezde bir tampon sistemi, bir ortam (kağıt, selüloz asetat, nişasta jeli, agaroz jeli ya da poliakrilamit) ile bir doğru akım kaynağı gereklidir. Örnekler jele yerleştirildikten sonra sisteme uygun bir süre için elektrik akımı uygulanır. Moleküllerin yol almasından sonra jel ya da kağıt üzerinde ayrılmış olan bileşenler seçici bir boya ile görüntülenir (Öner 2002b).

Küçük moleküller büyüklere göre jelde daha hızlı hareket ederler. Agaroz ve poliakrilamit jellerin ayırma gücü çok yüksektir ve aralarında bir nükleotidlik fark bulunan polinükleotidler bile açıkça ayrılır. Elektroforez işlemi sonrasında molekülleri temsil eden bantlar (ince çizgi halinde görülürler) ya otoradyografi ile (molekül bileşenlerinden biri radyoaktif madde ile işaretli ise) ya da nükleik asitlere bağlanan florasan boya ile veya poliakrilamit jellerde gümüş boyama yapılarak görüntülenirler (Öğüş 2002).

Protein varyasyonunun incelenmesinde önemli bir sorunu birbirine çok benzeyen allellerin tanımlanması oluşturur ve 2 populasyonda bir lokus için allel frekanslarının dağılımı benzerlik gösteriyorsa, bu aynı atasal genlerin değişik populasyonlardaki dağılımındandır. Çünkü seleksiyon allel sıklıklarının dağılımını aynı oranda etkileyebilir. Her ne kadar geçmişte atalarında iki allel ortak olmasa da, seleksiyon şartları daha sonraki

generasyonda bu allelerin ortak olmasına olanak sağlayabilir. Eğer bir populasyonda bir allel monomorfik yapıdaysa, allellerin kökeni ne olursa olsun, genetik sürüklenme veya seleksiyon şartlarına bağlı olarak bu alleller sabitlenebilir. Aminoasit varyasyonunun tespiti için en iyi yol proteinin aminoasit sekansına (dizilimine) veya elektromorfik (elektroforez) fenotipine bakmaktır (Lewontin 1989).

Bilindiği gibi DNA sekans bilgisi RNA'yı, RNA'da amino asit dizilimini, polipeptidleri ve proteinleri meydana getirir. Genomun ancak küçük bir kısmı proteinlerin sentezlenmesi için gerekli bilgiyi bulundurmaktadır ve amino asitleri kodlayan kodonların dejenere olması bir başka deyişle bazı amino asitlerin birden fazla kodon tarafından kodlanabilmesi DNA diziliminde bir varyasyon olsa bile bu varyasyonun amino asit dizilimi ve protein yapısında bir değişim oluşturmadığı bilinmektedir. Keza bazı hallerde DNA dizilimindeki bazı mutasyonlar amino asit diziliminde değişikliğe yol açsa bile proteinlerin bazı önemli niteliklerinde (örneğin; moleküler yapısı, elektriksel yükü gibi) bir değişim ortaya çıkmayabilir ve bu tür önemli değişiklikler protein elektroforezi yöntemi ile belirlenememektedir (Hoelzel 1995).

Son zamanlarda genom teknolojilerindeki hızlı ilerlemeler, insan ve diğer canlılara ait sekans bilgilerinin artması, genomlarda bulunan varyasyonun daha yaygın olarak tespit edilmesine olanak sağlamıştır (Lewontin 1989). DNA'nın direkt olarak analiz edilmesi ile ilgili son buluşlar genomda bulunan varyasyonun daha yaygın olarak tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Çünkü yapılan çalışmalar populasyonlar içinde büyük oranda genetik çeşitlilik kaynağının olduğunu ve DNA seviyesinde genlerin çoğunun belki de hepsinin bireyden bireye farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu amaçla DNA bazlı varyasyon çalışmaları daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Hoelzel 1995).

2.6.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction)

PCR, spesifik bir DNA bölgesini enzimatik reaksiyonla in vitro olarak çok kısa sürede (birkaç saat) milyonlarca kez çoğaltabilen bir tekniktir (Gardner ve ark 1991). Bu teknik ilk defa 1983 yılında Karry Mullis ve arkadaşları tarafından Kaliforniya (California) yakınlarında (Cetus Corporation) geliştirilmiştir. Bu gelişmeyle temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saatte gerçekleştirilebilmesi bu teknolojinin olağanüstü bir hızla yaygınlaşmasını sağlamıştır. Ayrıca günümüzde PCR, allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini) gibi tıbbın diğer kollarında, tarım ve hayvancılık çalışmalarında ise tohum saflığının belirlenmesi, sistematik ve evölüsyon çalışmaları, doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arası polimorfizmin belirlenmesi gibi birçok sahada kullanılabilir hale gelmiştir (Arı 2004).

PCR tekniğinin prensiplerinin detayları Khorona ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Taylor 1993, Mullis 1990). PCR, DNA ve RNA sekanslarının yapı ve fonksiyonları ile ilgili çalışmalara çok büyük olanaklar sağlar. Ayrıca PCR insan hastalıkları ve adli olaylardaki sorunların çözümünde çok önemli uygulama alanlarına sahiptir (Gardner ve ark 1991). Bu DNA amplifikasyon yöntemi diğerlerine oranla daha fazla uygulama alanı bulmuştur. RNA karakterindeki genomik materyallerde önce reverse transkriptase (RT) ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilerek amplifikasyonu (çoğaltma işlemi) yapılır (Arda 1997, Erlich ve ark 1991, Gibbs 1990, White ve ark 1989).

Bir PCR reaksiyonu için gerekli olan maddeler, aşağıda açıklaması yapılan hedef DNA, DNA polimeraz, primerler, deoksiribonükleotidler ve magnezyum içeren tampon çözeltiden oluşmaktadır (Aksoy ve ark 1999, Wright and Thomas 1990, Vosberg 1989).

2.6.2.1. Hedef DNA (Target DNA)

PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde araştırma laboratuvarları, klinikler veya ticari firmalardan hazır olarak elde edilebilir (Arı 2004).

DNA; kan, sperma, gaita, vücut sıvıları, tek bir saç teli, doku parçası, hücre gibi çeşitli materyalden başarılı bir amplifikasyon için sağlanabilir. Bu işlemde önemli olan nokta amplifiye edilecek DNA'nın fonksiyonel özellikte olmasıdır (Erol ve ark 1990).

PCR'ın en büyük özelliklerinden biri amplifiye edilecek hedef DNA'nın gerek kalitatif ve gerekse kantitatif olarak fazla miktarda olmasına gereksinim duyulmamasıdır. Hücrelerin kaynatılmasıyla birbirinden çözülmüş DNA herhangi bir saflaştırmaya gerek kalmadan doğrudan doğruya kullanılabilir. Saf olarak elde edilmiş DNA'nın yanı sıra binlerce yıllık mumyalardan elde edilen DNA'lar bile PCR'da kullanılabilir. Eğer kullanılan materyal bir mRNA ise reverse transkriptase (RT) kullanılarak cDNA (complementer DNA)'ya çevrilir ve cDNA daha sonra PCR için bir kalıp olarak görev yapar (Erlich ve ark 1991, Erol ve ark 1990, Kawasaki 1990, Vosberg 1989).

2.6.2.2. DNA polimeraz (DNA polymerase)

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak 4 çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirinin sentezini katalizlerler. Bu enzimler sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına

(primerlere) gereksinim duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3'-hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır (Arı 2004).

Isıya dirençli DNA polimerazların katılması PCR için büyük teknolojik adım anlamına gelmekte olup, tekniğin klinik ve araştırma alanında rutin uygulanabilirliğini mümkün kılmıştır. En sık kullanılan DNA polimeraz enzimi, *Taq*-polimerazdır. Bu enzim *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiştir. Yüksek sıcaklığa dirençli olan bu enzimin optimal etkiye sıcaklığı 72 °C'dir. *Taq*-polimeraz enziminin, sıcaklığa duyarlı enzimlere karşı 2 önemli üstünlüğü vardır; birincisi her denatürasyon siklusunu takiben yeni enzim ilavesine gerek kalmaması, ikincisi primerlerin bağlanmasının yüksek sıcaklıklarda daha spesifik ve DNA sentezinin de daha hızlı olmasıdır (Abramson 1995, Erol ve ark 1990, Innis ve ark 1988, Saiki ve ark 1988).

2.6.2.3. Primerler (Primers)

DNA'yı PCR tekniği yardımıyla amplifiye edebilmek için başlatıcı-yardımcı oligonükleotid primerlere (amplimer) gereksinim duyulur. Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA segmentleri olan primerler, kullanılma amaçlarına göre, 15-40 oligonükleotid'den oluşmuşlardır. Bunlar, hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz sıralarını bularak onlara bağlanır ve buradan (3'-OH terminus) DNA sentezinin ilerlemesine basamak teşkil ederler. Primerlerin yapısında, %50-60 kadar G+C bazlarının bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur (Taylor 1993, Erol ve ark 1990).

Primerlerin 3'-ucundaki bazların, hedef DNA'nın kopyasının çıkması işlemini başlatmada önemleri fazladır. Bu nedenle primerlerin 5'-ucu, hedef DNA'nın 3'-ucu ile birleşerek, polimerizasyon için 5' → 3' yönünde uygun bir ortam yaratmaktadır. Yeni

bazlar, primerin 3'-terminusuna, kalıp DNA örnek alınarak seçilir ve ilave edilirler. Bu uçtaki tek bir uyumsuzluk polimerizasyonun etkinliğini azaltır (Arda 1997).

Primerler o tarzda seçilmeli veya hazırlanmalıdırlar ki, kendilerinde bulunan baz sıraları, sadece hedef DNA üzerinde bir bölgede bulunmalı başka yerlerde veya başka hedef DNA sekanslarında bulunmamalıdır. Eğer bu kurala uyulmazsa, kros amplifikasyonlar meydana gelerek sonucu ve yorumlamayı olumsuz yönde etkilerler. Bu nedenle, her ne kadar ön koşul olmamakla beraber, hedef DNA'nın saf olmasının büyük yararları bulunmaktadır. Diğer önemli bir nokta da, hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi ve bunlar üzerindeki spesifik bölgelerin seçilmesi ve başka bir etken'de bulunmamasına gayret gösterilmelidir. Böyle yanlışlıkları önlemek için, kullanılmadan önce primerlerin spesifiteleri rutin muayenelerle denenmeli, uygun bulunanlar testte kullanılmalıdırlar (Arda 1997).

2.6.2.4. Deoksinükleotid trifosfatlar (Deoxynucleosid triphosphates, dNTPs)

Yeni DNA sarmalının sentezi için; dATP, dTTP, dGTP, dCTP; hepsi dNTPs olarak adlandırılan 4 farklı deoksinükleotid trifosfata gereksinim vardır. Nükleotidlerin PCR karışımındaki konsantrasyonları 20-200 μ M olmalı ve 4 nükleotid de aynı oranda kullanılmalıdır. Nükleotidlerin düşük konsantrasyonlarda kullanılması PCR'ın spesifitesini artırır. Nükleotidlerin optimal konsantrasyonlarını tespit etmek için amplifiye edilecek ürünün uzunluğu, MgCl₂ ve primer konsantrasyonları dikkate alınmalıdır. dNTP karışımı liyofilize formda veya sulu çözelti halinde bulunmaktadır ve -20 °C'de birkaç ay stabil özelliğe sahiptir (Çetinkaya 1998, Taylor 1993, Erol ve ark 1990).

2.6.2.5. Reaksiyon solüsyonu (Tampon)

Günümüzde bir seri reaksiyon solüsyonu (tampon) bulunmakta ise de, reaksiyon solüsyonu son konsantrasyonu; 10 mM Tris (pH 8,4), 50 mM MgCl₂, 0,01% jelatin (BSA;

bovine serum albumin olabilir veya tamamen çıkarılabilir), 0,01 % NP₄O ve 0,01% Tween 20 şeklindedir. İyonik olmayan deterjanlar enzim aktivitesi için önemlidir. dNTP konsantrasyonunun (uzun DNA fragmentlerinin amplifikasyonunda) yüksek olması halinde, artan Mg⁺² konsantrasyonuna gereksinim duyulur. Magnezyum iyon konsantrasyonunun primer bağlanması, kalıp DNA ve PCR ürünlerindeki çift sarmal yapının ayrılma ısısı, primer-dimer yapısı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi bulunmaktadır. MgCl₂ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca MgCl₂ kullanmaya gerek yoktur. Eğer tampon MgCl₂ içermiyorsa hazır olarak elde edilen 25 mM konsantrasyondaki MgCl₂ solüsyonu ayrıca sulandırma yapmadan final konsantrasyonu 2.5 mM olacak şekilde uygun miktarda reaksiyon karışımına eklenir (Arı 2004, Çetinkaya 1998, Taylor 1993).

2.6.2.6. PCR'in çalışma prensibi

Birçok disiplinde olduğu gibi insan ve veteriner hekimliğinde de çok büyük yararlar sağlayan PCR'in çalışma prensibi oldukça basittir. Özet olarak, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımıyla enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) şeklinde tanımlanabilir. Bu hedef genetik materyal çok az sayıda, çok fazla sayıda veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve kolayca da identifiye edilebilir. PCR küçük volümler halinde hazırlanır. 0,5 ml mikrofuj tüpüne 100 µl hacimde (15 µl, 25 µl, 50 µl gibi hacimlerde olabilir) materyal konur. Bu materyaller arasında aranan hedef DNA sekansları, primerler, DNA polimeraz, deoksिनükleotid trifosfatlar ve reaksiyon solüsyonu (tampon) bulunur (Arda 1997).

Bu hazırlıklardan sonra PCR işlemi ile DNA amplifikasyonunun prensibi; sıcaklık, zaman ve siklus sayılarının istenildiği gibi ayarlanabilen thermal cycler'lar içerisinde;

1- DNA'nın denatürasyonu (denaturation),

- 2- DNA'lara primerlerin bağlanması (primer annealing),
 - 3- Primerlerin uzaması (primer extention, primer elongation)
- aşamalarından oluşmaktadır (Arda 1997).

2.6.2.6.A. Hedef DNA'nın denatürasyonu:

Bütün gerekli materyaller çok küçük miktarlarda mikrofij (Eppendorf vs.) tüplerine konduktan sonra özel bir aletin (Thermal cycler) gözlerine yerleştirilir. Alet otomatik olarak ısıyı 95 °C'ye yükselterek bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu (nükleik asit'in iki iplikçığının birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) sağlar. Bu işlem için, materyalin türüne göre değişmek üzere 3-5 dakika kadar bir süre yeterli olmaktadır (Arda 1997, Gibbs 1990, Vosberg 1989).

2.6.2.6.B. Primerlerin bağlanması

Ayarlanmış olan süre sonrasında, alet ısıyı 50-52 °C'ye indirerek ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanması gerçekleştirilir. Şöyle ki, primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimeraz'ın çalışma yönüne uygun olarak (5'→3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar devam eder (Arda 1997, Bej ve ark 1991, Gibbs 1990, Vosberg 1989).

2.6.2.6.C. Polimerizasyon

Bu bağlanma süresi bitince aletin ısısı hemen 70-72 °C'ye çıkararak, tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan *Taq polimeraz* enzimi, 5' →3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanarak, primerlerin 3' -terminusuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon reaksiyonunda,

hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp ödevi görür. Bu sürede yaklaşık 3-5 dakika sürmektedir (Arda 1997)

Böylece, PCR'ın 3 aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, tekrar ısının 95 °C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanması durumunda tek bir hedef DNA segmenti, 2ⁿ formülüne göre yaklaşık 33,6 milyon adet çoğaltılmış olur (Arda 1997, Gibbs 1990, Vosberg 1989).

2.6.2.6.D. PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

PCR ürünleri belli uzunluktaki DNA fragmentlerini içerir. Bu ürünleri görüntülemek için agaroz veya poliakrilamid jeller kullanılarak elektroforez işlemi yapılır. Elektroforez işleminden sonra ethidium bromide, gümüş boyama veya otoradyografi metotlarından birisi kullanılarak görüntüleme işlemi yapılabilir.

PCR tekniğinden faydalanılarak; hastalık etkenlerinin teşhisi, genetik hastalıkların teşhisi, organizma ve populasyon biyolojisi çalışmaları, adli tıp, kanser, cinsiyet tayini gibi çalışmalar rahatlıkla ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir (Çetinkaya 1998, Arda 1997, Alkan ve ark 1997, Bej ve ark 1991, Peura ve ark 1990, Wright and Thomas 1990, Deacon ve Lah 1989).

2.6.3. DNA dizi analizi (DNA sequencing)

DNA dizi analizi bir DNA molekülünü oluşturan nükleotid dizilerinin sırasının belirlenmesi işlemidir. Bu amaçla çok çeşitli metotlar geliştirilmeye beraber en çok kullanılanlardan birisi zincir terminasyon (sonlandırma) metodudur. Bu metotta tek zincirli DNA molekülü her bir nükleotid için (A, T, C ve G) 4 adet reaksiyon miksinde ayrılır. DNA dizi analizi reaksiyonlarında normal nükleotidlerin yanı sıra, radyoaktif bir madde veya floresan bir boya ile işaretlenmiş dideoksinükleotid denilen özgün baz analogları kullanılır. Reaksiyon miksinde içeren her bir tüpte tek zincirli bir DNA kalıbı,

uygun bir primer, DNA polimeraz enzimi, 4 nükleotid ve dört tip dideoksinükleotidlerden sadece biri bulunur (Öner 2002c, Hoelzel 1995).

DNA polimeraz enzimi, template DNA'yı kullanarak yeni DNA moleküllerini sentezler. Dideoksinükleotidler 3' - OH grubu içermediklerinden dolayı bir sonraki nükleotid ile 3' bağı oluşturamaz ve DNA sentezi o noktada sonlanır. Böylece her bir tüpte uzunlukları birbirlerinden bir nükleotid farklı olan, değişik uzunluklardaki DNA molekülleri birikir. Her bir reaksiyon tüpündeki örnekler jel elektroforezi işlemine tabi tutularak DNA parçaları birbirinden ayrılır ve görünümleri sağlandığında bantların görünümü merdiven benzeri bir görüntü oluşturur. Dizi aşağıdan yukarı doğru okunarak, baz dizilimi gerçekleştirilen DNA kalıbının tamamlayıcısının 5' den 3' ne doğru nükleotid dizisi belirlenmiş olur (Öner 2002c, Hoelzel 1995).

DNA dizi analizi genlerin organizasyonu, doğası ve ayrıca gen ve gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların sayısı, yeri ve çeşidi ile ilgili bilgiler verir. Dizi analizi ayrıca prokaryotik ve ökaryotik genlerde yer alan kontrol bölgelerinin organizasyonu ile ilgili çalışmalarda ve proteinlerin amino asit dizilerinin ortaya çıkarılmasında kullanılır (Öner 2002c).

2.6.4. Kantitatif özellik lokusları (Quantitative Trait Loci, QTLs)

Varyasyon olmadan organizma veya populasyon düzeyinde hiçbir genetik analiz gerçekleştirilemez. Bir başka deyişle, bu varyasyon organizmalar arasındaki dikkati çeken farklılıkları içine alır. Örnek olarak, çiçeklerde renk farklılıkları, uçan canlılarda kanat uzunluk ve kısalıkları, bakteri ve virüslerde enfekte etme kabiliyetleri, insanlarda uzunluk, ağırlık populasyon içerisinde değişiklik gösteren özelliklerdir. Biyolojik varyasyonu sınıflandırmak, geleneksel genetik metotlarla bunları analiz etmek oldukça güçtür. Bu önemli özellikler, kendilerine spesifik olarak geliştirilen özel metotlarla ölçülür. Kantitatif

genetik, birçok genetik ve çevre faktörü tarafından kontrol edilen, bu kompleks yapıdaki özelliklerle ilgilenen bir disiplindir (Gardner ve ark 1991).

Hayvan yetiştiriciliğinde ekonomik değeri olan et, süt ve döl verimi gibi değerler (fenotip) kantitatif özellikte olup, çok sayıda genin toplamalı (additif) etkisi ile şekillenir. Kantitatif karakterlerin kontrolünden sorumlu olan kromozom bölgelerinin tanımlanmasında QTL (Quantitative Trait Loci) kullanılmaktadır (Beuzen ve ark 2000). Hastalık ve karakterlerle ilgili gen(ler) ve QTL'lerin belirlenmesinde "aday gen analizi (candidate gene analysis)" ile "genom tarama-konumsal belirleme (genome searching and positional cloning)" tekniği olmak üzere iki temel metot kullanılmaktadır. Aday gen analizi yönteminde; eğer bir genin fonksiyonu biliniyorsa, normal ve etkilenmiş gruptaki bireylerin genetik dizilimleri karşılaştırılarak, dizimde bir mutasyon olup olmadığı araştırılabilir. Fakat fonksiyonu bilinen gen sayısının sınırlı olması bu tekniğin kullanımını kısıtlamaktadır. İkinci teknik ise oldukça karmaşık ve birkaç basamaktan meydana gelmektedir. İlk olarak ilgili karakteri taşıdığı bilinen bir pedigride enformatif DNA markerleri kullanılarak QTL'in bulunduğu kromozom bölgesi tespit edilir. Daha sonra bu kromozom bölgesindeki üzerinde çalışılmakta olan karakterle ilgili genler araştırılır (Haley ve Visscher 1999).

2.7. Moleküler Markerlar

Kalıtım şekilleri, morfolojik (renk gibi), biyokimyasal (izoenzimler gibi) ve DNA düzeyinde (moleküler markerlar) izlenebilen karakterlere genetik markerlar denir. Bu karakterlerin marker olarak isimlendirilmesinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetiği hakkında dolaylı da olsa bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markerlar DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler (Yıldırım ve Kandemir 2001).

Biyokimya alanındaki gelişmeler son 20 yılda markerlar konusunda da yeni bir çığır açmıştır. Öncelikle birbirinden ayrılabilir formda olup aynı işlevi olan enzimlerin (izoenzimler) veya depo proteinlerinin marker olarak kullanılabilceği ortaya konmuştur. Daha sonra DNA'nın kendisinin doğrudan marker olarak kullanılma fikri ortaya çıkmıştır. DNA düzeyindeki polimorfizmi açıklamaları sebebiyle moleküler markerlar genetik çalışmalarda anahtar rolü oynarlar (Vignal ve ark 2002, Yıldırım ve Kandemir 2001).

2.7.1. Protein markerları

Protein markerları, depo proteinleri ve enzim proteinleri olarak ikiye ayrılırlar. Depo proteinleri elektroforez işlemine tabi tutulup boyandıklarında elde edilen farklı genotipler genetik marker olarak kullanılabilir. En önemli avantajları çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olmalarıdır. Dezavantajları ise sayıca çok az olmalarıdır.

Enzim markerları ise, alloenzim ve izoenzim olarak iki grupta incelenebilir. Alloenzimler aynı genin farklı allelleri tarafından meydana getirilmektedirler. İzoenzimler ise farklı genler tarafından üretilen, ancak işlevleri aynı olan enzimleri ifade etmektedirler. Alloenzim ve izoenzimleri birbirinden ayırt etmek için elektroforez işlemi uygulanır. Jel üzerinde elektrik akımı etkisiyle proteinler taşıdıkları yük ve kütle oranına göre farklı hızlarda hareket ederler. Daha sonra jel, ilgili proteine spesifik boya maddeleri ile boyanarak proteinin jel üzerindeki pozisyonu belirlenir ve farklı alleller tanımlanır. Enzim markerlarının en önemli avantajları, analizlerinin güvenilir, hızlı ve ucuz olmasıdır. Yine enzim markerlarının da sayılarının az olması dezavantajlarını oluşturur (Yıldırım ve Kandemir 2001).

2.7.2. DNA markerları

DNA markerları farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markerlardır. Bunlar; DNA'nın enzimatik kesimi sonucu elde

edilen RFLP'ler ve PCR kullanımına dayalı olan SSCP, RAPD, AFLP, STS, SNP, mtDNA, VNTR, STR veya mikrosatellitlerdir.

Bu markerlar kısaca incelenecek olursa;

2.7.2.1. Restriksiyon enzimleri uzunluk polimorfizmi (RFLP)

DNA sarmalı özgül Restriksiyon Enzimi (RE) ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur ve bu DNA'lar elektroforez işlemi ile gözlenebilir. Bu oluşan DNA fragmentleri RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır.

Bu markerlar radyoaktif veya non-radyoaktif tarzda etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA), araştırılan bir DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA'ya melezlenebilmesini baz almaktadır. RFLP tekniği kesim enziminin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini dahi tanır. Tanıma yerinin baz değişikliği farklı genotipler arasındaki polimorfizmin bir sebebidir. RFLP tekniği ile kullanılan prob DNA'nın temsil ettiği lokus analiz edilmektedir. RFLP probu olarak genellikle 200-2000 baz uzunluğunda DNA parçaları kullanılır.

RFLP tekniğinin avantajları; türler, cinsler hatta familyalar arasında transferleri mümkündür. Bir diğer avantajı da güvenilir olmasıdır. Farklı araştırmacılar, farklı laboratuarlarda aynı sonuçları elde edebilmektedirler. Orta düzeyde polimorfizm oranları vardır. En önemli dezavantajı ise analizler pahalıdır, ayrıca fazla zaman ve iş gücü gerektirir (Yıldırım ve Kandemir 2001, Solak ve ark 1997).

2.7.2.2. Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP)

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)'de 200 bp'lik PCR ürünleri kullanıldığında tek baz değişimi için en hassas yöntem olarak bilinmektedir. Ancak poliakrilamid jel elektroforezinde iyonik güç, sıcaklık, jel derişimi polimerizasyonu ve gliserol miktarı gibi çeşitli faktörler sonuçları etkilemektedir. Bu nedenle her laboratuarda en iyi sonuç için koşullar optimize edilmelidir. Aynı PCR ürünü ile RFLP ve DNA dizi

analizi yapılabilmeside SSCP yönteminin tercih nedenlerinden birisidir (Aksoy ve ark 1999).

PCR ile çoğaltılan çift zincir DNA, renatürasyonu önleyen kimyasal maddelerin bulunduğu bir ortamda 90-95 °C'ye kadar ısıtıldığı zaman iki tane tek zincir meydana gelmektedir. Ortam hızla sıfır dereceye kadar soğutulduğunda zincirler kendi içinde kıvrılıp katlanarak birbirinden farklı iki yapı ortaya çıkmaktadır. Tek zincir DNA'ların konformasyonel yapı farkından dolayı elektroforezde farklı hızda göç etmesi SSCP yönteminin temelini oluşturmaktadır. Mutasyon içeren DNA molekülü normal halinden farklı konformasyonlar oluşturup elektroforezde normalden farklı hızda göç ettiğinden dolayı teşhis edilebilmektedir. Bu yöntemle DNA fragmentinde baz değişiminin bulunduğu belirlenmesine rağmen mutasyonun türü ancak DNA dizi analizi ile teşhis edilmektedir (Aksoy ve ark 1999, Solak ve ark 1997).

Nokta mutasyonlarının DNA dizi analizi ile kesin olarak teşhis edilebilmesine rağmen taranacak DNA fragmenti büyüdükçe teşhis süresi ve analiz maliyeti artmaktadır. SSCP analizi RFLP ve DNA dizi analizinden önce mutasyonun lokalize olduğu bölgeyi belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Aksoy ve ark 1999).

2.7.2.3. Rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı (RAPD)

1990'da yeni genetik bir marker 2 farklı grupta geliştirilmiş ve RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) olarak adlandırılmıştır. RAPD, nadiren sentezlenen tek primerli random (rastgele) DNA segmentlerinin amplifikasyonunu temel alır. Bu DNA segmentleri genomik parmak izinde polimorfizmi karşılaştırmak için kullanılabilir. RAPD tekniğinde DNA problemleri ya da spesifik primerlerin tasarımı için bilgiye ihtiyaç yoktur. Prosedür blotting ya da hibridizasyon adımlarını içerdiği için basit ve hızlıdır. DNA'nın

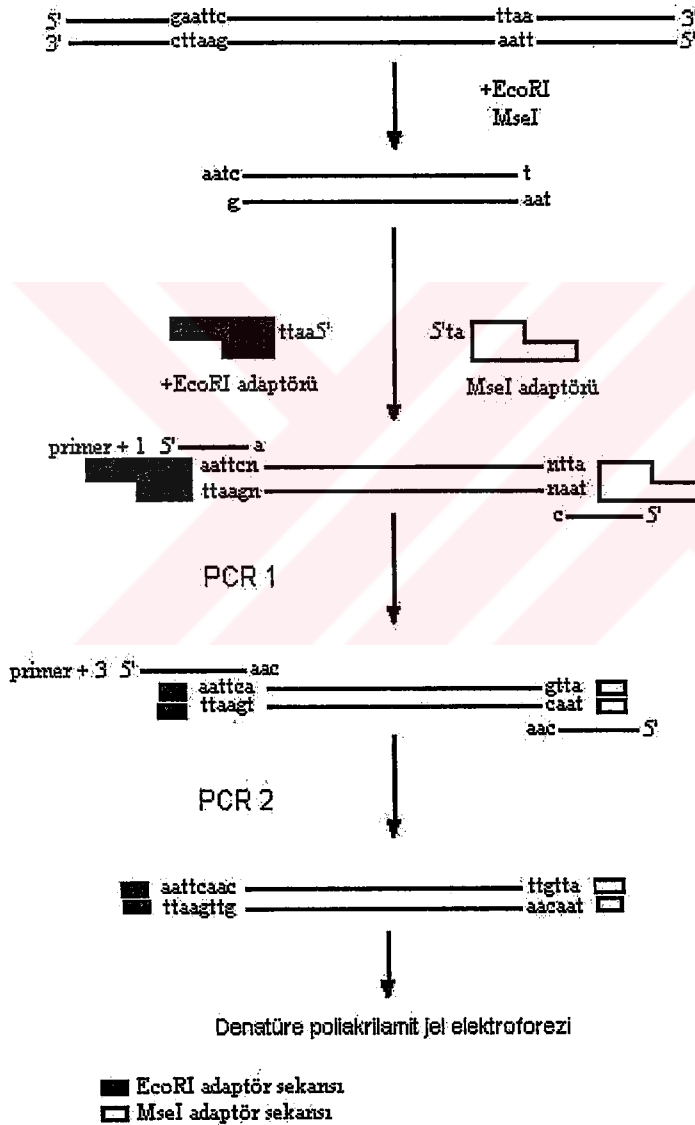
çok küçük miktarlarına ihtiyaç duyulur. Ancak PCR şartlarını tam olarak sağlamak şarttır (Kayıhan 2000).

RFLP ile karşılaştırıldığında, RAPD marker'larının daha az zaman ve para gerektirdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte tipik özelliklerinin bazıları (dominant ekspresyon tekrar edebilme derecesinin değişkenliği, çapraz tür veya popülasyonların transferindeki zorluklar gibi) harita oluşturma ve karşılaştırma için faydasını sınırlar. Aksine mikrosatellit markerları yüksek derecede polimorfik ve kodominanttır (Joobeur ve ark 2000).

2.7.2.4. Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı (AFLP)

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analizleri selektif restriksiyon fragment amplifikasyon teknikleri kategorisine aittir. Genomik DNA'dan restriksiyon fragment setlerinin selektif amplifikasyonunu temel alır. DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir ve daha sonra çift zincirli adaptörler fragmentlere bağlanır. AFLP analizleri için saflaştırılmış küçük bir genomik DNA'ya ihtiyaç vardır. Bu DNA 2 restriksiyon enzimi (RE) ile sınırlandırılır. Bu RE'lerin biri ortalama bir kesim sıklığına, diğeri ise yüksek bir kesim sıklığına sahiptir. Çift zincirli oligonükleotid adaptörlerinde ilk sınırlandırma bölgesi ligation (enzimatik birleşme)'dan sonra restore edilmeyecek şekilde dizayn edilir. Bu da eş zamanlı restriksiyon (sınırlama) ve ligation'a izin verir. Oysa bağlanan fragmentler tekrar birbirinden ayrılırlar. Bölge belirlendikten sonra spesifik primerli PCR amplifikasyonuna tabi tutulur. Bu spesifik primerler 3' sonlarında bilinmeyen kromozomal restriksiyon fragmentlerine doğru yürüyen üç nükleotidden birinin uzamasını sağlar. Bir selektif nükleotidin uzaması ligate edilmiş fragmentlerin 1 / 4'ünü amplifiye eder. Oysa her iki primerdeki 3 selektif nükleotid, fragmentlerin 1 / 4.096'sını amplifiye eder. Daha sonra ortalama kesim sıklığına sahip olan PCR primeri işaretlenir, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) işlemine tabi tutulur. Sonuçta 200 adet banttın 40 adet yüksek derecede informatif kalıp elde edilmiş olur (Savelkoul ve ark 1999).

En yeni ve en çok gelecek vaat eden metodlardan birisi AFLP analizidir. Bu metod üretkenliği ve ayırmıcılığının yüksek gücü ile universal uygulamalara kombine edilir. Artan sayılardaki raporlarda, mikrobial tip tayini, phylojenetik çalışmaları, medikal teşhisler, bitki ve hayvanların genetik haritaları için AFLP analizinin kullanıldığı bildirilmektedir. AFLP üretkenliği ve kuvvetinden dolayı RAPD testinin üzerinde yaygın bir popolarite kazanmıştır (Lan ve Reeves 2000, Savelkoul ve ark 1999).



Şekil 2.1. AFLP Prosedürü

2.7.2.5. Dizisi etiketlenmiş alanlar (STS)

STS (Sequence-Tagged Sites) tekniği RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını bir araya getiren bir tekniktir. Nükleotid dizisi bilinen az kopyalı RFLP problemlerinden yeterli uzunlukta (16-24 nükleotid) başlatıcı DNA'lar geliştirilmekte ve bu başlatıcılarla genomik DNA üzerinde çok spesifik şartlarda DNA üretimi yapılmasıyla RFLP probunun temsil ettiği lokus çoğaltılmaktadır. Teknik kullanım olarak RFLP'ye göre daha kolay, ucuz ve hızlıdır. Az miktarda DNA gerektirir. Farklı haritalar arasında transferi mümkündür. Tekniğin dezavantajı, ilgili RFLP probunun nükleik asit dizilişinin bilinmesini ve buna göre bir çift başlatıcı DNA geliştirilmesini gerektirir. Ayrıca polimorfizm oranı orta düzeydedir (Yıldırım ve Kandemir 2001).

2.7.2.6. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs)

SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) birbirleriyle karşılaştırılan farklı 2 bireye ait sekanslar arasında tek bir nükleotid farklılığını gösteren değişimlerdir. Bu değişimlerin evrim bilimi için önemi; moleküler antropoloji çalışmalarında kullanılması, türlerin atasal genlerinin izlerinin sürülmesi, değişimlerinin araştırılması ve göç yollarının belirlenmesinde kullanılmasıdır (Ülgenalp 2002).

2.7.2.7. Mitokondrial DNA (mtDNA)

Nüklear genom yanında çok küçük kalan ancak hücre için çok önemli olan bir de mitokondri genomu vardır. Yapısı çok basittir, prokaryotik genom özelliklerini gösterir. Nüklear genomdaki tekrarlar ve genlerdeki intron bölgeler mevcut değildir. Nüklear genomun aksine mitokondrial genomun % 93'ü kodlayan dizilerden oluşur. Ancak mtDNA'nın kodladığı ürünler mitokondri fonksiyonları için yeterli olmadığından burada fonksiyon gören proteinlerin bir kısmı da nüklear genom tarafından kodlanır. Zigot oluşumu sırasında sperm hücreleri sadece nüklear genomu verdiklerinden mtDNA'nın maternal kalıtımı söz konusudur (Ayter 2002).

mtDNA'nın anne tarafından kalıtılması özelliği yanı sıra, hücre içindeki kopya sayısı çok büyük olduğundan kriminal laboratuvarlarda incelenmesi istenen ve genellikle çok az miktarda bulunan biyolojik delillerden identifikasyona gidebilmek mtDNA yoluyla çok kolay olabilmektedir. Nükleer DNA ile incelenmesi çok zor olan eski kemikler, ileri derecede degrade olmuş biyolojik materyal veya tek ve köksüz kıl örneklerinde mtDNA ile büyük başarı elde edilmektedir (Kalsoğlu ve Yükseloğlu 2002).

2.7.2.8. Değişken sayılı ardarda tekrarlar (VNTR)

VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)'ler veya minisatellitler genellikle DNA üzerinde ardışık tekrarlayan diziler içinde yer alan 10-100 baz çifti (bç) uzunluğunda kısa tekrar birimlerinden oluşur. VNTR lokusları gen içinde şifrelenmeyen diziler olup genellikle kromozomların subtelomerik bölgelerinde yerleşmişlerdir ve genom içinde dağınık halde bulunurlar (Aksoy ve ark 1999). Bu polimorfizm örnekleri tekrarlayan dizide oluşan varyasyonlarla ortaya çıkar. Allel sayısı çok geniş olup (multiallellik) birçok RE ile tanımlamaları yapılabilir. VNTR problemleri ya lokusa spesifik olabilir ya da polimorfik lokuslara (fingerprinting için kullanılan minisatellit problemleri) dağılmış olarak bulunabilir. VNTR'ler RFLP'lere göre daha informatif belirleyicilerdir (Solak ve ark 1997).

VNTR lokuslarının en önemli özellikleri ardışık tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişim göstermesidir. Bu nedenle büyük oranda allelik varyasyon gösterirler. Bu varyasyonların eşit olmayan çapraz geçişler veya replikasyon kayması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bir lokusta çok sayıda farklı değişken dizilerin varlığı sonucu toplumda çok sayıda allel (hiperallelizm) oluşur ve çok sayıda birey heterozigot olur. Bazı VNTR lokuslarında heterozigotluk %100'lere kadar varmaktadır. VNTR lokuslarının tiplendirilmesinde ilk kullanılan yöntemler Southern blot tekniğine dayalı DNA analiz yöntemleriydi. Ancak günümüzde VNTR analizleri için kullanılan yöntemler, PCR tekniği ile değişken sayıda ardışık tekrarlar (VNTR) içeren

DNA fragmanlarının bu yörelere komplementer uygun primerlerle amplifikasyonu, amplifiye ürünün jelde yürütülmesi ve daha sonra ethidium bromit ile boyanarak UV ışık altında gözlenmesi esasına dayanmaktadır. VNTR lokusları yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle önemli genetik belirleyiciler olarak kabul edilirler. Bu nedenle çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadırlar. Bu alanlar; gen haritalanması, kimliklendirme, paternite testleri, adli tıp, prenatal tanı, kanser ile ilişkili odakların belirlenmesidir (Aksoy ve ark 1999).

2.7.2.9. Basit dizi tekrarları veya mikrosatellitler (SSR veya STR)

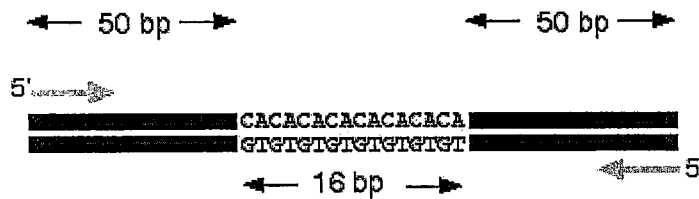
PCR tekniğinin geliştirilmesiyle biyoteknoloji alanında son 20 yıl içerisinde hayal edilemeyecek ilerlemeler olmuştur. Farklı canlı türlerine ait populasyonların bireylerinin çeşitli DNA bölgeleri yükseltgenip incelenebilmeye başlanmıştır. Bir türün populasyonları gibi evrimsel olarak yakın canlı gruplarının karşılaştırmalı olarak çalışılacağı ya da populasyonlarda yakın zamanda oluşmuş olan bir olayın izlerinin aranacağı bir durumda en çok kullanılan genetik işaretlerden biride mikrosatellitlerdir (Togan ve ark 2003).

Mikrosatellitler, genom içerisinde mono-di-tri-tetra-penta nükleotid dizilimlerinden biri şeklinde ökaryotik genom boyunca ardışık olarak tekrarlanan kısa DNA motifleridir. Bu tekrarlar (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını göstermektedir. Bunlar yüksek sıklıkta meydana gelir ve tüm genom boyunca neredeyse tek düze dağıtılmışlardır. Yüksek değişkenlikleri onları ekolojide tercih edilen bir marker yapmıştır, çünkü doğal populasyonlarda akrabalık derecelerinin belirlenmesini sağlamaktadırlar (Hancock 1998).

SSR (Simple Sequence Repeat) veya STR (Short Tandem Repeat) diye de ifade edilen mikrosatellitler basit diziler içinde yer alan tekrarlar olması nedeniyle polimorfik yapıya sahiptirler (örneğin (AC)_n tekrarları gibi). Bir mikrosatellit içeren DNA molekülünün

amplifikasyonu değişken büyüklükte fragmentler üretir (Bhatramakki ve ark 2000, Liu ve ark 2000, Solak ve ark 1997).

Yüksek derecede polimorfik özelliğe sahip olan mikrosatellitler, bireyden bireye 2-6 nükleotidlik küçük farklılıklar gösterirler ve mikrosatellit bölgeleri genom boyunca rastgele dağılırlar. Yüksek derecede değişkenlik gösteren bu DNA dizileri genom boyunca yaygın olarak görülmektedirler. Bu ardışık tekrar dizilerinin gösterdiği tekrar sayısı aynı lokus bakımından incelenen bireyler arasında farklılık gösterirler. Her tip tekrar sayısı bir allele karşılık geldiğinden bir lokus 6-30 allel içermektedir. Allel sayısının fazlalığı populasyon içi ve populasyonlar arası genetik farklılığın çözünürlüğünü artırdığından ayrıca göreceli olarak ucuz ve kolay çalışılabilirdiklerinden dolayı birçok populasyon genetiği çalışmalarında mikrosatellitler tercih edilmektedir. Bu yüksek derecede polimorfizm şekli ve lokusa spesifik markerlar olması nedeniyle mikrosatellitler ayrıca linkage (bilesiklik) analizleri, ebeveyn tayini alanlarında da oldukça yaygın kullanım alanlarına sahiptir (Togan ve ark 2003, Zane ve ark 2002, Yıldırım ve Kandemir 2001, Ellegren ve ark 1997, MacHugh ve ark 1997).



Şekil 2.2. DNA'daki mikrosatellit tekrarları [(CA)₈ ve (GT)₈]

2.8. İstatistiksel Analizler

Populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan birçok istatistik metodu geliştirilmiştir. Klasik genetik markerlar için kullanılan istatistik metotları, mikrosatellit markerlarıyla elde edilen verilerin yorumlanması için yeterli olmamaktadır. Mikrosatellit verilerinin analizi için yeni istatistiksel metotlar geliştirilmiştir. Luikart ve England (1999)'ın yaptığı bir çalışmada mikrosatellit verileri için yapılan bilgisayar programları ve yeni istatistiksel

metotlar hakkındaki son yenilikler kısaca anlatılmıştır. Bu çalışmada kullanılacak olan istatistiksel metotlar hakkında geniş bilgi materyal ve metot kısmında verilmeye çalışılacaktır.

2.9. Koyun ve Diğer Bazı Evcil Hayvanlarda Yapılan Genetik Çalışmalar

Moleküler genetik alanındaki gelişmeler hayvan ıslahına da aynı şekilde yansımıştır. Artık bütün dünyada ekonomik önemi olan çiftlik hayvanlarında, moleküler genetik teknikleri kullanılarak, hayvanların verim özellikleri yüksek karakterleri tespit edilerek, bu özelliklerin populasyonlarda artırılması çalışmaları yapılmaktadır. Bunu yapmak için de mevcut populasyonların genetik yapılarının belirlenmesi gerekmektedir.

Populasyonların genetik yapıları belirlenirken önceleri protein düzeyinde çalışmalar yapılmaktaydı. Gelişen bilim ve teknoloji ile birlikte çalışmalar DNA düzeyine inmiştir. DNA düzeyindeki çalışmalarda en çok kullanılan markerlardan biri de mikrosatellitlerdir.

Dünyanın birçok ülkesindeki araştırmacılar, kendi ülkelerine has hayvan populasyonlarında mikrosatellit markerları kullanarak çalışmalar yapmıştır. Fakat Türkiye’de DNA düzeyindeki çalışmalar oldukça yeni sayılabilecek durumdadır. Aşağıda koyun ve bazı diğer evcil hayvanlarda yapılan genetik çalışmalar konusunda bilgi verilecektir.

Romanov ve Weigend (2001) Ukrayna ve Almanya’da yetiştirilen evcil ve yaban tavuklarında 20 populasyon ve 224 bireyde, 14 mikrosatellit lokusu ile genetik çeşitlilik ve genetik farklılıkları çalışmışlar ve mikrosatellitlerin populasyon ve ırkların genetik ilişkileri konusunda oldukça kullanışlı olduklarını ve gelecekteki araştırmalar ve koruma stratejileri geliştirilmesi için faydalı olacaklarını belirtmişlerdir.

Aranguren-Mendez ve ark (2001)’nin eşeklerde yaptığı çalışmada, İspanya’da bulunan ve populasyon sayıları oldukça azalan ve yüksek oranda akrabalı yetiştirmeye bağlı olarak yok olma riski taşıyan eşeklerde genetik çeşitlilik çalışılmış, bu çalışmada 13 adet at

mikrosatelliti kullanılmış, ASB-2 mikrosatelliti hariç diğer bütün mikrosatellitlerin çeşeklerde de kullanılabileceği görülmüş ve HMS-1 mikrosatelliti dışındakilerin hepsinin polimorfik olduğu ve HMS-5 lokusunun dışındaki bütün lokuslarda Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) sapma gözleendiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmada kullanılan hayvanlar arasında önemli bir genetik farklılığın olmadığı fakat bütün popülasyonların çalışmada kontrol olarak kullanılan bir at popülasyonundan büyük farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Morera ve ark (1999) 5 İspanyol köpek ırkında 5 mikrosatellit lokusu kullanarak genetik çeşitliliği araştırdıkları çalışmada ırklar arası çeşitliliği göstermek için mikrosatellitlerin çok kullanışlı markerlar olduklarını bildirmişlerdir.

İberia domuz ırklarında 25 mikrosatellit markeri kullanılarak yapılan bir çalışmada (Martinez ve ark 2000) genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu, ayrıca 19 lokus açısından da HWE'den sapma gözleendiği ve bu sapmayla birlikte varyasyonun çok düşük olduğu bildirilmiştir. HWE'de görülen bu sapmanın nedeninin ya genetik sürüklenme veya popülasyonun bir dar boğazdan geçmiş olmasına bağlı olabileceği söylenmektedir. Çalışmada kullanılan mikrosatellitlerin popülasyonların genetik yapısını araştıran çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Saitbekova ve ark (1999) 20 adet sığır mikrosatellit markeri kullanarak 8 farklı İsviçre keçi ırkında genetik çeşitliliği araştırmışlar ve sığır mikrosatellitlerinin keçilerde de iyi randıman verdiğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada İsviçre keçi ırklarının birbirleriyle genetik olarak yakın ilişkili olduğunu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar mikrosatellitlerin keçi ırkları arasındaki farklılığın gösterilmesinde kullanılabilecek çok güçlü markerlar olduğunu ve ilerde popülasyonların geçmişi ile ilgili yapacakları çalışmada yine mikrosatellitleri kullanacaklarını belirtmişlerdir.

Luikart ve ark (1999) 8 keçi mikrosatelliti, 9 sığır mikrosatelliti ve 5 adet koyun mikrosatelliti olmak üzere toplam 22 mikrosatellit markeri kullanarak keçilerde ebeveyn tayini (parentage test) konusunda çalışmışlardır.

5 adet sığır ve 1 adet koyun mikrosatelliti olmak üzere toplam 6 mikrosatellit markeri ile Çin'de bulunan 5 yerli keçi ırkındaki genetik ilişkiyi araştıran Yang ve ark (1999) sonuçların keçilerin tarihi geçmişi ve buldukları coğrafyayla uyumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Schmid ve ark (1999) 30 mikrosatellit lokusu kullanarak İsviçre'deki 5 farklı sığır ırkında genetik çeşitliliği çalışmışlardır. Herens ırkı hariç diğer populasyonların HW dengesinde olduğu gözlemlenmiştir. Herens ırkında HW dengesinden sapma sebebinin de daha çok akrabalı yetiştirme ve null alleli oluşumuna bağlı olabileceği belirtilmektedir.

Moazami-Goudarzi ve ark (1997) 10 Avrupa sığır ırkında 17 mikrosatellit ve 11 kan grubu, transferin ve β -Kazein lokuslarını kullanarak bu sığır ırkları arasındaki genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Yine bu çalışmaya benzer olarak Kantanen ve ark (2000)'da ırklar arası genetik ilişki, populasyonlar arası genetik çeşitlilik ve populasyonların genetik yapısını araştırmak için 10 mikrosatellit lokusu, 11 alyuvar enzim sistemi, 4 süt proteini ve 4 plazma proteini lokuslarını kullanarak 20 Kuzey Avrupa sığır ırkında çalışmışlardır. Araştırmacılar genellikle mikrosatellit çalışmalarının 5-12 lokus arasında değiştiğini, bu sayının birbirinden büyük oranda farklı ırklar (örneğin Afrika sığırları ve Avrupa sığırları) arasında yapılan çalışmalarda populasyonları birbirlerinden ayırmak için yeterli olabileceğini fakat birbirine genetik olarak yakın olan ırkların (örneğin Hereford, Friesian ve Simental sığır ırkları) evrimsel ilişkilerinin gösterilmesinde yetersiz olacağını bildirmektedirler.

6 yerli İspanyol sığır ırkında 30 mikrosatellit lokusu kullanarak bu ırklar arasındaki genetik çeşitliliği araştıran Martin-Burriel ve ark (1999), diğer Avrupa sığır ırklarında bulunan sonuçlara benzer sonuçlar bulduklarını belirtmişlerdir.

MacHugh ve ark (1997) Afrika, Avrupa ve Asya kıtalarındaki Zebu (*Bos Indicus*) ve Taurine (*Bos Taurus*) ırklarına ait 20 farklı popülasyonda 20 mikrosatellit lokusu kullanarak bu ırkların evrimsel ilişkileri ve moleküler biyocoğrafyalarını incelemişlerdir.

Bishop ve ark (1994) 172 mikrosatellit, 3 RFLP, 4 SSCP, 9 eritrosit antijeni ve 7 serum proteini kullanarak sığır genom haritasını çıkartmışlardır.

Eski Dünya ve Yeni Dünya Holstein Friesian sığır popülasyonlarında yapılan bir çalışmada (Hanslik ve ark 2000) 211 hayvanda 39 mikrosatellit markeri kullanılmıştır. Genetik çeşitliliğin 5 Holstein Friesian sığır ırkında da benzer olduğu gözlenmiş ve bu oranın 0,43-0,48 arasında olduğu bildirilmiştir. Bireylerdeki allel paylaşım uzaklıklarına dayalı olarak çizilen ağaçta, Eski Dünya ve Yeni Dünya Holstein Friesian sığırlarında genetik farklılığın açıkça görüldüğü bildirilmektedir. Aynı şekilde F_{ST} değerlerinin hesaplanmasıyla bulunan popülasyonlar arasındaki farklılığın oldukça önemli olduğu bildirilmiştir.

Yakın Doğu sığır ırklarında mikrosatellitlerle yapılan bir çalışmada (Loftus ve ark 1999) 20 lokusta toplam 228 allel gözlenmiş ve lokus başına ortalama 11,4 allel düştüğü bildirilmiştir. Çalışmada en yüksek allel sayısı Yakın Doğu ırklarında (Irak ve Doğu Anadolu Kırmızısı), en düşük allel sayıları da bu bölgenin dışında yaşayan ırklarda (N'Dama, Jersey ve Ongole) gözlenmiştir. Hörgüçsüz sığır ırklarındaki genetik çeşitlilik ve allel sayılarının buldukları bölgeyle önemli bir ilişki gösterdiği belirtilmiştir.

Karşılaştırmalı genom çalışmaları ruminantların genom organizasyonlarının birbirine çok benzediğini ortaya koymaktadır. Örneğin, sığırın 30 çift kromozomu olmasına rağmen koyun genomunda yukarıda da belirtildiği gibi 27 çift kromozom bulunmaktadır. Sığır 1.

ile 3., 2. ile 8. ve 5. ile 11. çift kromozomlarının birleşik halleri koyunun ilk üç kromozom çiftlerinin (1., 2. ve 3.) benzeridir. Bu iki türün diğer kromozomlardaki gen sıralamaları benzemektedir (Kappes 1999). Sığır mikrosatellit markerlerinin %70 kadarı koyunda PCR yöntemiyle kullanılabilir ve yaklaşık olarak %60 kadarı enformatiftir (Maddox 2000, de Gortari ve ark 1998). Bu özellik bu türler için genetik bilgi paylaşımını ve özellikle koyun genetik çalışmalarının hızını olumlu yönde etkilemektedir.

Buchanan ve ark (1994)'nın koyunlarda yaptığı bir çalışmada 8 koyun mikrosatelliti kullanılmıştır. 6 farklı populasyonda (Romney, Border, Leicester, Suffolk, Awassi, Avustralya ve Yeni Zelanda Merinosları) akrabalık ilişkisi olmayan ortalama 40-50 bireyde yapılan çalışmada farklı ırklardan alınan örneklerin allel frekanslarının oldukça önemli farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu allel frekanslarının çalışılan ırklardaki bir bireyi bile tanımlamak için doğruluğu yüksek sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Allel frekanslarının farklılıkları kullanılarak soy ağacı çizilmiş ve çizilen ağaçta Merinosların bir grup; Border Leicester, Suffolk ve Romney ırklarının başka bir grup ve Awassi (İvesi) ırkının hepsinden farklı başka bir grup oluşturduğu gözlemlenmiştir. Merinos ve İngiliz ırkı koyunların protein polimorfizmi çalışmalarıyla da ayrımının başarılı olduğunu fakat belirli ırkların evrimsel ilişkilerinin mikrosatellit markerlarla daha iyi gösterilebileceği bildirilmiştir.

Farid ve ark (2000) Kanada'da yetiştirilen 10 adet koyun ırkında toplam 257 koyun kullanarak 10 mikrosatellit lokusu açısından koyunlarda ırk içi ve ırklar arası genetik çeşitliliğin seviyesini belirlemişlerdir.

Boyce ve ark (1997) büyük boynuzlu (bighorn) koyun ırklarında populasyonlar ve bireyler arasındaki genetik çeşitliliği Major Histocompatibility Complex (MHC) ve mikrosatellit lokusları açısından aynı ırk ve bireylerde karşılaştırmışlar ve genetik çeşitliliğin MHC ve mikrosatellit markerları yönünden benzer olduğunu gözlemlemişlerdir.

İlk kapsamlı koyun genom haritası 1995 yılında Crawford ve ark (1995) tarafından geliştirilmiştir. Bu harita koyun genomunun 2070 cM'lik bölümünü kapsıyordu. Yapılan çalışmada kullanılan markerların 7 RFLP ve 7 protein markeri dışında hepsi mikrosatellit markeriydi. Mikrosatellit markerlarından 19 adedi bilinen mikrosatellitler ve gerisi 86 koyun, 126 sığır ve 1 geyik mikrosatellitini kapsıyordu. Bulunan önemli sonuçlardan birisi koyunların genetik olarak çok heterojenik yapıda olduğu şeklinde belirtilmiştir. Bundan üç yıl sonra 1998 yılında (de Gortari ve ark 1998) koyun genomunda 2. jenerasyon linkage (bileşiklik) gen haritası yayınlanmıştır. Bu çalışmada 2-3 gen haritası birleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan 519 markerin 504'ü mikrosatellit markerlarıdır. Toplam gen haritasının uzunluğu 3063 cM, ortalama marker aralığı ise 6,5 cM bulunmuştur. Üçüncü jenerasyon linkage haritası 1093 marker içermekte olup 3500 cM uzunluğundadır ve markerler arası ortalama uzaklık 3.4 cM olarak bulunmuştur (Maddox ve ark 2001). ARKDB veri tabanında (<http://www.thearkdb.org>) Nisan 2003 itibariyle koyun genomunda 1722 marker (bunların 370 adeti gen) bulunmaktadır.

Bighorn koyunlarında 10 mikrosatellit markeri kullanılarak yapılan bir çalışmada (Gutiérrez- Espeleta ve ark 2000) 13 farklı bölgeden 279 adet koyun kullanılmış ve bu koyunlarda genetik çeşitlilik ve populasyon yapıları incelenmiştir. Çalışmada bütün lokuslar yönünden genetik çeşitliliğin önemli düzeyde olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar ayrıca populasyonlar arasındaki genetik farklılığın yüksek olduğunu, genetik ve coğrafi uzaklık arasında pozitif ilişki bulduklarını bildirmişlerdir.

Arranz ve ark (2001a) İspanya'daki koyun ırklarında (Churra, Latxa, Castellana, Rasa-Aragonesa, Merinos ve Awassi) mikrosatellitleri kullanarak, bu ırklar arasında genetik farklılığı araştırmışlardır. Yapılan araştırmada Latxa ırkında kümeleşme en yüksek düzeydeyken, Merinoslarda en düşük seviyede bulunmuş, ayrıca Merinos ırkının özel bir gruplaşma gösterdiği ve diğer bazı ırklarla da yakın ilişkili olduğu gözlemlenmiştir.

Arruga ve ark (2001) Raga Aragonesa ırkı koyunlarda babalık testi için 4 mikrosatellit lokusu kullanmışlar, heterozigotluğun oldukça yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuçta mikrosatellitler ile serum transferrin lokusunun birlikte kullanılmasıyla babalık tayininde % 97,2 oranında doğru sonuçlar alınabileceğini belirtmişlerdir.

Hedrick ve ark (2001)'nın Tiburon Adası'ndaki Desert Bighorn koyunlarında mikrosatellit ve MHC lokuslarını kullanarak yaptıkları bir çalışmada, Tiburon Adası'ndaki populyasyonda genetik çeşitliliğin Arizona bölgesindeki aynı ırka ait alt gruplardan daha az olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca Tiburon populyasyonu, Arizona'daki örnekler arasında genetik uzaklığın fazla olduğunu ve bu durumun populyasyondaki genetik sürüklenmeden kaynaklanabileceğini, bunun sebebinin de populyasyonun oluşumunda az sayıda aynı erkek bireylerin kullanılmasından ve bilinmeyen diğer etkilerden kaynaklanabileceğini belirtmektedirler.

Ellegren ve ark (1997)'nin polimorfik özellikteki mikrosatellitlerle yaptığı bir çalışmada 13 sığır, 14 koyun mikrosatellit markeri kullanılmıştır. Polimorfik olan markerlardan 6 sığır mikrosatellitinin koyunlarda, 7 koyun mikrosatellitinin de sığırlarda monomorfik olduğu, heterozigotluk derecesinin oldukça yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu iki tür arasında farklılığın boyutu ve genetik çeşitliliğin derecesi bakımından açıklayıcı bir ilişki bulunamadığı bildirilmiştir.

Baltık koyun ırklarında yapılan bir çalışmada (Grigaliūnaite ve ark 2003) 197 adet koyun ve 15 adet mikrosatellit markeri kullanılarak genetik çeşitlilik araştırılmış, çalışmada kullanılan bütün mikrosatellitlerin polimorfik olduğu, beklenen ve gözlenen heterozigotluklar arasında büyük bir farklılığın gözlenmediği belirtilmiştir.

Diez-Tascon ve ark (2000)'nin 6 Merinos ırkı koyun populyasyonu arasında mikrosatellit markerlarla genetik çeşitliliği araştırdığı bir çalışmada 253 adet akrabalık ilişkisi olmayan birey ve 20 adet mikrosatellit markeri kullanılmıştır. 6 populyasyon

arasındaki genetik çeşitliliğin birbirine benzer sonuçlar verdiği, çalışılan markerlardan 2 tanesinin Hardy-Weinberg dengesinden sapma gösterdiği bildirilmiştir. Bu 2 markerin, pedigrisi bilinen numunelerle incelendiğinde yanlış sonuçlar verdiği belirlenmiş ve çalışmadan çıkarılmıştır. Ayrıca Portekiz Siyah Merinos popülasyonunda yüksek derecede akrabalı yetiştirme sonucu heterozigotluğun çok düşük olduğu ve popülasyonun risk altında bulunduğu bildirilmektedir.

İspanyol koyun ırklarında yapılan bir çalışmada (Arranz ve ark 2001b) 18 mikrosatellit markeri ve 6 İspanyol yerli koyun ırkı kullanılarak genetik çeşitlilik araştırılmış ve Merinos koyun ırkı her lokusta görülen allel sayısının en yüksek olması bakımından en yüksek genetik çeşitliliği gösterirken, Latxa ırkında genetik çeşitlilik en düşük düzeyde gözlemlenmiştir. Aynı araştırmacılara ait başka bir çalışmada (Arranz ve ark 1998) İspanyol koyun ırkları arasındaki genetik ilişki mikrosatellit markerlerle araştırılmış ve 5 İspanyol ırkı koyun, 19 mikrosatellit markeri kullanılmış, ayrıca Awassi (İvesi) koyun ırkı referans ırk olarak kullanılmıştır. Aynı şekilde Merinos ırkında genetik çeşitliliğin en fazla olduğu ve en düşük varyasyonunda Awassi ırkında gözlemlendiği bildirilmiştir. Awassi ırkı ile İspanyol ırkları arasında büyük bir farklılığın olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre de morfolojik verilerin tek başına ırklar arası genetik ilişkinin tanımlanmasında yetersiz olduğu, genetik markerları da içine alan çalışmaların bu konuda büyük fayda sağlayacağı bildirilmiştir.

Stahlberger-Saitbekova ve ark (2001) 16 koyun, 9 sığır ve 6 keçi mikrosatelliti kullanarak, İsviçre koyun ırklarındaki genetik ilişkiyi araştırmışlardır. Ayrıca 7 İsviçre koyun ırkına ilave olarak, 1 adet yaban tipi Mouflon çalışmaya dahil edilmiştir. Bütün yerli koyun ırklarında ortalama heterozigotluğun oldukça yüksek olduğunu, Mouflon popülasyonunda ise en düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bütün sığır, keçi ve koyun mikrosatellit markerlerinin koyunlarda iyi sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir. 19-20

allel sayısı ile BM1818, INRA063, MAF70 ve OarJMP29 lokuslarının yüksek derecede informatif olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca OarFCB193 lokusunun 107 baz çifti uzunluğu ile % 92'lik bir frekansla Mouflon populasyonunda özel bir allele sahip olduğu gözlemlenmiştir. Özel allellerin diğer koyun ırklarında da bulunduğu fakat frekanslarının % 10'u geçmediği belirtilmiştir.

Türkiye'deki yerli ve melez toplam 5 koyun populasyonu (3 yerli, 2 melez) kullanılarak yapılan bir çalışmada (Soysal ve ark 2001) toplam 174 birey, 3 mikrosatellit markeri yönünden incelenmiştir. Yapılan çalışmada toplam 45 adet allel gözlemlenmiş, populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu ve varyasyonun yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.10. Çalışmanın Amaçları

Çiftlik hayvanlarında ekonomik değeri olan verim özelliklerinde başarılı ıslah çalışmalarının yapılabilmesi için, bu hayvanların genetik yapılarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Genetik yapının belirlenmesi çalışmaları daha önceleri protein ve enzim polimorfizmine dayalı tekniklerle yapılmaktaydı. Son yıllarda bu çalışmalar direkt DNA gözlenerek yapılabilmektedir. Bu nedenle birçok araştırmacı kendi ülkelerine ait ıslah ve yerli gen kaynaklarının korunması stratejilerinde DNA'ya dayalı markerların da kullanılması için çalışmaktadırlar. Türkiye'de bu konuyla ilgili çalışmalar hem yeni hem de sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu amaçla, ülkemiz çiftlik hayvanları içerisinde % 59,3 (DİE 2002) gibi önemli bir dilimi teşkil eden koyunlarda mikrosatellit markerlar kullanılarak yapılan bu çalışma planlanmıştır. Çalışmanın amaçları kısaca özetlenecek olursa;

- Öncelikli amaç, Türkiye'de populasyon genetiği çalışmaları içerisinde yeni sayılabilecek mikrosatellit markerlarla yapılan çalışmalara katkıda bulunmak ve bu çalışma metodunun laboratuarda rutin uygulanabilirliğini sağlamak,

- Çalışılan lokuslar (OarFCB20, OarJMP29 ve OarJMP58) açısından, çalışmada kullanılan koyun ırklarının içerdikleri genetik varyasyonu belirlemek,
- Melezleme çalışmalarıyla elde edilen koyun tipleri arasındaki genetik farklılık ve benzerlikleri belirlemek,
- Oluşturulan yeni koyun tiplerinin, yerli ve kültür ırklarına olan genetik yakınlıklarını (veya uzaklıklarını) belirlemek,
- Çalışılan koyun ırklarında, her bir ırkın kendisine ait özgün allel (private allel)'e sahip olup olmadığını belirlemek,
- Ülkemize ait bu ırkların genetik yapılarının belirlenmesiyle elde edilen verilerin kullanılarak, ülkemiz ve diğer ülke koyun ırkları arasında bir karşılaştırma imkanı sağlamak,
- Çalışmada kullanılan mikrosatellit bölgelerine ait verilerin, yapılacak benzer çalışmalara veri tabanı olarak katkısını sağlamaktır.

3. MATERYAL ve METOT

Çalışmada toplam 169 adet yerli, yabancı ve melez koyun ırkına ait birey kullanılmıştır. Materyal toplanılan bireyler seçilirken özellikle bireyler arasında uzak ya da yakın akrabalık ilişkisi olmamasına özen gösterilmiştir.

3.1. Materyal

Çalışma materyalini oluşturan kan örnekleri, Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü (KHMAE)'nde yetiştirilen 11 adet, Konya Ereğli Tarım İşletmesi (KETİ)'nde yetiştirilen 4 adet ve Konya Gözlü Tarım İşletmesi (KGTİ)'nde yetiştirilen 13 adet olmak üzere toplam 28 adet Akkaraman ırkı (Akk), yine KHMAE'de bulunan 30 adet Konya Merinosu (KNYM), 1 adet Alman Siyah Baş (ASB), 28 adet Hasak (HSK), 30 adet Hasmer (HSM), 13 adet F1 melezi olan AA (ASB X Akk melezi), Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü (MHAE)'nde yetiştirilen 27 adet ASB ve 12 adet Karacabey Merinosu (KCBM) koyun ırklarından olmak üzere toplam 169 adet koyundan toplanmıştır (Tablo 3.1).

ASB koyun ırkı artık Türkiye'de sadece MHAE'nde ve çok az sayıda yetiştirilmekte olduğundan, adı geçen enstitüden temin edilmiş olup, aralarında akrabalık ilişkileri bulunmaktadır.

Ayrıca popülasyonları birlikte değerlendirmek ve sonuçlarını daha iyi yorumlamak amacıyla aynı konuda çalışan diğer araştırmacılar (Togan ve ark 2004, Soysal ve ark 2001) kendilerinin izni ve tavsiyesiyle temin edilen Tekirdağ İnanlı Tarım İşletmesi'nde (TİTİ) yetiştirilen 24 adet Kıvırcık (Kıv) (Soysal ve ark 2001) ve Denizli, Burdur, Isparta ve Muğla bölgelerindeki yetiştiricilerden temin edilen 33 adet Dağlıç (Dag) (Togan ve ark 2004) yerli ırklarına ait verilerde sunulan çalışmada karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır (Tablo 3.1). Ayrıca çalışmada kullanılan ırklar ile ilgili yapılan melezlemeler tablo 3.2'de verilmiştir.

Çalışmada ayrıca aynı mikrosatellit bölgelerini farklı koyun ırklarında daha önce ABI 377 yarı otomatik DNA analiz cihazında çalışan araştırmacılar (Togan ve ark 2004) temin edilen ve baz çifti bilinen 5 adet DNA örneği pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Kan örnekleri sayıları ve örneklerin alındığı yerler

POPULASYON	ÖRNEK SAYISI	ÖRNEK ALINAN YER
Akkaraman	28	KHMAE, KETİ, KGTİ
Konya Merinosu	30	KHMAE
Karacabey Merinosu	12	MHAE
ASB	28	KHMAE, MHAE
Hasak	28	KHMAE
Hasmer	30	KHMAE
AA	13	KHMAE
* Kıvırcık	24	TİTİ
** Dağlıç	33	DENİZLİ, BURDUR, ISPARTA, MUĞLA
TOPLAM	226	

* Soysal ve ark (2001)'dan sadece veriler temin edilmiştir.

** Togan ve ark (2004)'dan sadece veriler temin edilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ırklar için yapılan melezlemeler

Hasak	1- HD♂ X Akk♀ = F1 (HD F1) → HD♂ X F1 = G1 (HD G1) 2- ASB♂ X Akk♀ = F1 (ASB F1) → ASB♂ X F1 = G1 (ASB G1) 3- HD(F1) X HD (G1) X ASB (F1) X ASB (G1) = Hasak (Tekin ve ark 2001)
Hasmer	1- HD♂ X KNYM♀ = F1 (HD F1) → HD♂ X F1 = G1 (HD G1) 2- ASB♂ X KNYM♀ = F1 (ASB F1) → ASB♂ X F1 = G1 (ASB G1) 3- HD(F1) X HD (G1) X ASB (F1) X ASB (G1) = Hasmer (Tekin ve ark 2001)
ASB	ASB'nin genotipinde HD olduğunda bildirilmektedir (Akçapınar 2000)
KNYM	Merinos X Akkaraman (Yalçın 1990)
KCBM	Merinos X Kıvırcık (Yalçın 1990)
AA	ASB♂ X Akk♀ = F1 (ASB F1)

3.2. Metot

3.2.1. Kan örneklerinin toplanması

Kan örnekleri koyunlardan Vena jugularis'ten tekniğine uygun olarak K₃EDTA'lı tüplere yaklaşık 10 ml kadar alınmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Kandan DNA ekstraksiyonu

Alınan kanlardan DNA'yı ekstrakte etme işlemi Standart Fenol/Kloroform Yöntemi ile yapılmıştır.

- Derin dondurucuda ($- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) muhafaza edilen kan örnekleri çözündürülerek her bir örnekten $100\text{ }\mu\text{l}$ $1,5\text{ ml}$ 'lik ependorf tüplerine aktarıldı.
- Üzerine $300\text{ }\mu\text{l}$ 1XTNE, $30\text{ }\mu\text{l}$ Tris-Hcl (pH: 8), $5\mu\text{l}$ Proteinaz-K (10 mg/ml) ve $10\text{ }\mu\text{l}$ % 20'lik SDS solüsyonlarından ilave edildi. Tüplerin ağzı kapatılarak $50-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 12 saat (1 gece) karıştırıcılı inkübatörde bekletildi.
- İnkübasyon işleminden sonra her bir tüpe $445\text{ }\mu\text{l}$ fenol çözeltisi eklenerek 10 dakika (dk) alt üst edilerek karıştırıldı ve 3000 rpm 'de, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 10 dk santrifüj (Hettich Universal 32R) edildi.
- Santrifüj işleminden sonra tüplerin üst kısmındaki süpernatant tabakası dikkatlice alınarak temiz ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerlerine $445\text{ }\mu\text{l}$ fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklendi ve tüpler 10 dk alt üst edildikten sonra 3000 rpm 'de, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant tekrar temiz ependorf tüplerine aktarıldı ve bu sefer üzerine $445\text{ }\mu\text{l}$ kloroform:isoamil alkol (24:1) eklenerek 10 dk alt üst edilip, 3000 rpm 'de, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant tekrar temiz ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerlerine $- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen etil alkolden (% 96) $890\text{ }\mu\text{l}$ eklendi, 10.000 rpm 'de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Santrifüj işleminden sonra tüplerin dip kısmında pellet elde edildi.
- Tüpler tamamen boşaltılarak pellet %70'lik $890\text{ }\mu\text{l}$ etil alkol ile 10 dk karıştırılarak yıkandıktan sonra tekrar 10.000 rpm 'de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk santrifüj işlemi yapıldı.

- Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki etil alkol boşaltıldı.
- Pellet üzerine 100 µl TE solüsyonu ilave edilerek bütün gece (overnight) + 4 °C'de bekletilerek pellet çözdürüldü.
- Çözdürülen pelletler kullanılmadığı zamanlarda – 20 °C'de muhafaza edildi.

Uygulamada kullanılan çözeltilerin hazırlanışı;

1XTNE (30 ml)

0,1 M Tris-HCl (pH:8) (1,5 ml)
1M NaCl (3 ml)
0,5 M EDTA (300 µl)
Distile su ile 30 ml'ye tamamlanır.

0,5 M EDTA (pH:8) (1 lt)

86,1 g EDTANa₂
800 ml distile su ile çözdürülür
NaOH ile pH ayarlanır
Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

0,1 M Tris-HCl (pH:8) (1 lt)

12,1 g Tris
800 ml distile su
HCl kullanılarak pH ayarlanır
Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

1 M EDTA (pH:8) (1 lt)

172,2 g EDTANa₂
800 ml distile su ile çözdürülür
NaOH ile pH ayarlanır
Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

1 M NaCl (1 lt)

58,44 g NaCl
800 ml distile su ile çözdürülür
Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

SDS % 20 (1 lt)

200 g SDS
900 ml distile su ile çözdürülür
pH 7,2'ye ayarlanır
Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır

TE (100 ml)

1 M Tris-HCl (pH:8) (2 ml)
1 M EDTA (pH:8) (200 µl)
Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

DNA ekstraksiyonunda kullanılan kimyasalların işlevleri aşağıdaki gibidir:

TNE (Tris-NaCl-EDTA) : EDTA kanın pıhtılaşmasını önler, Ca ve Mg gibi + yük taşıyan katyonları ortamdan uzaklaştırmak için kullanılır. Sodyum tuzu izotonik ortamda nükleik asitleri stabilize etmekte ve bu işlem sonucu DNA enzimleri ortamda kalmaktadır.

Proteinaz-K : Ortamdan proteinleri uzaklaştırmak için kullanılır.

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) : Proteinleri denatüre eder ve hücre membranlarını çözer.

Fenol Kloroform : Lipidleri ortamdan uzaklaştırır.

İsoamil Alkol : Kloroformu stabilize etmek için kullanılır.

Etil Alkol : DNA'yı çöktürür.

TE (Tris-EDTA) : DNA'nın çözümlenmesini ve uzun süre saklanabilmesini sağlar.

3.2.3. DNA bantlarının gözlemlenmesi

DNA bantları % 0,6'lık agaroz jel kullanılarak gözlemlenmiştir. 0,18 g agaroz tartılıp (Precisa XT 1200C) 30 ml 0,5XTBE tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA) içerisine konur ve mikrodalga fırında (Arçelik MD582) eritilir. Bu karışım içerisine 1 µl ethidium bromide (10 mg/ml) ilave edilir. Hazırlanan karışım, içerisinde tarak bulunan jel tepsisine (Thermo EC 320 Minicell Primo) hava kalmayacak şekilde dökülür, oda sıcaklığında jel polimerize olana kadar beklenir. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılır. Jel tepsi içinde TBE (0,5X) bulunan elektroforez tankına yerleştirilir. 1 µl DNA örneğine 5 µl bromfenol mavisi ve 5 µl distile su ilave edilir. Hazırlanan bu karışım tarakla oluşturulan jelin kuyucuklarına dikkatlice otomatik pipetle (Gilson Pipetman P20) yüklenir. Jele yüklenen numuneler güç kaynağı kullanılarak (Biometra PP4000) 100 V voltajda 30 dk yürütülür. Bu işlem tamamlandıktan sonra jel UV transilluminatör (UVP TFNL-20E veya BIO-RAD Gel Doc 2000) kullanılarak gözlemlenir ve DNA bantları görüntülenir.

3.2.4. Absorbans tayini

Ekstraksiyonu yapılan ve agaroz jelde görüntülenen DNA örneklerinin saflık derecelerini hesaplamak için örneklerin 260 nm ve 280 nm dalga boylarında optik dansiteleri (OD) spektrofotometre (Schimadzu UV2100) kullanılarak hesaplandı. DNA pelletini çözündürmek için kullanılan TE solüsyonu blank olarak kullanıldı. 50 µl DNA örneği TE solüsyonu ile 1 ml'ye tamamlandı ve sırayla 260 nm (OD_{260}) ve 280 nm

(OD₂₈₀)'de ölçümleri yapıldı. Sonuçlar DNA örneğinin konsantrasyonu µg/ml olacak şekilde şöyle hesaplandı:

DNA miktarı (µg/ml) = OD₂₆₀ X d.f (dilution factor, seyreltme faktörü) X 50

DNA miktarı (µg/ml) = OD₂₈₀ X d.f (dilution factor, seyreltme faktörü) X 50

Daha sonra OD₂₆₀/ OD₂₈₀ hesaplandı. Miller ve ark (1988)'a göre eğer sonuç 1.8-2.0 arasında bulunuyorsa, kullanılacak DNA örneklerinin miktarlarının yeterli olduğu kanısına varıldı. Eğer sonuç 1.8-2.0 değerinden düşükse protein vs. kalıntılarının mevcut olduğu anlaşılacak bu örneklerin ekstraksiyon işlemi tekrarlandı.

3.2.5. PCR safhası

Çalışmada PCR karışımı her bir örnek için son hacim 15 µl olacak şekilde (tablo 3.3) 0,5 ml'lik steril ependorf tüplerine hazırlanmıştır. Her PCR reaksiyonunda 2 adet negatif kontrol (DNA örneği ilave edilmemiş bir tüp) ve 2 adet pozitif kontrol (daha önce yarı otomatik sekans cihazında aynı gen bölgeleri yönünden çalışılmış, allel uzunlukları bilinen DNA örnekleri) kullanılarak hem kontaminasyon olup olmadığı, hem de yükseltgenmenin doğruluğu kontrol edilmiştir. PCR reaksiyonu için optik dansiteleri önceden hesaplanan TE içinde çözdürülen DNA solüsyonlarından her örnek için 2,5 µl kullanılmıştır.

Araştırmada genomik DNA'da 3 mikrosatellit (OarFCB20, OarJMP29 ve OarJMP58) bölgesi PCR işlemi ile çoğaltıldı (amplifiye edildi).

Tablo 3.3. OarFCB20, OarJMP29 ve OarJMP58 lokuslarına ait PCR işleminde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

Lokuslar Kimyasal	OarFCB20	OarJMP29	OarJMP58
10XPCR Buffer	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
MgCl ₂	2,8 µl	0,9 µl	0,9 µl
dNTPs	0,6 µl	0,6 µl	0,3 µl
Primer (F)	1,8 µl	0,2 µl	0,6 µl
Primer (R)	1,8 µl	0,2 µl	0,6 µl
BSA	-	0,4 µl	0,4 µl
DNA	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dATP	0,05 µl	0,05 µl	0,05 µl
Taq	0,06 µl	0,05 µl	0,06 µl
Distile Su	3,89 µl	8,6 µl	8,09 µl
Toplam	15 µl	15 µl	15 µl

Yükseltgenen (çoğaltılan, amplifiye edilen) mikrosatellit bölgelerine ait bilgiler tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan mikrosatellitlere ait bilgiler

Mikrosatellit	Orijin	Kromozom	Primer Sekansı (F)	Primer Sekansı (R)
OarFCB20	Ovine	2	aaatgtgttaagattccatacagtg	ggaaaaccccatatatacctatac
OarJMP29	Ovine	24	gtatacacgtggacaccgctttgtac	gaagtggcaagattcagaggggaag
OarJMP58	Ovine	26	gaagtcattgaggggtcgctaacc	cttcatttcacaggactttctctg

Mikrosatellit bölgelerinin yükseltgenme işlemleri thermal cycler'da (ısı döngü cihazı) (TECHNE Genius FGEN05TD), aşağıda tablo 3.5'de verilen PCR koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.5. Mikrosatellit bölgelerine ait PCR koşulları

Sıcaklık (°C)			Zaman			Döngü Sayısı		
Oar FCB20	Oar JMP29	Oar JMP58	Oar FCB20	Oar JMP29	Oar JMP58	Oar FCB20	Oar JMP29	Oar JMP58
94	94	94	3 dk	3 dk	3 dk	30	30	35
94	94	94	25 sn	30 sn	20 sn			
56	57	61	20 sn	20 sn	20 sn			
72	72	72	35 sn	35 sn	20 sn			
72	72	72	10 dk	10 dk	10 dk			

3.2.6. PCR ürünlerinin varlığının tespiti

PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünlerinin olup olmadığını kontrol etmek amacıyla % 1,5'lük agaroz jel kullanılmıştır. 0,45 gr agaroz tartılıp 30 ml 0,5XTBE tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA) içerisine konur ve mikrodalga fırında eritilir. Bu karışım içerisine 1 µl ethidium bromide (10 mg/ml) ilave edilir. Hazırlanan karışım, içerisinde tarak bulunan jel tepsisine hava kalmayacak şekilde dökülür, oda sıcaklığında jel polimerize olana kadar beklenir. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılır. Jel tepsi içinde TBE (0,5X) bulunan elektroforez tankına yerleştirilir. 1 µl PCR ürününe 5 µl bromfenol mavisi ve 5 µl distile su ilave edilir. Hazırlanan bu karışım tarakla oluşturulan jelin kuyucuklarına dikkatlice otomatik pipetle yüklenir. Jel güç kaynağı kullanılarak 100 V voltajda 30 dk yürütülür. Bu işlem tamamlandıktan sonra jel UV transilluminatör kullanılarak gözlemlenir ve PCR ürünleri görüntülenir.

Amplifikasyonu gerçekleşmeyen örnekler için PCR işlemi tekrarlandı, amplifikasyonu gerçekleşen örnekler ise bir sonraki işleme kadar – 20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.7. Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile PCR ürünlerinin değerlendirilmesi

Amplifikasyon ürünlerinin varlığı % 1,5'lük agaroz jel ile tespit edildikten sonra, poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile PCR ürünleri değerlendirilerek allellerin fenotipleri belirlenmiştir. PAGE işlemi DNA sequencing system (Thermo EC 160) aleti ve 35 X 45 cm cam plakalar kullanılarak dikey (vertikal) olarak gerçekleştirilmiştir. PAGE işleminin basamakları aşağıda ayrı ayrı anlatılmıştır.

3.2.7.1. Cam plakaların temizlenmesi

Cam plakalar deterjan kullanılarak yıkanıp kurutulduktan sonra, cam plakaların birer yüzleri (jel dökülecek kısım) ilk önce distile su ile daha sonra etil alkol ile (% 70'lik) dikkatlice, yüzeyde elektroforez boyunca ilerleyen DNA fragmentlerine engel olacak hiçbirşeyin kalmaması için temizlenmiştir.

Temizleme işleminden sonra camlardan birinin yüzeyi Sigmacote (Sigma SL-2) ile muamele edilmiştir. Bu sayede elektroforez işleminden sonra camların birbirinden kolay ayrılması ve jelin camlardan birinin yüzeyinde bozulmadan kalması sağlanmıştır.

3.2.7.2. Poliakrilamit jelin hazırlanışı

Elektroforez işlemi için % 6'lık denaturing poliakrilamit jel kullanılmıştır. 8 M üre içeren, % 6'lık akrilamit-üre karışımı hazırlandıktan sonra renkli şişede +4 °C'de muhafaza edildi. Jel dökülmeden önce bir behere 60 ml % 6'lık akrilamit-üre karışımı, 600 µl % 10'luk APS (amonyum persülfat) ve 60 µl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine) ilave edilip iyice karışması sağlandı.

% 6'lık Akrilamit-Üre Solüsyonu (1 lt)

Akrilamit: 57 gr
Bisakrilamit: 3 gr
Üre: 480 gr
5 X TBE: 200 ml

Isıtılarak eritilir ve distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

10 X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Solüsyonu (1 lt) (pH:8.3)

Tris: 108 gr
Borik Asit: 55 gr
EDTANa₂: 9,3 gr

Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır (pH NaOH kullanılarak 8,3'e ayarlanır).

3.2.7.3. Poliakrilamit jelin dökülmesi

Cam plakalar arasına jel için boşluk oluşturmak üzere 0,4 mm kalınlığında ve 1 cm eninde olan plastik çubuklar (spacer) yerleştirilmiş ve cam plakaların kenarlarına jelin sızması için plastik kısıkaçlar tutturulmuştur. Jel düzeneği hazırlandıktan sonra yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan 60 ml % 6'lık akrilamit-üre karışımı üzerine 600 µl % 10'luk APS (amonyum persülfat) ve 60 µl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine) ilave edilip iyice karışması sağlandı. Daha sonra bu karışım cam plakalar arasına, hava boşluğu kalmayacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmına

numunelerin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için jel tarağı yerleştirildi ve jelin polimerize olması için 1.5-2 saat kadar bekletildi. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra jel, alt ve üst haznesinde 1 X TBE solüsyonu bulunan DNA sequencing sistemine yerleştirildi.

3.2.7.4. Numunelerin jele yüklenmesi ve yürütme işlemi

15 µl PCR ürünü içeren ependorfların her birine 15 µl yükleme tamponu (Loading dye solüsyonu) eklenerek vortekslenip (Nüve NM110) iyice karışması sağlandı. DNA fragmentlerinin boyutunu doğru bir şekilde hesaplamak için α -³³P-dATP ile işaretli ticari bir standart DNA (USB 70770 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit) (lokusa özgü bütün allelleri içeren standart) kullanılmıştır.

Yükleme tamponu ile karışmaları sağlanan numuneler thermal cycler içinde 94 °C'de 3 dk tutularak denatüre edilmiş ve buz üzerine alınmıştır. Hazırlanan örneklerin her biri bir kuyucuğa gelecek şekilde otomatik pipet kullanılarak jele yüklenmiştir. Her 20 örnekten sonra standart DNA ve yine aynı jele pozitif ve negatif kontrollerde yüklenmiştir.

Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağı kullanılarak jel sistemine 40 W güç uygulanarak numuneler yaklaşık 2⁴⁵ saat yürütülmüştür.

Loading Dye Solüsyonu

Formamid:	10 ml
Xylene Cyanol FF:	10 mg
Bromophenol blue:	10 mg
0,5 M EDTA (pH:8):	200 µl

3.2.8. Otoradyografi ile DNA bantlarının görüntülenmesi ve bant uzunluklarının hesaplanması

Jelin yürütme işlemi tamamlandıktan sonra cam plakalar elektroforez cihazından alınıp düz bir zemine konuldu. Esnek bir yapıda olan cam plaka ayırıcı yardımıyla cam plakalar birbirinden ayrıldı. Cam plakalardan birinin yüzeyinde kalan jel, kromotografi

kağıdı (Whatman 3 MM) üzerine alınmıştır. Kromotografi kağıdı üzerine geçen jelin yüzeyi stretch film yardımıyla kaplanmış ve vakumlu bir jel kurutucu (Thermo Savant SGD2000 Slab Gel Dryer) kullanılarak 80 °C'de 20-25 dk kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra jel karanlık bir odada ışık almayan bir metal kaset (Exposure Cassette, Sigma E-9510) içerisine yerleştirilmiş ve üzerine özel 35 X 45 cm ebadında otoradyografi filmi (Kodak Biomax MR-2, Sigma Z35,041-9) yerleştirilmiştir. Kullanılan radyoaktif maddenin yeni veya eski oluşuna göre jeller kaset içerisinde 2-5 gün süreyle bekletilmiştir. Daha sonra kasetler S.Ü Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı'nda bulunan otomatik film banyosu cihazında (AFP Imaging Mini-Med/90) karanlık odada açılarak banyo edilmiştir.

Banyo işleminden sonra jel üzerinde görünen DNA bantları DNA ladderlar yardımıyla negatoskop üzerinde okunarak her bir mikrosatellit lokusuna ait allelerin fenotipleri (heterozigot veya homozigot) ve uzunlukları, aynı jel üzerinde yürütülen DNA standardı (DNA Sequencing Kit) yardımıyla belirlenmiştir. Bu standartlara göre belirlenen uzunluk değerleri Ek 1'de verilmiştir.

3.3. Veri Analizinde Kullanılacak İstatistiksel Metotlar

Çalışılan mikrosatellit lokuslarına ait allel uzunlukları belirlendikten sonra, bu allel uzunluklarına ait veriler toplanıp bilgisayarda veri matrisi dosyası oluşturularak mikrosatellitlere ait populasyonlar içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik (varyasyon), Hardy-Weinberg dengesine uyum, heterozigotluk düzeyleri, Wright'ın F istatistik değerleri GENETIX 4.0 programı (Belkhir ve ark 1996-2000) kullanılarak analiz edilebilir. Bu program <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm> internet adresinde temin edilebilmektedir. GENETIX programında ayrıca permütasyon testi yapılarak populasyonların F istatistik değerlerinin (F_{IS} , F_{IT} ve F_{ST}) istatistiksel önem seviyelerine de bakılabilmektedir.

F_{IS} , F_{IT} ve F_{ST} beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerlerine göre belirlenebilmektedir (Nei 1987).

F_{IS} , alt populasyonlarda birbirine yakın (akraba) olan bireylerin içinde homolog alleller arasındaki korelasyonları tanımlar. Yani alt populasyonlarda rastgele birleşen iki gametin müşterek atadan gelme ihtimalidir. Alt populasyonlardaki akrabalı yetiştirme katsayısı olarak tanımlanır. Alt populasyonlar içerisinde Hardy-Weinberg dengesinden sapmaların ölçülebilmesi için F_{IS} , alt populasyonlar seviyesinde bireylerin akrabalığına değinmektedir ve $F_{IS} = (H_S - H_O)/H_S$ şeklinde hesaplanır.

F_{IT} , toplam populasyonda birbirine yakın bireyler içerisinde birbirinin yerini tutan allellerdeki korelasyonları tanımlar yani populasyon seviyesinde rastgele birleşen iki gametin müşterek atadan gelme ihtimalini belirler. Populasyonların akrabalı yetiştirme katsayısı olarak tanımlanabilir. F_{IT} ile alt populasyon içerisindeki akrabalığın etkileri ve alt populasyonları olan populasyonların etkileri hesaplanır. F_{IT} toplam populasyon üzerinden Hardy-Weinberg dengesinden sapmaların ölçümüdür ve $F_{IT} = (H_T - H_O)/H_T$ şeklinde hesaplanır.

F_{ST} , alt populasyonlardaki genetik farklılıkların ölçümü için belirlenen bir değerdir. Bir lokus açısından toplumlari karşılaştırmada kullanılır. Alt populasyonlarda rastgele ele alınan iki gametin müşterek atadan gelme ihtimali olup alt populasyonlar arasındaki genetik farklılığın ölçüsüdür. 0 ile 1 arasında değer alır. Belirlenen değer 1'e ne kadar yakınsa alt populasyonlar müşterek atadan oldukça uzaktır demektir ve $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$ şeklinde hesaplanır.

Burada kullanılan H_O , alt populasyonlarda gözlenen heterozigotluk ortalamasını, H_S ; alt populasyonlarda beklenen heterozigotluk ortalamasını ve H_T ; toplam populasyonlardaki heterozigotluk ortalamasını ifade etmektedir (Nei 1987).

Faktöriyel birleştirici analiz (Factorial Correspondence Analysis, FCA) bireyler arasındaki akrabalığı araştırmak için yapılan bir analiz olup, çoklu boyutta bireylerin birbirine yakınlığının görülebilmesi için yapılmaktadır. Analizde çoklu boyutta diagram çizebilmek için, her bir bireyin her bir lokustaki allel sayılarına göre lineer bir biçimde transformasyon yapılmaktadır. Genellikle 3 eksenli çizilen şekil daha çok aydınlatıcı bilgi içermektedir (Byrne ve ark 2001, MacHugh ve ark 1997). GENETIX 4.0 programında bu analiz ile bireylerin 3 boyutlu diagram üzerinde haritası çıkarılır.

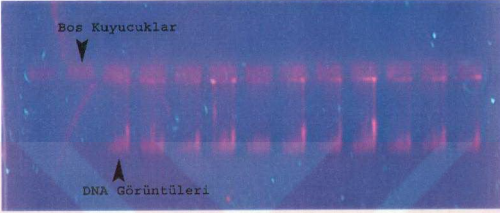
GENETIX programında kullanılan veri düzeni ayrıca GeneClass (Cornuet ve ark 1999) programında da kullanılabilir. GeneClass programı ile Ayrım Testi (Assignment Test), Dar boğaz (Bottleneck) testide (Cornuet ve Luikart 1996) yapılabilir. Dar boğaz testi ile popülasyonun büyüklüğünde yakın geçmişte bir azalmanın olup olmadığı yani bu popülasyonun geçmiş dönemlerde bir darboğazdan geçip geçmediği, yok olma tehlikesi altında kalıp kalmadığı hakkında bilgi edinilebilir.

Populations 1.0 istatistik programında (<http://www.cnrs-gif/pge/bioinfo/populations>) GENEPOP dosya düzeni kullanılır. GENETIX programı düzeninde yazılan veriler GENEPOP programındaki dosya düzenine dönüştürülebilir. Bu programda genetik uzaklığın belirlenmesi için dendrogramlar çizilebilir (Neighbor-Joining Tree, Komşu birleştirme ağacı). Bu programda popülasyonlar arasındaki D_A genetik uzaklığına ve bireyler arasındaki paylaşılan allellerin oranlarına dayalı olarak komşu birleştirme ağaçları (NJT) çizilebilir.

4. BULGULAR

4.1. DNA Ekstraksiyonu Sonuçları

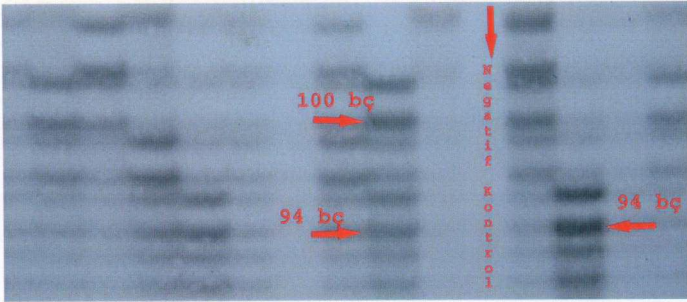
Standart fenol/kloroform metodu ile ekstraksiyonu yapılan ve TE solüsyonu ile çözdürülen DNA solüsyonu, OD₂₆₀ ve OD₂₈₀'de spektrofotometrik ölçümü yapıldıktan sonra, % 0,6'lık agaroz jelde görüntülenerek (Resim 4.1) çalışmada yapılan analizlerde kullanılmıştır.



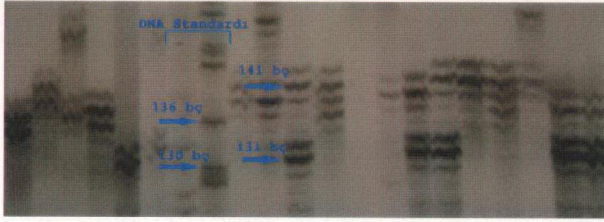
Resim 4.1. DNA'nın % 0,6'lık agaroz jeldeki görünümü

4.2. Populasyon İçi Genetik Varyasyon ve Heterozigotluk Düzeyleri

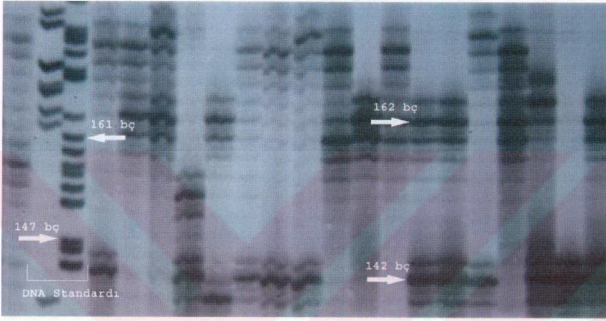
Çalışmada toplam 7 populasyon, 169 birey ve 3 mikrosatellit lokusu kullanılmıştır. Çalışılan 3 mikrosatellit lokusunda toplam 49 adet allel gözlemlenmiştir. Bu allellerin 16 tanesi OarFCB20, 19 tanesi OarJMP29 ve 14 tanesi OarJMP58 lokusunda (Resim 4.2, 4.3 ve 4.4) gözlemlenmiştir.



Resim 4.2. OarFCB20 lokusuna ait allellerin otoradyografik görünümü



Resim 4.3. OarJMP29 lokusuna ait allellerin otoradyografik görünümü



Resim 4.4. OarJMP58 lokusuna ait allellerin otoradyografik görünümü

Populasyonlarda tespit edilen lokus başına düşen ortalama allel sayıları dağılımı ise şöyledir; 7.3 allel/lokus AA, 11.3 allel/lokus Akkaraman , 8.3 allel/lokus Alman Siyah Baş (ASB), 10.3 allel/lokus Hasak, 12.3 allel/lokus Hasmer, 6.6 allel/lokus Karacabey Merinosu, 12 allel/lokus Konya Merinosu populasyonunda gözlemlenmiştir.

Populasyonlarda gözlemlenen allel sayıları, lokus başına düşen allel sayıları ile gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeyleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Bütün gözlemlenen alleller içerisinde 4 tanesi sadece tek bir populasyonda görülmüş olup, o populasyona özgü (private allel)'dür. Bu özgün alleller 1'er adet olarak Akkaraman, Alman Siyah Baş, Hasak ve Hasmer ırklarında gözlemlenmiştir. Çalışılan 3 lokus açısından AA, Karacabey Merinosu ve Konya Merinosu ırklarında herhangi bir populasyona özgü allele rastlanılmamıştır.

Tablo 4.1. Populasyonlarda Görülen Genetik Çeşitlilik

	AA	AKK	ASB	HASAK	HASMER	KCBM	KNYM
Numune Sayısı	13	28	28	28	30	12	30
OarFCB20	8	12	7	10	12	7	13
He	0.862	0.871	0.758	0.874	0.901	0.823	0.876
Ho	0.692	0.821	0.893	1.000	0.897	0.917	0.767
OarJMP29	7	11	10	12	15	7	14
He	0.754	0.870	0.873	0.805	0.890	0.823	0.895
Ho	0.846	0.643	0.786	0.786	0.800	0.667	0.933
OarJMP58	7	11	8	9	10	6	9
He	0.803	0.762	0.834	0.771	0.710	0.725	0.830
Ho	0.846	0.821	0.893	0.786	0.700	0.833	0.800
Ortalama/Lokus	7.3	11.3	8.3	10.3	12.3	6.6	12
Özgün Allel	0	1	1	1	1	0	0
Ortalama He/Lokus	0.806	0.834	0.822	0.817	0.834	0.790	0.867
Ortalama Ho/Lokus	0.795	0.762	0.857	0.857	0.799	0.806	0.833

4.3. F Parametreleri

Populasyonlar için hesaplanan genel F_{IS} değerlerinin -0.051 ile 0.088 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 4.2). Her bir lokus için hesaplanan F_{IS} değerleri Ek 2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. F_{IS} Değerleri Tablosu

Populasyon	F_{IS}
AKKARAMAN	0.088 ns
ASB	-0.044 ns
HASAK	-0.051 ns
HASMER	0.043 ns
MERİNOS	0.040 ns
AA	0.015 ns
KM	-0.021 ns

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil)

Mevcut allellerin Genetix 4.0 programı kullanılarak, her bir populasyon içinde 1000 kere permütasyonu yapılmış ve hesaplanan F_{IS} değerlerinin dağılım grafiği çizilerek; gerçek F_{IS} değerlerinin bu dağılım grafikleri ile karşılaştırılması ile yapılan “önemlilik testi (Significant test)” sonucu populasyon F_{IS} değerlerinin “önemli (significant) olmadığı” görülmüştür.

Populasyonlar arası varyasyonun önemli olup olmadığını görmek için F_{ST} değerleri hesaplanmış (Tablo 4.3) ve yine F_{ST} değerleri içinde “önemlilik testi” yapılmıştır. Bütün lokuslar için hesaplanan F_{ST} değeri 0,053 olup bu değer in istatistiki olarak önemli olduğu ($P < 0,001$) belirlenmiştir.

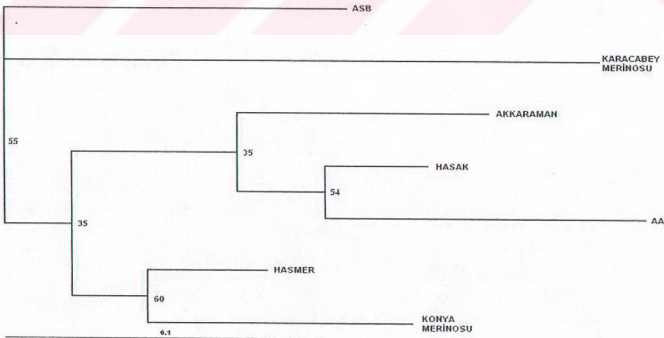
Tablo 4.3. F_{ST} (Alt diagonal) ve D_A (Üst diagonal) Değerleri Tablosu

	AKK	ASB	HSK	HSM	KMER	AA	KCBM
AKK		0.356	0.168	0.221	0.225	0.184	0.339
ASB	0.096***		0.360	0.282	0.362	0.430	0.406
HSK	0.026**	0.105***		0.145	0.207	0.139	0.324
HSM	0.027***	0.083***	0.008ns		0.121	0.236	0.285
KMER	0.043***	0.077***	0.039***	0.024**		0.313	0.305
AA	0.026*	0.116***	0.001ns	0.034**	0.043**		0.412
KCBM	0.039**	0.113***	0.053***	0.033**	0.064***	0.078**	

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil)

4.4. Filogenetik İlişkileri Gösterir Şema Ağaçlar

Yukardaki tabloda görülen (üst diagonal) Nei'nin D_A genetik uzaklığı kullanılarak komşu birleştirme (Neighbor Joining, NJ) metodu ile çizilen ağaca bakıldığında Alman Siyah Baş ve Karacabey Merinosu farklı birer grup, Hasak, AA ve Akkaraman birlikte bir grup ve Hasmer ile Konya Merinosu farklı bir grup oluşturmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Neighbor Joining Metodu İle D_A Ölçütü Kullanılarak Çizilen Ağaç

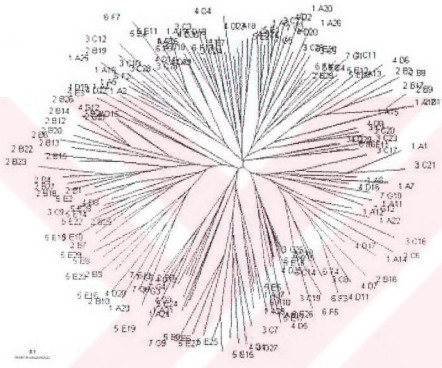
Gruplar incelendiğinde Alman Siyah Baş ve Karacabey Merinosu ağacın aynı tarafında farklı birer grup oluşturmuştur. Bu iki ırk aynı çiftlikte bulunmaktadır. Ayrıca Karacabey Merinosu yurt dışından ülkemize getirilen Merinosların Kıvırcık ırkı koyunlarla melezlemesiyle oluşmuştur. Alman Siyah Baş ve Karacabey Merinosu arasındaki F_{ST} değeri önemli ($P < 0.001$) olup, aralarındaki D_A (0.406) genetik uzaklık değeri de diğer populasyonlara göre oldukça yüksek görünmektedir.

Ağaç incelendiğinde Hasmer ve Konya Merinosu yine bir arada görülmektedir. Aralarındaki D_A genetik uzaklık değeri (0.121) oldukça düşük olduğu görülmektedir. Hasmer ırkı oluşturulurken melezlemede Konya Merinosu, Alman Siyah Baş ve Hampshire Down (HD) ırkları kullanılmıştır. Melezlemede, ağaçtan görüldüğü gibi Merinos ve Alman Siyah Baş etkisinin fazla olduğu görülmektedir.

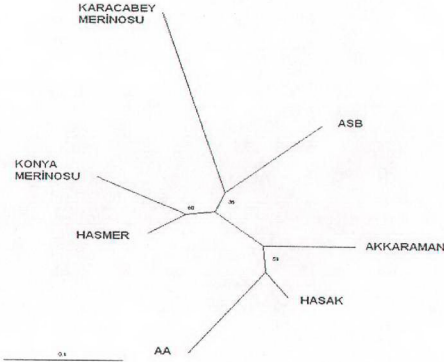
Diğer bir grupta yine melez ırklar olan AA ve Hasak populasyonlarıdır. Zaten bu iki populasyon arasındaki F_{ST} değerinin istatistiki olarak önemsiz ($P > 0.5$) olduğu görülmektedir. Bunlarda da daha çok Akkaraman ve HD ırkı etkisi görülmektedir. Hasak ırkı oluşturulurken yine Akkaraman, Alman Siyah Baş ve Hampshire Down ırkları kullanılmıştır. AA populasyonu ise Akkaraman ve ASB ırklarının F1 melezleridir. AA-Akkaraman ve Hasak-Akkaraman populasyonları arasındaki D_A genetik uzaklık değerleri de sırayla 0.184 ve 0.168 olup, bunlarında genotip olarak birbirlerine oldukça yakın oldukları görülmektedir.

Bireyler arası allel paylaşım uzaklıkları (ASD) ile NJ metodu kullanılarak çizilen ağaçta (Şekil 4.2) aynı populasyonlara ait bireylerin yer yer bir arada olduğu fakat araya başka populasyonlarında karıştığı görülmektedir. Yine populasyonlar arası uzaklığı gösteren ağaçta (Şekil 4.3) yukarıda Şekil 4.1'de gösterilen ağacın verilerini desteklemektedir.

Aşağıda (Şekil 4.3) verilen ağaçta görüldüğü gibi, Şekil 4.1'deki ağacı destekler nitelikte ASB ve KCBM ağacın bir bölgesinde, KMER ve HSM yine birlikte bir grup ve AA, HSK ve AKK ise birlikte bir grup olmak üzere 3 farklı grup oluşmuştur. Hasmer popülasyonu Merinoslara yakın görünürken, Hasak popülasyonları Akkaraman popülasyonlarına yakın bulunmaktadır. Hasmer oluşturulurken Merinos dişiler, Hasak oluşturulurken Akkaraman dişiler kullanılmıştır. Bu Merinos ve Akkaraman etkileri de gayet açık şekilde görülmektedir.



Şekil 4.2. ASD ile Neighbor Joining Metodu Kullanılarak Çizilen Ağaç (A:AKK, B: ASB, C: HSK, D: HSM, E:KMER, F: AA, G:KCBM)



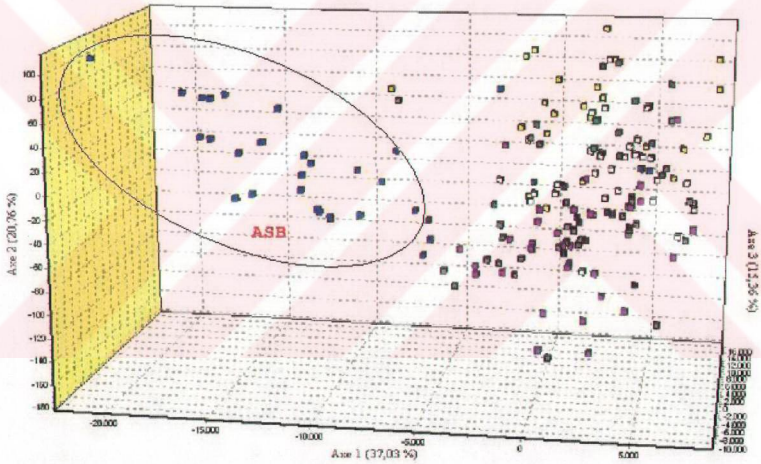
Şekil 4.3. Neighbor Joining Metodu İle Çizilen Ağacın Başka Bir Görünümü

4.5. Faktöriyel Birleştirici Analiz Sonuçları (Factorial Correspondence Analysis; FCA)

Bireylerin genetik çeşitliliğini gösteren FCA grafiğinde Alman Siyah Baş (Mavi renkli) ırkı diğer ırklardan ayrılmış ve en uzakta görülmekte, diğer ırkların ise bir arada kümeleştiği görülmektedir (Şekil 4.4).

4.6. Bireylerin Hangi Populasyona Ait Olduğunu Belirleme Testi (Assignment Test)

Gene Class programı kullanılarak yapılan testte, bireyler kendi populasyonlarından başka, en az 2 farklı populasyona daha dahil edilmektedir. Yani bireyler çalışılan 3 lokus bakımından genotip olarak kendi fenotiplerindeki ırka gruplanmamıştır. (Ek 3)



Şekil 4.4. FCA Grafiği

Mavi:ASB, Sarı:AKK, Gri:HASMER, Pembe:MERİNOS, Yeşil:AA, Beyaz:HASAK,
Koyu Mavi: KARACABEY MERİNOSU

4.7. Sunulan Çalışmadaki Bulguların Kıvırcık ve Dağlıç Populasyonlarıyla Birlikte Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada elde edilen bulgular, yerli koyun ırklarımızda mikrosatellitlerle populasyon genetiği çalışmalarını sürdüren araştırmacılar tarafından temin edilen Kıvırcık (Soysal ve ark 2001) ve Dağlıç (Togan ve ark 2004) populasyonlarında aynı mikrosatellit bölgelerine ait verilerinde kullanılmasıyla tekrar yorumlanmıştır.

4.7.1. Populasyon içi genetik varyasyon ve heterozigotluk düzeyleri

9 populasyon birlikte değerlendirildiğinde 3 mikrosatellit lokusunda toplam 61 adet allel gözlemlenmiş ve bu allellerin 18 tanesi OarFCB20, 27 tanesi OarJMP29 ve 16 tanesi OarJMP58 lokusunda gözlemlenmiştir. Tablo 4.1’de belirtilen lokus başına düşen ortalama allel sayılarına ek olarak Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarında lokus başına ortalama 11,3’er adet allel tespit edilmiştir. Tüm gözlemlenen alleller içerisinde 11 tanesinin populasyona özgün olduğu ve bu allellerin 1’er adet Akkaraman, Hasak, Hasmer populasyonlarında, 6 adet Kıvırcık ve 2 adette Dağlıç populasyonlarında olduğu tespit edilmiştir (Ek 4).

Laboratuvarımızda çalışılan 7 populasyonla birlikte Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarının birlikte değerlendirilmesiyle elde edilen, populasyonlarda gözlemlenen allel sayıları, lokus başına düşen allel sayıları ile gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeyleri tablo 4.4’te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Populasyonlarda Görülen Genetik Çeşitlilik

	<i>AA</i>	<i>AKK</i>	<i>ASB</i>	<i>HSK</i>	<i>HSM</i>	<i>KCBM</i>	<i>KNYM</i>	<i>KIVIRCİK</i>	<i>DAĞLIÇ</i>
Numune Sayısı	13	28	28	28	30	12	30	24	33
OarFCB20	8	12	7	10	12	7	13	11	10
He	0.862	0.871	0.758	0.874	0.901	0.823	0.876	0.902	0.811
Ho	0.692	0.821	0.893	1.000	0.897	0.917	0.767	0.875	0.849
OarJMP29	7	11	10	12	15	7	14	14	14
He	0.754	0.870	0.873	0.805	0.890	0.823	0.895	0.840	0.877
Ho	0.846	0.643	0.786	0.786	0.800	0.667	0.933	0.792	0.818
OarJMP58	7	11	8	9	10	6	9	9	10
He	0.803	0.762	0.834	0.771	0.710	0.725	0.830	0.738	0.796
Ho	0.846	0.821	0.893	0.786	0.700	0.833	0.800	0.455	0.724
Ortalama/Lokus	7.3	11.3	8.3	10.3	12.3	6.6	12	11.3	11.3
Özgün Allel	0	1	0	1	1	0	0	6	2
Ortalama He/Lokus	0.806	0.834	0.822	0.817	0.834	0.790	0.867	0.827	0.828
Ortalama Ho/Lokus	0.795	0.762	0.857	0.857	0.799	0.806	0.833	0.707	0.797

NOT: İtalik karakterde yazılan veriler Tablo 4.1’de sunulmuştur.

4.7.2. F parametreleri

Populasyonlar için ayrı ayrı hesaplanan genel F_{IS} değerlerinin -0.051 ile 0.148 arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 4.5). Bütün populasyonlar için hesaplanan F_{IS} değeri 0.030 olup bu değer istatistiksel olarak önemli olmadığı ($P > 0.5$) fakat Kıvırcık populasyonu için hesaplanan F_{IS} değerinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.01$) belirlenmiştir.

Tablo 4.5. F_{IS} Değerleri Tablosu

Population	F_{IS}
AKKARAMAN	0.088ns
ASB	-0.044ns
HASAK	-0.051ns
HASMER	0.043ns
KMER	0.040ns
AA	0.015ns
KCBM	-0.021ns
KIVIRCIK	0.148**
DAGLIC	0.038ns
GENEL	0.030ns

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns:istatistiksel olarak anlamlı değil)

Bütün lokuslar için hesaplanan F_{ST} değeri 0.071 olup bu değer istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0.001$) belirlenmiştir. Bütün populasyonlar için hesaplanan F_{ST} değerleri tablo 4.6'da gösterilmiştir. Bütün populasyonların birbirinden farklı olduğu fakat Hasak-Hasmer ve Hasak – AA populasyonları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmektedir.

Tablo 4.6. F_{ST} (Alt diagonal) ve D_A (Üst diagonal) Değerleri Tablosu

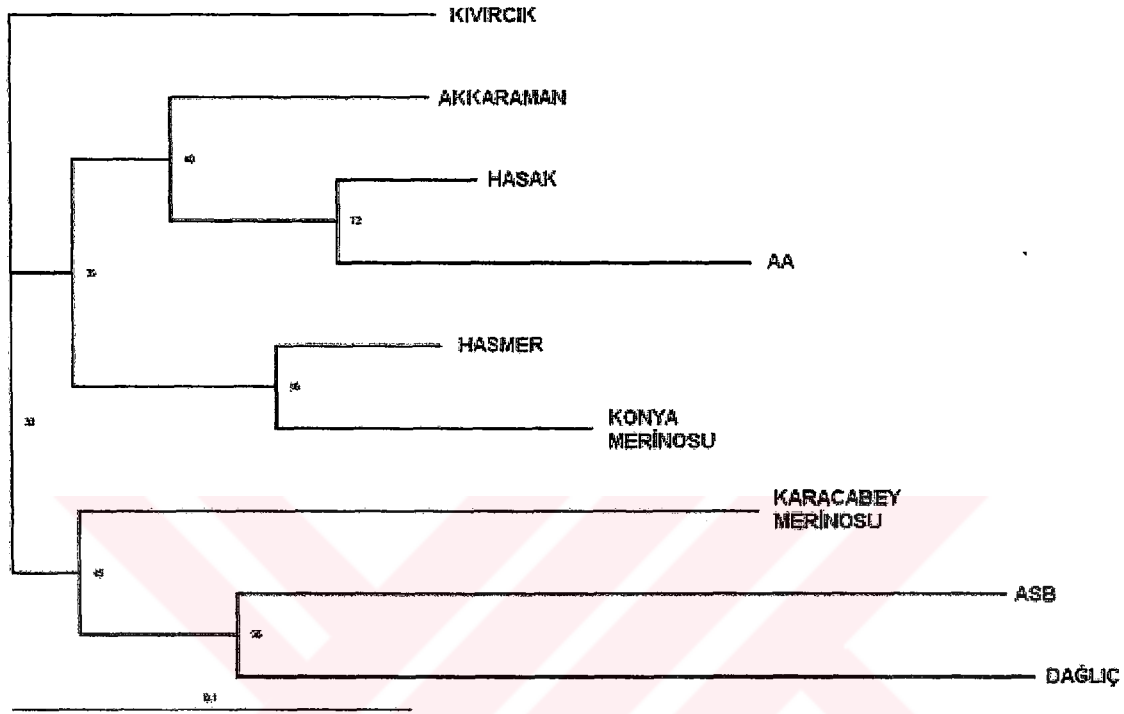
	AKK	ASB	HSK	HSM	KMER	AA	KCBM	KIV	DAG
AKK		0.356	0.168	0.221	0.225	0.184	0.339	0.278	0.354
ASB	0.096***		0.360	0.282	0.362	0.430	0.406	0.516	0.416
HSK	0.026**	0.105***		0.145	0.207	0.139	0.324	0.340	0.395
HSM	0.027**	0.083***	0.008ns		0.121	0.236	0.285	0.349	0.438
KMER	0.043***	0.077***	0.039***	0.024**		0.313	0.305	0.355	0.489
AA	0.026*	0.116***	0.001ns	0.034**	0.043**		0.412	0.439	0.410
KCBM	0.039**	0.113***	0.053***	0.033**	0.064***	0.078***		0.386	0.432
KIV	0.107***	0.144***	0.120***	0.124***	0.095***	0.116***	0.153***		0.477
DAG	0.016*	0.104***	0.063***	0.063***	0.075***	0.070***	0.080***	0.115***	

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns:istatistiksel olarak anlamlı değil)

Populasyonların D_A değerlerine bakıldığında en büyük genetik uzaklığın Alman Siyah Baş – Kıvırcık populasyonları arasında, en düşük genetik uzaklığın ise Hasmer – Konya Merinosu populasyonları arasında olduğu görülmektedir.

4.7.3. Filogenetik ilişkileri gösterir şema ağaçlar

Nei'nin D_A genetik uzaklığı kullanılarak komşu birleştirme metodu (NJT) ile çizilen ağaçta 3 ana grup oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Neighbor Joining Metodu İle D_A Ölçütü Kullanılarak Çizilen Ağaç

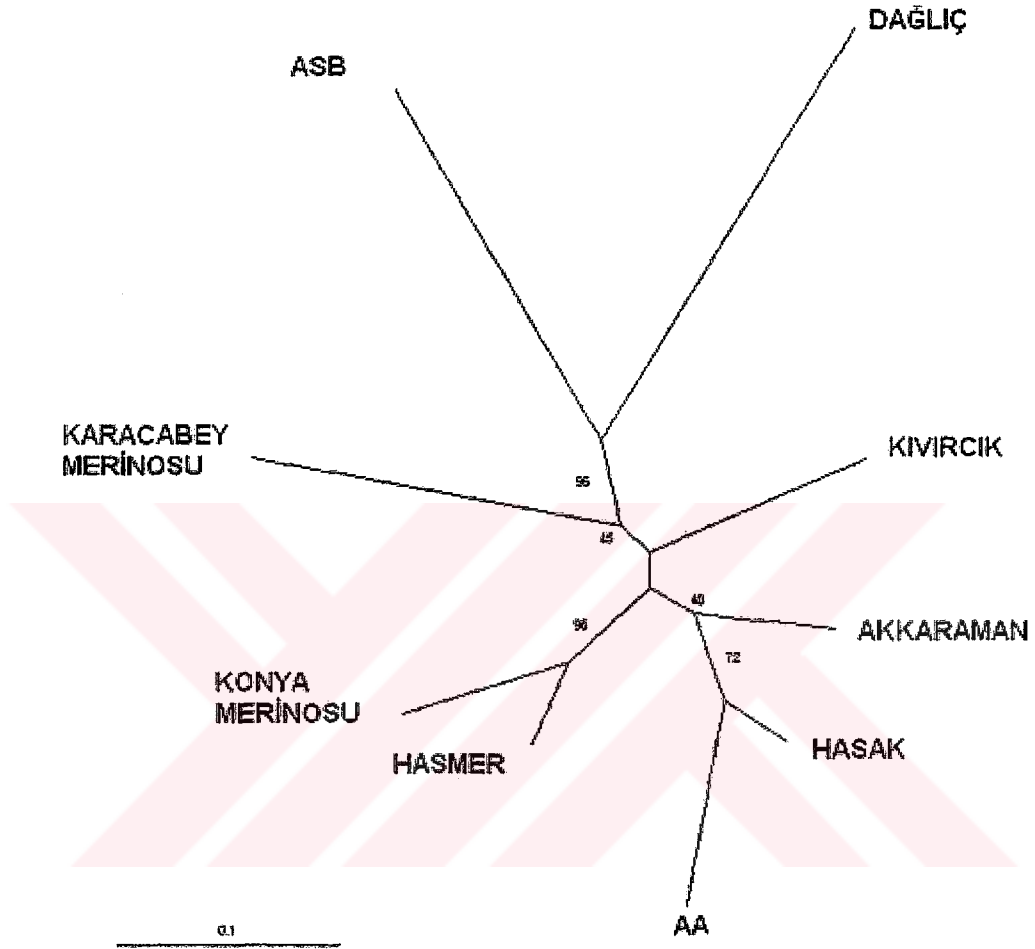
Bu gruplardan birisi, tek başına Kıvırcık popülasyonudur ve diğer popülasyonlardan ayrı olarak gruplaşmıştır.

İkinci grupta Akkaraman, Hasak ve AA popülasyonları bir grup ve Hasmer ile Konya Merinosu popülasyonları da başka bir grup oluşturmuştur. Bunlardan Hasak ve AA birlikte gruplanmış olup F_{ST} değerleride istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Üçüncü grup ise Karacabey Merinosu, ASB ve Dağlıç popülasyonlarından meydana gelmektedir. Fakat tablo 4.6'da görüldüğü gibi bu grubu oluşturan popülasyonların birbirine uzaklığı fazladır. Hasmer-Konya Merinosu veya Hasak-AA popülasyonlarındaki genetik yakınlık bu grupta yoktur.

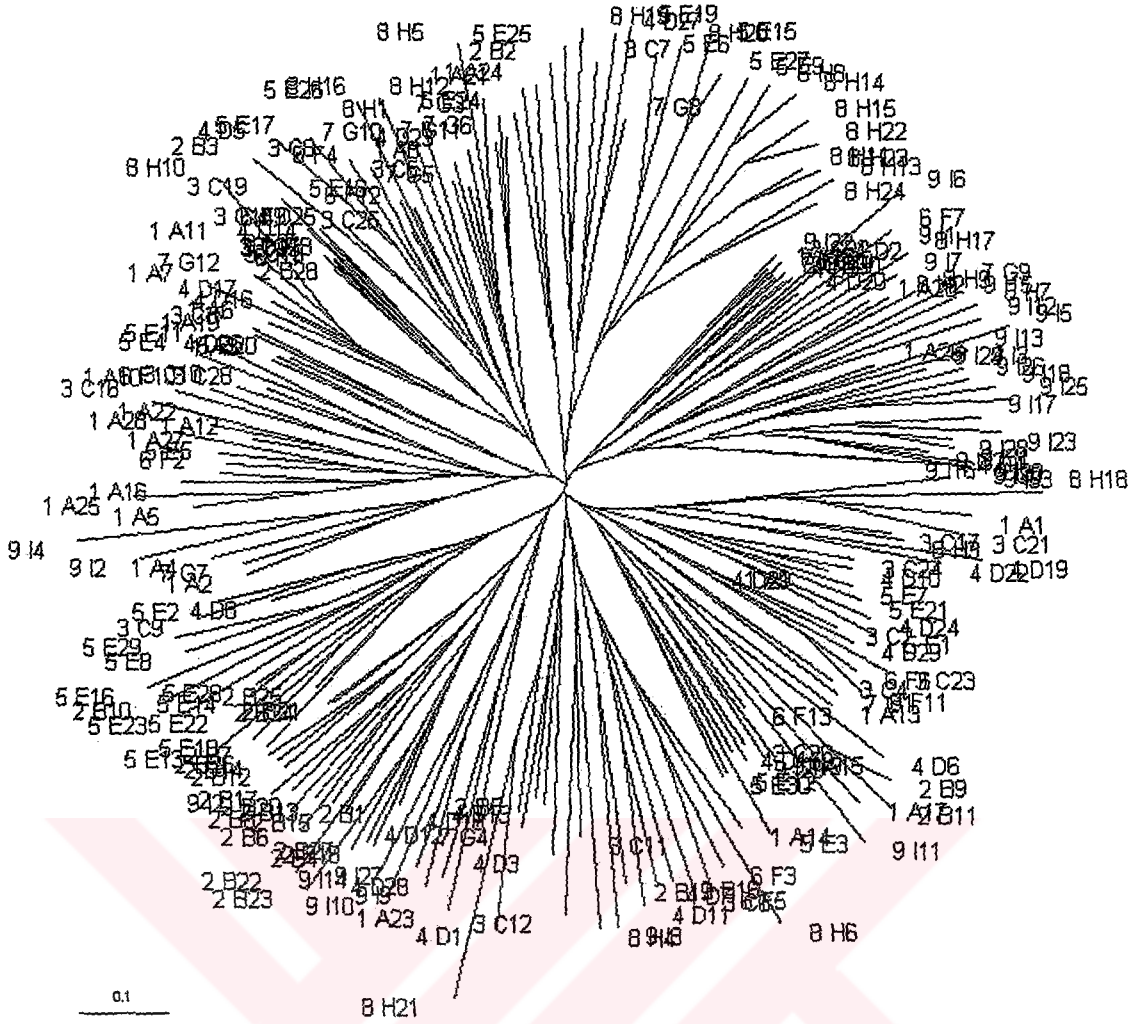
Popülasyonlar arası uzaklığı gösteren ağacın başka bir görünümü de şekil 4.6'da verilmiştir. Bu ağaçta da gruplanma aynı şekilde olmuştur. Kıvırcık popülasyonu tek başına,

Akkaraman, Hasak, AA ile Konya Merinosu ve Hasmer birlikte büyük bir grup ve son olarakta Karacabey Merinosu, Alman Siyah Baş ve Dağlıç ayrı bir grup olarak ağacı şekillendirmiştir.



Şekil 4.6. Neighbor Joining Metodu İle Çizilen Ağacın Başka Bir Görünümü

Bireyler arası allel paylaşım uzaklıkları (ASD) ile çizilen ağaçta (Şekil 4.7) ise yine Şekil 4.2’de belirtildiği gibi aynı populasyonlara ait bireylerin yer yer bir arada olduğu fakat araya başka populasyonlarında karıştığı görülmektedir.



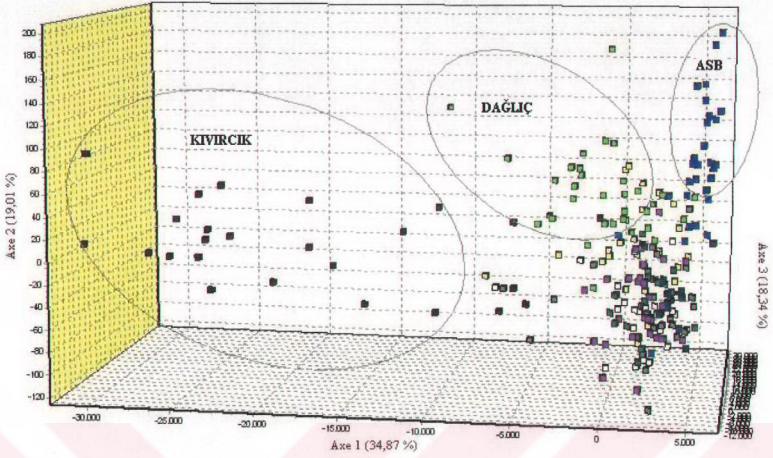
Şekil 4.7. ASD ile Neighbor Joining Metodu Kullanılarak Çizilen Ağaç (A:AKK, B: ASB, C: HSK, D: HSM, E:KMER, F: AA, G:KCBM, H: KIV, I: DAG)

4.7.4. Faktöriyel birleştirici analiz sonuçları (Factorial Correspondence Analysis; FCA)

FCA grafiğinde ASB ve Kıvrıkcık ırkları diğer popülasyonlardan ayrılarak kendi gruplarını oluşturmuşlar ve yine Dağlıç ırkında diğer popülasyonlara yakın olmakla beraber bireyleri birlikte gruplanmıştır. Diğer popülasyonların ise birlikte ve karışık gruplandığı görülmektedir (Şekil 4.8).

4.7.5. Bireylerin hangi popülasyona ait olduğunu belirleme testi (Assignment Test)

Gene Class programı kullanılarak yapılan testte, bireyler kendi popülasyonlarından başka, en az 2 farklı popülasyona daha dahil edilmektedir. Yani bireyler çalışılan 3 lokus bakımından genotip olarak kendi fenotiplerindeki ırkta gruplanmamıştır (Ek 3).



Şekil 4.8. FCA Grafiği

Yeşil: DAG, Kahverengi: KIV, Sarı: AKK, Beyaz: HSK, Pembe: AA, Gri: KM, Mavi: ASB,
 Koyu Yeşil: KMER , Koyu Mavi: HSM

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çok yönlü verim özelliklerine sahip ve bu özelliğiyle bütün ülkelerde ekonomi içerisinde önemli bir yeri olan koyun, aynı zamanda değerli bir gen kaynağıdır. Bruford ve ark (2003)'nın da vurguladıkları gibi, koyunun evciltme merkezine en yakın yerel ırklardan olan Türkiye'deki yerli koyun ırkları ve melezlerinin gen kaynağı olarak önemleri büyüktür. Dünyada koyunla ilgili DNA markerlarıyla yapılan genetik çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Ancak ülkemizde konu ile ilgili çalışmaların yetersizliği sunulan çalışmanın önemini artırmaktadır.

Çalışmada 3 adet mikrosatellit marker kullanılarak, ülkemizde melezleme çalışmalarıyla elde edilen Hasmer ve Hasak koyun genotipleriyle, bunların oluşumunda kullanılan yerli ve yabancı koyun ırkları arasındaki benzerlik ve farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ayrıca çalışmanın bir diğer amacı da, yerli ırklarımızda çalışan diğer araştırmacılar (Togan ve ark 2004, Soysal ve ark 2001) sağlanan verilerin de karşılaştırmalı olarak kullanılmasıyla ülkemizdeki yerli ve melez koyun ırklarında genetik çeşitlilik (heterozigotluk) düzeylerinin, populasyonlar arası ve populasyon içi genetik farklılıkların ve çalışmada adı geçen fenotipik olarak bir ırka ait olan bireylerin, genotipik olarak hangi düzeyde o ırka ait olduklarının belirlenmesidir. Diğer araştırmacılar (Togan ve ark 2004, Soysal ve ark 2001) elde edilen verilerin kullanılmasının bir nedeni de, sunulan çalışmadaki populasyonların melezleme çalışmaları nedeni ile akraba olmalarına karşın söz konusu araştırmacıların kullandıkları Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarının, bu çalışmanın materyalini oluşturan populasyonlarla bir akrabalık ilişkisi bulunmaması ve bu populasyonların katılımı ile yapılan karşılaştırmalı analizlerin akrabalar arasındaki ilişkilerin düzeylerinin daha iyi gözlemlenebileceğinin düşünülmesidir.

DNA ekstraksiyonu için materyal olarak kan kullanılmıştır. Kandan DNA ekstraksiyonu standart fenol/kloroform yöntemi ile yapılmıştır. İdeal olan DNA saflığı için

OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının 1.8-2.0 arasında olması önerilmekte ve bu oranın düşük olması ortamda protein varlığının işareti olarak değerlendirilmektedir (Miller ve ark 1988). Bu çalışmada da kullanılan DNA örneklerinin OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının 1.8-2.0 arasında olmasına özen gösterilmiş ve oranların verilen sınırdan düşük olması hallerinde örnekler tekrar ekstrakte edilmişlerdir.

Elde edilen DNA'larla yapılan PCR işleminden sonra ortaya çıkan ürünler, denatüre dikey jel elektroforezi kullanılarak elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. PCR aşamasında dNTP'lerden birisi (dATP) radyoaktif işaretli olarak kullanıldığından elektroforez işleminden sonra jel, otoradyografi işlemine tabi tutularak görüntüler özel röntgen filmleri üzerine alınmış ve bu sayede alleller arasındaki bir bazlık değişimler bile hesaplanabilmiştir. Cerit ve ark (2001) görüntüleme işlemi için gümüş boyama tekniğinin de düşük maliyetli ve çok kullanılan tekniklerden birisi olduğunu, ancak bu yöntemde jel üzerinde bantlar dışındaki bölgelerinde boyanmasının söz konusu olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer sonuçlarla karşılaşılmış, otoradyografik görüntülerde ilgili bölgenin dışındaki bölgelerde de bant görüntüsü (non-spesifik bantlar) alındığından bantların koyuluğu, bulunduğu bölge, pozitif kontrollerle deneme, aynı bireylerden örneklerin bazen 2-3 kez jel üzerinde yürütülmesi ile sonuçların doğruluğu sağlanmıştır.

Mikrosatellit markerları çiftlik hayvanlarında pedigrî analizleri ve populasyon genetiği çalışmalarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Luikart ve ark 1999). Yapılan çalışmada 1 melez, 1 yabancı, 2 adet melezleme çalışmalarıyla elde edilen yeni genotipler, 3 adet yerli olmak üzere 7 adet koyun populasyonu kullanılmıştır. Ayrıca yerli koyun ırklarında çalışan diğer araştırmacılar (Togan ve ark 2004, Soysal ve ark 2001) temin edilen Kıvrıcık ve Dağlıç populasyonlarına ait mikrosatellit verileri de kullanılarak toplam 9 populasyon birlikte değerlendirilmiştir.

5.1. Genetik Çeşitlilik ve Hardy-Weinberg Dengesi

Sunulan çalışmada 3 mikrosatellit lokusu (OarFCB20, OarJMP29 ve OarJMP58) yönünden populasyon içi ve populasyonlar arası genetik varyasyonun (çeşitliliğin) yine evcil hayvanlarda mikrosatellitlerle yapılan ve aşağıda özetlenen bazı çalışmalardan yüksek olduğu gözlenmiştir.

Gutiérrez- Espeleta ve ark (2000) koyunlarda 9 mikrosatellit lokusu kullanarak yaptıkları bir çalışmada genetik çeşitliliği 0.184 ile 0.732 değerleri arasında bulduklarını bildirmişlerdir. Baltık koyun ırklarında 7 populasyon ve 15 mikrosatellit lokusu kullanılarak yapılan başka bir çalışmada (Grigaliunaite ve ark 2003) beklenen heterozigotluk (H_e , expected heterozygosity) değerlerinin 0.574 – 0.760 arasında gözlemlendiği, Diez – Tascon ve ark (2000) ise Merinos ırkı koyunlarda bu değerleri 0.679 – 0.763 arasında bulduklarını bildirmektedirler. 1998 yılında İspanyol yerli koyun ırklarında mikrosatellitlerle genetik ilişkinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise (Arranz ve ark 1998) ortalama gözlenen heterozigotluk (H_o , gözlenen heterozygosity) değerlerinin 0.713 – 0.771 arasında bulunduğu bildirilmektedir.

Diğer bazı evcil hayvanlarda da mikrosatellitlerle yapılan çalışmalara bakıldığında; Hanslik ve ark (2000) Eski ve Yeni Dünya Holstein sığırlarında heterozigotluğun 0.43 – 0.53, Schmid ve ark (1999) İsviçre sığırlarında 0.60 – 0.69 arasında olduğunu, keza sığırlarda Moazami-Goudarzi ve ark (1997) 0.53 – 0.66, Kantanen ve ark (2000) 0.45 – 0.69, Machugh ve ark (1997) 0.432 – 0.658, Loftus ve ark (1999) ise 0.54 – 0.79 arasında değerlerin bulunduğunu bildirmişlerdir.

İsviçre keçilerinde (Saitbekova ve ark 1999) ortalama heterozigotluğun 0.51 – 0.58 arasında olduğu bildirilirken, Çin yerli keçi ırklarında (Li ve ark 2002) H_e değeri 0.611- 0.784 arasında bulunmuştur.

Yapılan bazı çalışmalarda belirlenen toplam allel sayıları incelendiğinde, Schmid ve ark (1999) 5 İsviçre sığır ırkında 30 mikrosatellit ile yaptıkları çalışmada toplam 255 adet allel, Farid ve ark (2000) 10 koyun popülasyonunda 10 mikrosatellit lokusu kullandıkları çalışmada toplam 93 adet allel, Soysal ve ark (2001) 3 mikrosatellit lokusuyla 5 koyun popülasyonunda yaptıkları çalışmada ise toplam 45 adet allel tespit ettiklerini bildirmektedirler.

Sunulan çalışmada, kullanılan popülasyonlarda görülen genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu ve ortalama H_e değerlerinin 0.790 – 0.867 ve H_o değerlerinin de 0.762 – 0.857 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Toplam 49 adet allel tespit edilmiş, bu allellerden 16 tanesi OarFCB20 lokusunda, 19 tanesi OarJMP29 ve 14 tanesi de OarJMP58 lokusunda belirlenmiştir. Bulunan 49 adet allelden 4 tanesinin özgün allel olduğu gözlemlenmiştir. Aynı popülasyonlara Togan ve ark (2004)'nın Dağlıç ve Soysal ve ark (2001)'nin Kıvırcık popülasyonlarının verileri de ilave edildiği zaman, H_e değerlerinin yine aynı şekilde 0.790 – 0.867 olduğu ve H_o değerlerinin ise benzer olarak 0.707 – 0.857 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Yine bu popülasyonların ilavesiyle gözlemlenen toplam allel sayısının 61 adete yükseldiği ve bu allellerden 18 tanesi OarFCB20 lokusunda, 27 tanesi OarJMP29 ve 16 tanesi de OarJMP58 lokusunda gözlemlenmiş olup, 11 tanesinin özgün allel olduğu tespit edilmiştir.

Yukarıda belirtilen sonuçlara bakıldığında genetik çeşitliliğin koyunlarda mikrosatellitlerle yapılan çalışmalarda bildirilen değerlerden yüksek olduğu görülmektedir. Bu yüksekliğin sebebi, çalışılan lokusların yüksek heterozigotluklarından veya Türkiye'nin coğrafi açıdan koyunun evcilleştirme kaynaklarına yakın oluşundan ya da yeterli düzeyde seleksiyon çalışması yapılamamasından kaynaklanmış olabilir.

Soysal ve ark (2001)'nin Türkiye'deki yerli ve melez koyun ırklarının kullanıldığı mikrosatellitlerle yapılan çalışmalarında popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik

çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu, OarFCB20 lokusu yönünden Akkaramanlarda 9, Konya Merinoslarında 7 allel saptanırken, ortalama beklenen heterozigotluk (He) değerini 0.75-0.77 arasında bulunduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada aynı ırklara ait allel sayıları 12 - 13 ve He değerleri 0.871 – 0.876 olarak bulunmuştur.

Değerlerin Soysal ve ark (2001)'in değerlerinden yüksek olmasının çalışmada kullanılan Akkaraman popülasyonlarına ait örneklerin 3 farklı bölgeden toplanmış olmasından, Konya Merinoslarının aynı çiftlikten alınmış olmasına karşın 3 yıl sonra örneklenmesi ve bu süre içinde popülasyona yeni bireylerin girmiş olma ihtimalinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak hem Soysal ve ark (2001)'nin çalışmalarında hem de bu çalışmada Konya Merinosu popülasyonuna ait herhangi bir özgün allele rastlanılmaması yapılan çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Tablo 5.1. Bazı evcil hayvan popülasyonlarında mikrosatellitler ile yapılan çalışmaların karşılaştırılması

Tür İsmi	Lokus	He	Ortalama Allel Sayısı	Kaynak
Koyun	10 Adet	0.184 - 0.732	2.4 – 4.4	Gutiérrez- Espeleta ve ark (2000)
Koyun	15 Adet	0.574 – 0.760	4.4 – 10.9	Grigaliunaite ve ark (2003)
Koyun	20 Adet	0.679 – 0.763	-	Diez-Tascon ve ark (2000)
Sığır	39 Adet	0.43 – 0.53	-	Hanslik ve ark (2000)
Sığır	30 Adet	0.60 0.69	-	Schmid ve ark (1999)
Sığır	17 Adet	0.53 – 0.66	6 – 7.7	Moazami-Goudarzi ve ark (1997)
Keçi	20 Adet	0.51 – 0.58	-	Saitbekova ve ark (1999)
Keçi	17 Adet	0.611 – 0.784	5.24 – 7.77	Li ve ark (2002)
Koyun	3 Adet	0.790 – 0.867	6.6 – 12.3	Sunulan Çalışma

He: Beklenen Heterozigotluk

Popülasyon ve örnek sayısı, lokuslarda beklenen heterozigotluk ve ortalama allel sayıları için önemli bir etkidir. Stahlberger-Saitbekova ve ark (2001) İsviçre koyun ırklarında OarFCB20 ve OarJMP29 mikrosatellitleriyle genetik ilişkiyi araştırmış, bu lokuslara ait allel sayılarını ve ortalama He değerlerini sırasıyla, OarFCB20 lokusunda 15 ve 0.71, OarJMP29 lokusunda ise 20 ve 0.78 olarak bulmuşlardır. Sunulan çalışmada değerler, OarFCB20 lokusunda 18 ve 0.853, OarJMP29 lokusunda ise 27 ve 0.847 olarak

bulunmuştur, ortalama He değerleri arasında küçük farklılıklar olmasına rağmen, bu çalışmada lokuslarda görülen allel sayılarının daha yüksek olduğu gözlenmiş, bu farklılığın çalışılan populasyonların farklılığından ya da populasyonların ilk evcilleştirilmedeki ata populasyonlara yakın olmalarından, belki de Avrupa'daki koyunlar kadar kesin ve sıkı bir seleksiyon baskısında olmamalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Diez-Tascon ve ark (2000) 6 farklı Merinos ırkı koyunda OarFCB20'nde yer aldığı 20 adet mikrosatellit lokusu üzerinde çalışmışlar ve OarFCB20 lokusunda 13 allel saptarken, heterozigotluk oranının 0.679 ile 0.763 arasında değiştiğini gözlemişler ve Merinos populasyonları arasındaki genetik çeşitliliğin birbirlerinden fazla farklı olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada aynı lokus açısından Karacabey Merinosunda 7, Konya Merinosunda 13 adet allel belirlenirken, He değerleri Karacabey Merinosu'nda 0.823, Konya Merinosu'nda 0.876 olarak gözlenmiş ve heterozigotluk düzeylerinin Diez-Tascon ve ark (2000)'nın bildirdiği düzeylerden yüksek olduğu görülmüş, bu olgunun populasyonların farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Allel sayıları bakımından Konya Merinosu araştırmacıların sonuçları ile uyum gösterirken, Karacabey Merinosunun allel sayıları düşük bulunmuştur. Bu farklılığın nedenlerinden birisi Karacabey Merinosu için kullanılan örnek sayısının azlığı (n=12) olabilir. Ayrıca Karacabey Merinosu'nda ortalama Ho değerinin He değerinden yüksek olması, ya ebeveyn olarak oldukça farklı koşullarda yetiştirilmiş bireylerin bir jenerasyon önce melezlendiğini ve bu F1 veya F2 melezlerinde çalışıldığını ya da sürüye kısa bir süre önce yeni bireylerin katılmış olabileceğini akla getirmektedir.

Arranz ve ark (1998) İspanyol koyunlarında yaptıkları bir çalışmada lokus başına düşen ortalama allel sayısı (9.9) ve ortalama heterozigotluk (0.771) bakımından en yüksek genetik çeşitliliğin Merinos ırkı koyunlarda görüldüğünü bildirmektedirler. Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında (Arranz ve ark 2001a) yine Merinos ırkının her

lokusta gözlenen allel sayısı bakımından en yüksek değere sahip olduklarını (MAF70 lokusunda 16 allel) belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada da Konya Merinosu'nda ortalama He değerinin 0,867 bulunması ve OarJMP29 lokusunda 14 allel gözlenmesi Merinoslardaki genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu desteklemektedir. Karacabey Merinosu'nda ise OarFCB20 ve OarJMP29 lokuslarında 7'şer adet allele rastlanırken ortalama He değeri 0.790 olarak gözlemlenmiş ve örnek sayısı az olmasına rağmen genetik çeşitliliğin yüksek olduğu görülmektedir.

Farid ve ark (2000) 10 koyun ırkında 10 mikrosatellit ile yaptıkları çalışmada hem lokus başına düşen ortalama allel sayısını (4.3 – 6) hem de He değerlerini (0.53 – 0.67) daha düşük oranda bulduklarını ve fenotipik karakterlere göre yapılan seleksiyonun genetik çeşitliliğin azalmasına neden olduğunu bildirmektedirler. Yine Boyce ve ark (1997)'nin 14 koyun popülasyonunda mikrosatellitlerle yaptıkları çalışmada, lokus başına düşen ortalama allel sayısının 2.3 – 5 arasında olduğunu, He değerlerinin ise 0.359 – 0.766 arasında değiştiği bildirilmektedir.

Sunulan çalışmada ise lokus başına düşen ortalama allel sayısı 6.6 – 12.3 arasında, ortalama He ise 0.790 – 0.867 değerleri arasında gözlemlenmiştir. En düşük allel sayısı Karacabey Merinosu'nda (6.6) görülürken en yüksek allel sayısı Hasmer (12.3) popülasyonunda görülmüştür.

Luikart ve ark (1999)'nin ebeveyn tayini için keçilerde kullandıkları mikrosatellitlerden biriside yine koyun mikrosatellitlerinden olan OarFCB20'dir. Bu lokus açısından He değerlerinin 0.497 – 0.513 arasında olduğu allel sayısının da 4 – 7 arasında değiştiği bildirilmektedir. Sunulan çalışmada ise aynı lokus açısından He değerlerinin 0.758 – 0.902 arasında olduğu ve allel sayılarının da 7 -13 arasında değiştiği ve keçilerden yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Alman Siyah Baş, Hasak ve Karacabey Merinosu ırklarında ortalama H_o değerlerinin H_e değerlerinden yüksek olduğu gözlemlenmekte ve bu nedenle bu populasyonlarda heterozigot bireylerin seçilmiş olabileceği düşünülmektedir. AA populasyonunda örnek sayısı az olmasına rağmen genetik çeşitliliğin yüksek olduğu ($H_e= 0.806$ ve $H_o= 0.795$) gözlemlenmiştir. Sunulan çalışmanın sonuçlarına bakıldığında Alman Siyah Baş ve Hasak populasyonlarında da H_o değerlerinin H_e değerlerinden yüksek olduğu (hem OarFCB20 lokusunda, hem de bütün lokuslar için ortalama değer olarak) görülmektedir. Alman Siyah Baş populasyonunun artık Türkiye’de fazla yetiştiriciliği yapılmamakta, sadece MHAE’de küçük bir populasyon olarak bulunmaktadır. Bu yüzden bireylerde akrabalık oranı yüksektir. Hasak populasyonu ise sadece KMHAE’de yetiştirilmektedir ve sonuçlara bakıldığında akrabalı yetiştirme etkileri göze çarpmaktadır.

İrklara özgün alleller (private allel) birçok çalışmada belirtilmiştir. Gutiérrez- Espeleta ve ark (2000) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada 13 adet koyun populasyonunda 7 adet özgün allel tespit ettiklerini bildirmektedirler. Locus başına düşen ortalama allel sayısı ise 2.4 – 4.4 arasında bulunmuştur. Yine 15 mikrosatellit lokusu ve 7 populasyonla yapılan başka bir çalışmada (Grigaliunaite ve ark 2003) locus başına düşen ortalama allel sayısının 4.4 – 10.9 arasında olduğu ve 36 adet özgün allele rastlanıldığı belirtilmektedir. Merinos koyunlarında yapılan bir çalışmada (Arranz ve ark 2001a) 18 mikrosatellit lokusu ve 6 farklı Merinos populasyonu kullanılmış ve toplam 15 adet özgün allelin tespit edildiği bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada da toplam 7 adet farklı koyun populasyonunda locus başına düşen ortalama allel sayısının 6.6 (Karacabey Merinosu) ile 12.3 (Hasmer) arasında değiştiği gözlemlenmiş ve tespit edilen 49 adet allelden 4 tanesinin özgün allel olduğu belirlenmiştir. AA, Karacabey Merinosu ve Konya Merinosu populasyonlarında özgün allele rastlanılmamıştır. Tespit edilen özgün allellerin allel frekanslarının genelde 0.1’den

küçük olduğu belirlenmiş, Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarının verilerinin de ilavesiyle toplam allel sayısının 61 olduğu, lokus başına düşen ortalama allel sayısının değişmediği ve bu allellerden 11 tanesinin özgün allel olduğu Kıvırcık populasyonunda OarJMP58 lokusunda gözlenen özgün allelin frekansının 0.5 olduğu gözlemlenmiştir. Fakat sunulan çalışmanın sonuçlarına bakılacak olursa özgün allellerin bir ırkı tanımlamada kesin bir kriter olamayacağı, ancak elde bulunan sınırlı sayıdaki populasyonlarda az da olsa bir fikir vereceği kanısına varılmıştır. Çünkü ilk 7 populasyonla yaptığımız testlerde Alman Siyah Baş populasyonunda OarJMP58 lokusunda 148 baz çiftine denk gelen bölgede 1 özgün allel bulunurken, Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarının ilave edilmesiyle aynı bölgede 1 allel de Dağlıç populasyonunda gözlemlenmiştir. Bunun da anlamı populasyon sayısı arttıkça aynı allellerin başka populasyonlarda da görülebileceği ve özgün allellerin bir ırka spesifik olamayacağı şeklinde düşünülebilir.

Schmid ve ark (1999)'nın sığırlarda tespit ettikleri toplam 255 adet allelden 55 tanesinin özgün allel olduğu ve bu özgün allellerden sadece 8 tanesinin frekansının 0.1'den büyük olduğu bildirilmiştir.

Hedrick ve ark (2001)'nin koyunlarda yaptıkları bir çalışmada lokus başına düşen ortalama allel sayısının 2.5 – 3.9 arasında olduğu ve çalışılan populasyonlardan Tiburon Island populasyonunun yok olma tehlikesi geçirdiği bildirilmektedir.

Sığırlarda yapılan çalışmalara bakıldığında, 6 yerli Fransız sığır ırkında 23 mikrosatellit ile yapılan bir çalışmada (Maudet ve ark 2002) lokus başına düşen ortalama allel sayısının 5.61 – 6.52 arasında değiştiği ve 34 adet özgün allel tespit edildiği bildirilmektedir. 10 mikrosatellit lokusu kullanılarak 20 farklı Avrupa sığır ırkında yapılan başka bir çalışmada (Kantanen ve ark 2000) ise ortalama allel sayısı 3.4 – 6.4 arasında iken, özgün allel sayısı 14 olarak tespit edilmiştir.

Yerli ve melez ırklarımızın, diğer ülkelere göre daha yüksek allel sayısı ve genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir. Bunun en önemli sebebinin coğrafi bölge olarak koyunun evciltirme kaynağına yakın olmamızla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Bruford ve ark 2003). Sunulan çalışmada gözlenen allel sayılarından daha yüksek allel sayısına sahip çalışmalarda ise ya çalışılan mikrosatellit sayısı ya da kullanılan popülasyon sayılarının daha fazla olduğu görülmektedir.

Gutiérrez- Espeleta ve ark (2000) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada bütün popülasyonların Hardy-Weinberg (HW) dengesinde olduklarını gözlemlerken, Holstein ırkı sığırlarda yapılan başka bir çalışmada (Hanslik ve ark 2000) ve Arranz ve ark (1998)'nin koyunlarda yaptıkları diğer bir çalışmada ise çalışılan popülasyonların bazı lokuslar açısından HW dengesinden sapmalar gösterdiği bildirilmektedir.

Sunulan çalışmada alt popülasyonlar içerisindeki akrabalı yetiştirme katsayısı olarak bilinen F_{IS} değerlerine bakıldığında -0.051 ile 0.088 (Kıvırcık ve Dağlıç verileri ilavesiyle $-0.051 - 0.148$) arasında değiştiği görülmektedir. Popülasyonların F_{IS} değerleri incelendiğinde, Kıvırcık popülasyonu dışındaki popülasyonlara ait değerlerin istatistiki olarak önemli olmadığı ($P > 0.05$) ve popülasyonlarda HW dengesinden sapma olmadığı gözlenmiştir. Fakat Kıvırcık popülasyonuna ait F_{IS} değerinin istatistiki olarak önemli ($P < 0.01$) olduğu, popülasyonda HW dengesinden bir sapma olduğu, bunun nedeninin de akrabalı yetiştirmeye bağlı olduğu düşünülmektedir.

F_{IS} değerlerinin pozitif olması genelde heterozigot azlığı olarak tanımlanmaktadır. Yine F_{IS} değerlerine bakıldığında Alman Siyah Baş, Hasak ve Karacabey Merinosu popülasyonlarında bu değerlerin negatif olduğu yani popülasyonlarda heterozigot fazlalığı olduğu gözlemlenirken diğer popülasyonlarda pozitif (+) F_{IS} değerlerinin bulunması heterozigot azlığını (homozigot fazlalığı) göstermektedir.

AA genotipi genelde Alman Siyah Baş erkekleri ve Akkaraman dişileri kullanılarak oluşturulmuştur. KHMAE'nde bu genotipin oluşturulduğu yıllarda mevcudu az olan Alman Siyah Baş populasyonunda erkek bireylerinde az sayıda olması nedeniyle bu populasyonda akrabalık olması kuvvetli ihtimaldir. Bu sebeple AA genotipinde homozigot fazlalığı olması beklenen bir durumdur.

Aynı çiftlikte yetiştirilen Akkaraman, Hasmer, Konya Merinosu ile ayrıca Kıvırcık populasyonlarında da aynı durum (pozitif F_{IS} değerleri) söz konusudur. Pozitif olan değerlerin oldukça küçük oldukları fakat Kıvırcık populasyonunda bu değer 0.148 olduğu dikkati çekmektedir.

Heterozigot azlığının sebepleri genellikle populasyonu oluşturan alt populasyonlardan, null alleli varlığından veya yetiştiricilik uygulamalarından (seleksiyon vs) kaynaklanabilmektedir. Null allellerinin frekansları $X = (H_e - H_o) / (1 + H_e)$ formülüne göre (Brookfield 1996) hesaplanabilmektedir. Kıvırcık ırkı için bu formüle göre yapılan hesaplamada null allel frekansının değerinin oldukça düşük (0.06) olduğu belirlenmiştir.

5.2. Populasyonlar ve Bireyler Arasındaki Genetik Farklılıklar

Populasyonlar arası genetik farklılıkların belirlenmesi için hesaplanan F_{ST} değerlerinin istatistiki olarak önemli olduğu ($P < 0.001$) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan populasyonlar için hesaplanan F_{ST} değerinin 0.053 (Kıvırcık ve Dağlıçla birlikte 0.071) olduğu, bu değer istatistiksel olarak önemli ($P < 0.001$) olduğu ve AA – Hasak ve Hasak – Hasmer populasyonları dışında bütün populasyonların birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir.

AA ve Hasak genotipinin her ikisinde de Alman Siyah Baş ve Akkaraman geni bulunmaktadır. Bu yüzden iki genotipin birbirinden ayrılmadığı ve F_{ST} değerinin istatistiki olarak önemsiz ($P > 0.05$) olduğu görülmektedir. Aynı durum Hasak ve Hasmer genotipleri içinde geçerlidir. Her iki genotipte de Hampshire Down ve Alman Siyah Baş ırkları

melezleme çalışmalarında kullanılmıştır. Bu yüzden Hasak ve Hasmer genotiplerinin birbirine çok yakın ve F_{ST} değerlerinin istatistiki olarak önemsiz ($P > 0.05$) olduğu görülmektedir. Ayrıca AA, Hasak ve Hasmer popülasyonlarının aynı çiftlikte olmaları da başka bir faktör olarak düşünülebilir.

Yapılan karşılaştırmalarda bulunan F_{ST} değerlerine göre en küçük değer 0.001 (AA-Hasak) iken en yüksek değer 0.153 (Kıvırcık-Karacabey Merinosu) olarak tespit edilmiştir.

F_{ST} değerleri sonucuna göre AA-Hasak ve Hasak-Hasmer karşılaştırmaları dışındaki bütün popülasyonların birbirinden farklı olduğu ve bu farkın istatistiki olarak önemli olduğu ($P < 0.05$) gözlenmiştir.

Koyunlarda yapılan diğer çalışmalarda bulunan ortalama F_{ST} değerlerine bakıldığında Gutiérrez- Espeleta ve ark (2000) bu değeri 0.264, Farid ve ark (2000) 0.163, Byrne ve ark (baskıda) 0.18 olarak tespit etmişlerdir. Bu değerler ile karşılaştırıldığında sunulan çalışmada bulunan F_{ST} değerinin (0.071) bahsedilen çalışmalardan oldukça düşük olduğu ve bunun anlamı da çalışmada kullanılan popülasyonlar birbirinden farklı olsada genetik olarak aralarında fazla bir uzaklık olmadığı olarak düşünülebilir. Fakat bunun başka bir sebebi de çalışmada kullanılan mikrosatellit sayısı ve örnekleme yapıldığı ırkların coğrafi olarak dağılımından kaynaklanabilir. Çünkü yukarıda bahsedilen Gutiérrez- Espeleta ve ark (2000) ile Farid ve ark (2000)'nın bahsedilen çalışmalarında 10'ar mikrosatellit lokusu kullanmışlar, Byrne ve ark (baskıda) ise 20 mikrosatellit lokusu kullanmışlar ve ayrıca çalıştıkları numuneler İngiltere'den Ürdün'e kadar olan geniş bir coğrafyayı kapsamaktadır. Sunulan çalışmada ise imkansızlıklar nedeni ile ancak 3 mikrosatellit lokusu çalışılabilmiş, örnekleme melezleme çalışmalarında kullanılan ve bu yüzde genotipik olarak birbirleriyle ilişkili olan, sınırlı bir coğrafyayı kapsayan bireylerden yapılmış ve bütün bu nedenlerden dolayı da F_{ST} değerinin diğer araştırmacıların sonuçlarından düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Arranz ve ark (2001b)'nin İspanyol koyun ırklarında yaptıkları çalışmada F_{ST} değeri 0,068 olarak belirlenmiş ve İspanyol koyun ırkları arasında yakın bir genetik ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç yukarıda bahsedildiği şekilde yerel bir coğrafyayı temsil etmekte ve sunulan çalışmadaki F_{ST} sonuçlarını destekler niteliktedir.

D_A (Nei 1987) genetik uzaklık değerlerine bakıldığında, her iki ölçütün de popülasyonlar arası uzaklığı ölçtükleri hatırlandığında, beklendiği gibi, F_{ST} değerlerine paralel sonuçlar gözlemlenmiştir. En düşük genetik uzaklık 0.121 (Konya Merinosu - Hasmer) ve en yüksek genetik uzaklık değeri ise 0.516 (Kıvırcık – Alman Siyah Baş) olarak gözlemlenmiştir.

Nei (1987)'nin D_A genetik uzaklığı kullanılarak çizilen komşu birleştirme ağacında (Neighbor-Joining Tree; NJT) 3 ana grup oluşmuştur (Şekil 4.1). Bu gruplardan birisi sadece Kıvırcık popülasyonudur. İkinci grup, iki alt gruptan oluşan ve genellikle Konya civarından örneklenen gruptur. Bu alt gruplardan birisi Akkaraman, Hasak ve AA'dır, diğer alt grup ise Hasmer ve Konya Merinosu'ndan oluşmaktadır. Üçüncü grup ise Dağlıç, Alman Siyah Baş ve Karacabey Merinosu popülasyonlarından meydana gelmektedir. Fakat üçüncü gruptaki kümeleşme, Hasmer-Konya Merinosu veya Hasak-Akkaraman kümeleşmesi gibi akrabalık ilişkisine dayanmamaktadır. Üçüncü gruptaki popülasyonlar (Dağlıç, Alman Siyah Baş, Karacabey Merinosu) diğer popülasyonların hepsine uzaktır. Kendi aralarında bir benzerlik sergilemekte ancak ağaçta birbirleri arasındaki mesafeden de görüleceği gibi bu benzerlikler daha önceki gruplarda akrabalar arasında görülen benzerlikten çok daha azdır.

Bu gruplardan ilkinde tek olarak gruplaşan Kıvırcık popülasyonu, F_{ST} değerlerine göre de bütün popülasyonlardan farklı ($P < 0.001$) görünmektedir. Aslında Karacabey Merinoslarının oluşumunda Kıvırcık ırkı kullanıldığı için Kıvırcık popülasyonunun bu popülasyona genetik olarak yakın olması beklenirdi. Fakat büyük ihtimalle rastlantısal

genetik sapma sonucu kendi içinde farklılaşmış olabilir. Ancak bir ırk için (FCA şekillerinde de görüldüğü gibi) bir merkez civarında yoğun olarak toplanan özgün bir genotipler topluluğu gözlenmemektedir. Karacabey Merinosu oluşumunda Kıvırcığın hangi bireylerinden yararlandığı, bizim örneklerimiz içine Kıvırcık dağılımının hangi köşesinden allel aktarıldığına bağlı olarak böyle bir fark görülmüş olabilir. Bu çalışmada kullanılan Hasmer ve Hasak genotiplerinin oluşturulmasına 1986'lı yıllarda başlanmış fakat Karacabey Merinoslarının oluşturulmasına ise 1935'lerde yani daha eski zamanlarda başlanmıştır. Bu uzun süre içerisinde rastlantısal genetik sapma, populasyonlardaki farklılığın oluşumunda etkili olmuş olabilir.

İkinci grupta ise Hasmer ve Hasak genotipleri ile bunların oluşumunda kullanılan yerli ve melez populasyonlar görülmektedir. Bu grup beklenildiği gibi çıkmıştır. Akkaraman, Hasak ve AA birlikte bir alt grubu oluşturmuşlar. Zaten Hasak genotipinin oluşumunda Akkaraman ve AA populasyonu kullanılmıştır. Bunlardan Hasak ve AA daha yakın görünmekte ve F_{ST} değerlerine göre de ($P > 0.05$) birbirlerinden farksız oldukları anlaşılmakta ve D_A genetik uzaklık değerleri de (0.139) diğer populasyonlara göre oldukça küçük görünmektedir. İkinci alt grupta da Hasmer ve bu genotipin oluşumunda kullanılan Konya Merinosu bulunmaktadır. Yine bu iki populasyon için hesaplanan F_{ST} değeri önemli görünse de ($P < 0.01$), D_A genetik uzaklık değerleri diğer ikili karşılaştırmalardaki uzaklık değerlerine göre (örneğin Konya Merinosu - Alman Siyah Baş D_A değeri 0.362) oldukça düşüktür (0.121).

Üçüncü grupta ise Alman Siyah Baş, Dağlıç ve Karacabey Merinosu birlikte gruplanmıştır. Alman Siyah Baş – Dağlıç populasyonları arasındaki F_{ST} değeri 0.104 ($P < 0.001$), D_A değeri ise 0.416 olarak belirlenmiştir. Aynı değerler Alman Siyah Baş - Karacabey Merinosu arasında 0.113 ($P < 0.001$) ve 0.406 olarak belirlenmiştir. Bu değerlere bakıldığında da her üç populasyonunda genetik olarak birbirine uzaklıklarının hemen

hemen aynı fakat aralarındaki farklılığın Hasak-Akkaraman veya Hasmer-Konya Merinosu'ndaki ilişkiden daha büyük olduğu söylenebilir.

Populasyonlarda ikişerli mikrosatellit lokusu kullanarak hesaplanan D_A genetik uzaklık değerleride (Ek 5) benzer sonuçlar vermiştir. OarFCB20 – OarJMP29 lokuslarıyla hesaplanan D_A değerlerine göre en yakın populasyonlar 0.103 değeri ile Konya Merinosu ve Hasmer populasyonları, en uzak populasyonlar ise 0.550 değeri ile Kıvırcık ve Alman Siyah Baş populasyonları olarak bulunmuştur. OarFCB20 – OarJMP58 lokuslarıyla hesaplanan D_A değerlerinde ise genotip olarak en yakın populasyonlar 0.111 değeri ile Hasmer ve Hasak, en uzak populasyonlar ise 0.528 değeri ile Dağlıç ve Konya Merinosu populasyonları olarak belirlenmiştir. OarJMP29 – OarJMP58 lokuslarıyla yapılan hesaplamada yine benzer şekilde genotipik olarak en yakın populasyonlar 0.138 değeri ile yine Hasmer ve Hasak, en uzak populasyonlar ise 0.545 değeri ile Kıvırcık ve Alman Siyah Baş olarak belirlenmiştir.

İkili mikrosatellitlerle çizilen NJT'lerde (Ek 6), üç mikrosatellit ile çizilen ağaca benzer şekildedir. Kıvırcık ve Dağlıç bütün populasyonlardan farklı görünmektedir. Yine ikili mikrosatellitlerle çizilen NJT'lerde birbirine genotipik olarak yakın olan Hasak – AA, Konya Merinosu – Hasmer gibi akrabalık ilişkisi olan populasyonların birlikte grup oluşturmaları sağlanabilmiştir.

Populasyonlar arası farklılığın F_{ST} değerlerine göre istatistiki olarak önemli olmasına rağmen, güçlü bir gruplaşma gözlenmemektedir. Bu nedenle 3 boyutlu düzlemde FCA metoduna göre çizilen 3 boyutlu grafikte de (Şekil 4.8) populasyonların hemen hemen hepsinin aynı bölgede toplandığı ve sadece Alman Siyah Baş, Kıvırcık ve bir miktarda Dağlıç populasyonununun ayrı bir gruplaşma gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu şekilde genetik varyasyonun % 72.2'si şekile belli bir açıdan bakılarak 3 boyutta gözlenmiştir. FCA grafiği ve ağaçlar aynı değerlerin farklı ele alınışlarını temsil etmektedir. Ağaçta populasyonlar

tek noktadır, grafikte her birey kendi yer almıştır. Irklara ait bireylerin genotiplerinin çalışılan lokuslar açısından ne kadar çok örtüştüğünü göstermek açısından bu grafik gösterimi yardımcı olmaktadır. Irklar birbirlerinden kesin çizgilerle ayrılan, bireyleri birbirine çok benzeyen özgün dağılımlar göstermemektedir.

Byrne ve ark (basımda)'da çalıştıkları Avrupa koyun ırkları arasında (20 mikrosatellit ile çalıştıkları halde) yüksek düzeyde bir genetik farklılık gözlemlenmesine rağmen, 3 boyutlu grafikte ırklara ait bireylerin birbirinden ayrıldığı bir dağılım bulamamışlardır. Barker ve ark (1997) mandalarda yaptıkları bir çalışmada D_A uzaklığı kullanılarak çizilen ağaçta populasyonlar arası genetik ilişki gösterilmiş, bazı kümeler populasyonlar arası farklılığı çok güçlü olarak desteklemese de Swamp populasyonlarının Lanka ve Murrh populasyonlarından farkının açıkça görüldüğünü bildirmektedirler.

Soysal ve ark (2001)'nin koyunlarda yaptığı benzer bir çalışmada da populasyonlar arası farklılığın gösterilmesi için Nei'nin D_A uzaklığı kullanılarak çizilen ağaçta İvesi ırkının ayrı bir grup, Konya Merinosu ve Akkaraman ayrı bir grup ve Türkgeldi ile Kıvırcık ırklarının başka bir grup olarak ayrıldığı belirtilmektedir. Oluşan bu gruptaki koyunların geçmişlerinde Konya Merinosu'nda Akkaraman geninin, Türkgeldi ırkında da Kıvırcık geninin olduğu bildirilmektedir. Yine bireyler arasındaki farklılıkları göstermek için allel paylaşım uzaklıkları kullanılarak çizilen ağaçta da aynı ırka ait bireyler yer yer bir arada gruplansa da aralara başka ırklara ait bireylerin girdiği de bildirilmektedir. 3 boyutlu düzlemde çizilen FCA grafiğinde de bireylerin belirgin bir ayrışma göstermediği ve değişik ırklara ait bireylerin bazı yerlerde birbirleri ile karıştıkları bildirilmektedir. Sunulan çalışma sonuçları ile Soysal ve ark (2001)'nin sonuçları birbirlerini destekler niteliktedir.

Arranz ve ark (2001b) koyunlarda 18 mikrosatellit lokusu kullanarak yaptıkları çalışmada, bireylerin hangi populasyona ait olduklarını belirlemek için assignment testini kullanmışlar ve sunulan çalışmada da kullanılan Bayesian metodu ile en yüksek

performansı aldıklarını belirtmişlerdir. Buchanan ve ark (1994) ırklar arasında gözlenen allel frekansları farklılıklarının bir bireyin hangi ırka ait olduğunu belirlemede kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar koyunlarda 8 mikrosatellit lokusu kullanarak yaptıkları çalışmada 4 koyun ırkında (Awassi, Romney, Border Leicester ve Suffolk) % 98'in üzerinde doğru sonuç aldıklarını, Booroola ırkında ise % 95'in üzerinde doğru sonuç aldıklarını fakat Merinosların sıklıkla diğer Booroola ırkları ile karıştığını belirtmişlerdir.

MacHugh ve ark (1998)'nin Avrupa sığır ırklarında 10 mikrosatellit lokusu kullanarak yaptıkları çalışmada assignment testinde 5 popülasyonda % 99'un üzerinde, 2 popülasyonda ise % 94 oranında doğru sonuçlar aldıklarını belirtmektedirler. Farid ve ark (2000)'nin koyunlarda 10 mikrosatellit lokusu kullanarak yaptıkları çalışmada assignment testi sonuçlarının % 90,2 - % 99,7 arasında olduğu en fazla hatanın İngiliz ırklarında görüldüğü ve İngiliz ırklarının birbiriyle karıştığı bildirilmektedir.

Maudet ve ark (2002)'nin Fransız sığır ırklarında yaptıkları çalışmada, assignment testinin güven aralığının artmasıyla (örneğin $P < 0,05$ 'ten $0,001$ 'e) testin doğruluk oranının azaldığı, ayrıca aralarında genetik farklılığın az olduğu bireylerde assignment testinin doğruluğunun da azaldığı bildirilmektedir.

Soysal ve ark (2001) koyunlarda yaptıkları çalışmada fenotipik olarak bir ırka ait olan bireyin, 3 mikrosatellit lokusu kullanılarak yapılan assignment testinde genotipik açıdan aynı ırkta gruplanmasının mümkün olmadığını gözlemlediklerini belirtmektedirler.

Sunulan çalışmada da Bayesian metodu kullanılarak 3 mikrosatellit lokusuyla assignment testi yapılmış fakat Soysal ve ark (2001)'nin sonuçlarına benzer şekilde ve daha önce 3 boyutlu grafikte de görülen örtüşen dağılımda oluşan beklentimize paralel olarak bireylerin kendi popülasyonlarında tam olarak gruplanmadığı, bir bireyin kendi ırkından başka en az 2 farklı ırkta daha gruplandığı gözlemlenmiştir. Bu durum Byrne ve

ark (basımda)'da da gözleendiği gibi genel bir durum olmakla beraber, Maudet ve ark (2002)'nın belirttiği gibi populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların çok büyük olmamasının etkisinin olduğu da düşünülmektedir. Çünkü sunulan çalışmada kullanılan populasyonlar için hesaplanan F_{ST} değeri 0.053, Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarının da ilavesiyle bu değerin 0.071 olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç:

Çalışmada 3 mikrosatellit lokusu kullanılarak, melezleme çalışmalarıyla elde edilen yeni genotipler, yerli, melez ve yabancı koyun ırklarında genetik yapı araştırılmıştır.

Populasyonlarda görülen genetik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu ($H_o = 0.762 - 0.857$ ve $H_e = 0.790 - 0.867$, Kıvırcık ve Dağlıç populasyonları ilavesiyle $H_o = 0.707 - 0.857$ ve $H_e = 0.790 - 0.867$) ve populasyonların ikili karşılaştırmaları sonucunda bulunan F_{ST} değerlerinin istatistiki olarak önemli olduğu ($F_{ST} = 0.053$, Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarıyla birlikte 0.071, $P < 0.001$) belirlenmiştir.

F_{ST} sonuçlarına göre bütün populasyonların birbirinden farklı olduğu fakat melezleme çalışmalarıyla elde edilen Hasak - Hasmer ve Hasak - AA populasyonlarının karşılaştırmaları sonucu elde edilen F_{ST} değerinin istatistiki olarak önemsiz olduğu ve bu populasyonların kullanılan mikrosatellit lokusları açısından birbirinden farklı olmadığı gözlemlenmiştir.

Populasyonların F_{IS} değerlerinin -0.051 - 0.088 (Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarıyla birlikte -0.051 - 0.148) arasında değiştiği, sadece Kıvırcık populasyonunda F_{IS} değerinin istatistiki olarak önemli ($P < 0.01$) olduğu ve HW dengesinden sapma gözleendiği ve bu populasyonda akrabalı yetiştirme etkisinin olduğu, diğer populasyonlarda F_{IS} değerlerinin istatistiki olarak önemsiz olduğu ve HW dengesinden sapma gözlenmediği belirlenmiştir.

Populasyonların genetik çeşitliliklerinin yüksek olmasına rağmen D_A genetik uzaklık değerlerine göre, populasyonların birbirlerine genetik olarak uzak olmadıkları

gözlemlenmiştir. Çizilen FCA grafiğinde de Alman Siyah Baş, Kıvırcık ve Dağlıç populasyonlarının farklı küme oluşturarak ayrıldığı, diğer bütün populasyonların birarada kümелendiği belirlenmiştir.

Çalışılan populasyonlarda tespit edilen özgün genetik ayrışmanın çok belirgin olmamasının temel nedenini ülkemizde verim özelliklerinin artırılması amacıyla yetiştiriciler tarafından bilinçsizce yürütülen melezleme çalışmaları oluşturmaktadır. Rastgele yapılan bu melezlemeler koyun ırklarının özgün genetik yapılarını bozmakta ve genetik ayrışma azalma eğilimine girmektedir. Bu olguda ülkemize özgü ırk olarak gen kaynaklarımızın değerlerinin azalmasına yol açmaktadır.

Çalışılan ırklar genetik olarak birbirleriyle yakın akraba olduklarından, assignment testinde bireyler sadece kendi populasyonlarında değil, bilakis kendi populasyonları yanısıra en az iki ayrı ırk içinde daha gruplanmışlardır.

Yabancı ülkelerde mikrosatellitlerle yapılan çalışmaların çoğunda PCR işlemini izleyen elektroforez işlemi DNA Genetik Analizatör cihazlarında otomatik olarak yürütülmüş ve bu sayede en az 30 mikrosatellit lokusuyla çalışmalar yapılmıştır. Sunulan çalışmada ise hem yeni bir metot denenmesi açısından, hem de PCR işleminden sonraki elektroforez işleminin manuel olarak yapılmasından dolayı zaman, para ve iş gücünün kısıtlı olması nedeniyle ancak 3 mikrosatellit lokusunda çalışılabilmektedir.

Üç adet mikrosatellit bölgesiyle çalışılmasına rağmen, çizilen komşu birleştirme ağacında (NJT) yerli ve melez koyun ırklarının kendi aralarında gruplaşması sağlanabilmiştir. Ama bu konuyla ilgili gelecekte yapılacak veya yapılması düşünülen çalışmalarda populasyonların genetik yapıları hakkında daha detaylı sonuçlar alabilmek için imkanlar dahilinde daha fazla mikrosatellit bölgesiyle çalışılması önerilebilir.

Sunulan çalışma ülkemizde hala az sayıda olan ve koyunculukta da son yıllarda uygulama alanı bulan DNA markerları ile yapılan çalışmalardan birisi olmasıyla önem

kazanmaktadır. Bu nedenle bu alanda bundan sonra planlanan çalışmalara yol göstermesi ve veri tabanı sağlaması açısından önemlidir.

Ayrıca sunulan bu çalışma ile laboratuvarımızda yapılan populasyon genetiği çalışmaları için yeni bir teknik daha laboratuvarımıza kazandırılmış ve uygulanabilir hale getirilmiştir.



6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Vet) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA - 2004

Zafer BULUT

Danışman

Prof. Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU

İkinci Tez Danışmanı

Prof.Dr. İnci TOGAN

Türkiye'deki Bazı Koyun Irklarının Genetik Yapılarının

Mikrosatellitlerle İncelenmesi

Yerli koyun ırklarımız aynı zamanda bizim yerli gen kaynaklarımızdır. Dünyanın bütün ülkelerinde son yıllarda hayvan gen kaynaklarını koruma konusundaki çalışmalarda hızlı bir artış gözlenmektedir. Biyoteknolojinin her alanda hızla geliştiği günümüzde, bu teknolojinin hayvancılığımıza da aynı hızla aktarılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Biyoteknoloji sayesinde ıslah çalışmaları hem daha kısa sürede hem de etkili olarak yapılabilmektedir. Mikrosatellitler de popülasyon genetiği çalışmalarında kullanılan ideal markerlardan biridir.

Çalışmada 7 farklı koyun popülasyonunun (Konya Merinosu, Karacabey Merinosu, Akkaraman, Alman Siyah Baş, Hasmer, Hasak ve AA) genetik yapısını araştırmak için 169, ayrıca diğer araştırmacılar tarafından temin edilen Kıvırcık ve Dağlıç popülasyonlarının verilerinin de ilavesiyle toplam 226 adet birey kullanılmıştır. Koyunların kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmış ve standart fenol/kloroform metodu ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) yöntemiyle ilgili DNA bölgeleri yükseltgenmiş, PCR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra otoradyografi yöntemiyle görüntülenmiştir.

Bu populusyonların genetik yapılarını belirlemek amacıyla 3 mikrosatellit lokusu (OarFCB20, OarJMP29 ve OarJMP58) incelenmiş ve toplam 49 adet allel, Kıvırcık ve Dağlıç populusyonlarıyla birlikte toplam 61 adet allel gözlenmiştir. Akkaraman, Hasak, Hasmer, Kıvırcık ve Dağlıç populusyonlarında olmak üzere toplam 11 adet private (özel) allele rastlanmıştır. Populusyonların heterozigotluk düzeylerine bakıldığında ortalama gözlenen heterozigotluğun (H_o) 0.762 – 0.857 (9 populusyon birlikte 0.707 - 0.857) arasında olduğu, ortalama beklenen heterozigotluğun (H_e) ise hem kendi populusyonlarımızda hem de Kıvırcık ve Dağlıç verilerinin ilavesinde 0.790 - 0.867 arasında olduğu görülmüştür.

Çalışılan populusyonlarda F istatistikleri populusyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu göstermiştir. Populusyonlar için hesaplanan F_{IS} değerlerinin -0.051 – 0.088 (Kıvırcık ve Dağlıç verilerinin ilavesiyle -0.051 - 0.148) arasında değiştiği ve Kıvırcık hariç ($P < 0.01$) bütün populusyonlar için istatistiksel olarak önemsiz ($P > 0.05$), F_{ST} değerlerinin ise (0.053, Kıvırcık ve Dağlıç verilerinin ilavesiyle 0.071) istatistiki açıdan önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$).

Sonuç olarak; bu çalışmada kullanılan populusyonlar ve ilave edilen Kıvırcık ile Dağlıç populusyonlarında, populusyonlar içi ve populusyonlar arası genetik çeşitliliğin yüksek olduğu görülmesine karşın faktöriyel birleştirici analiz sonuçlarında sadece Kıvırcık, Alman Siyah Baş ve Dağlıç populusyonlarının farklı gruplar oluşturduğu, diğer populusyonların ise tek bir grup oluşturduğu belirlenmiştir.

7. SUMMARY

INVESTIGATION OF GENETIC STRUCTURE OF SOME SHEEP BREEDS IN TURKEY BY USING MICROSATELLITES

Native sheep breeds are also our native genetic resources. In the last decade, there has been observed a rapid increase in the studies on the preservation of the animal genetic resources. It has been inevitable to apply new research techniques in husbandry studies due to the rapid and recent advances in every aspects of biotechnology. By means of biotechnological studies, animal improvement has been accomplished both in a short time and in an effective way. Microsatellites are one of the favored markers used in population genetics studies.

In this study, 169 samples from 7 different breeds were analysed (Konya Merino, Karacabey Merino, Akkaraman, German Black Head, Hasmer, Hasak and AA), with the addition of data from Kıvırcık and Dağlıç breeds of another study, a total of 226 samples' data were used to analyze the genetic diversity within and among breeds. The DNAs were extracted by standard phenol/chloroform method from blood samples collected in EDTA containing tubes. Specific genomic regions were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and the resulting PCR products were separated by polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by autoradiography.

In order to investigate genetic diversity in these breeds, three microsatellite markers (OarFCB20, OarJMP29 and OarJMP58) were studied. A total of 49 alleles were observed, which reaches to 61 with the addition of data from Kıvırcık and Dağlıç. A total of 11 private alleles, i.e. present only in one of the breeds, were observed in Akkaraman, Hasak, Hasmer, Kıvırcık and Dağlıç breeds. In addition, the estimated mean observed heterozygosities (H_o) were between 0.762 and 0.857 (which is between 0.707 - 0.857 when Kıvırcık and Dağlıç is included), and mean expected heterozygosities (H_e) values

were between 0.790 and 0.867 in 7 populations of the present study which does not change with the addition of Kırırcık and Dağlıç populations.

All the breeds studied were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium by applying F statistics. The resulting F_{IS} values were between -0.051 and 0.088 (which was between -0.051 and 0.148 when Kırırcık and Dağlıç was included) and they were all statistically non-significant ($P > 0.05$), except for Kırırcık ($P < 0.01$). Moreover, F_{ST} values (0.053 , which was 0.071 when Kırırcık and Dağlıç was included) were found to be statistically significant ($P < 0.001$).

In conclusion, a high genetic variation was observed within and among the populations including all the ones analyzed for the present study and the populations which were included from another study. However, the Factorial Correspondence Analysis revealed different groupings for Kırırcık, German Black Head and Dağlıç populations, but a single group including all the rest of the populations.

8. LİTERATÜR LİSTESİ

- Abramson RD (1995)** *Thermostable DNA polymerases* In “PCR Strategies”, 39-57, Academic Press.
- Açık L (2002)** *Populasyon Genetiği* “ Genetik Kavramlar”, Çeviri Ed Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Akçapınar H (1994)** *Koyun Yetiştiriciliği*, Medisan Yayınevi, Seri No:8, Ankara.
- Akçapınar H (2000)** *Koyun Yetiştiriciliği*, Ders Kitabı, 2. Baskı, İsmat Matbaacılık Ltd Şti, Ankara.
- Aksoy K, Tuli A, Kayrın L, Çürük A ve Attila G (1999)** *Tarımda DNA tetkikleri*, III.Biyokimya Yaz Okulu, Balcalı-ADANA.
- Alkan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M (1997)** *Moleküler Biyolojik Yöntemler “Parazit Hastalıklarında Tanı”*, Özcel MA, Altıntaş N, 373-411, Türkiye Parazitoloji Derneği, No:15, İzmir.
- Altunok V, Nizamhoğlu M, Ergüven A and Togan İ (1999)** *Red blood cell enzyme biochemical polymorphism in Anatolian shepherd dog*, Revue Med Vet, 150(7), 625-628
- Altunok V, Nizamhoğlu M ve Bulut Z (2002)** *Ankara Keçilerinin Genetik Yapılarının Elektroforetik Yöntemler Kullanılarak Araştırılması*, SÜAF, Proje No:2000-061, KONYA.
- Aranguren-Mendez J, Jordana J, Gomez M (2001)** *Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers*, Genet Sel Evol, 33(4), 433-442.
- Arda M (1997)** *Mikrobiyolojide Biyoteknoloji* “Temel Mikrobiyoloji”, 1.Baskı, Medisan Yayın Serisi, 409-460.
- Arı Ş (2004)** *DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması* “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”, Ed Temizkan G ve Arda N, İ.Ü Biyoteknoloji ve Genetik

Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEEM) Yayın No:2, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Arıtürk E (1977) Evcil Hayvanların Genetiği, F.Ü Veteriner Fakültesi Yayınları: 9, Ders Kitabı: 3, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

Arranz JJ, Bayon Y, Primitivo FS (1998) *Genetic relationships among spanish sheep using microsatellites*, Animal Genetics, 29(6), 435-440.

Arranz JJ, Bayon Y, Primitivo FS (2001a) *Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep*, Small Ruminant Research, 39(1),3-10

Arranz JJ, Bayon Y, Primitivo FS (2001b) *Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites*, Genet Sel Evol, 33(5),529-42.

Arruga MV, Monteagudo LV, Tejedor MT, Barrao R, Ponz R (2001) *Analysis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep*, Research in Veterinary Science, 70(3), 271-273.

Ayter Ş (2002) *İnsan Genom Anatomisi*, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Özel Sayı, 1-10.

Barker JSF, Tan SG, Selveraj OS, Mukherjee TK (1997) *Genetic variation within and relationships among populations of Asian water Buffalo (Bubalus bubalis)*, Animal Genetics, 28 (1), 1-13.

Bej AK, Mahbubani MH and Atlas RM (1991) *Amplification of nucleic acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and other methods and their applications*, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26(3/4), 301-334.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Goudet J and Bonhomme F (1996-2000) Genetix 4.00 Windows™ software population genetics, Laboratoire Genome, Populations, Interactions, University of Montpellier, France.

Beuzen ND, Stear MJ and Chang KC (2000) *Molecular markers and their use in animal breeding*, The Veterinary Journal, 160(1), 42-52

Bhatramakki D, Dong J, Chhabra AK, Hart GE (2000) *An integrated SSR and RFLP linkage map of Sorghum bicolor (L.) Moench*, Genome, 43, 988-1002.

Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Solinas-Toledo S, Fries R, Grosz MD, Yoo J and Beattie CW (1994) *A Genetic Linkage Map for Cattle*, Genetics, 136, 619-639.

Boyce WM, Hedrick PW, Muggli-Cockett NE, Kalinowski S, Penedo MC and Ramey RR (1997) *Genetic variation of major histocompatibility complex and microsatellite loci: a comparison in Bighorn sheep*, Genetics, 145, 421-433.

Brookfield JFY (1996) *A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency*, Molecular Ecology, 5, 453-455.

Bruford MW, Bradley DG and Luikart G (2003) *DNA markers reveal the complexity of livestock domestication*, Nat Rev Genet, 4(11), 900-910.

Buchanan FC, Adams LJ, Littlejohn RP, Maddox JF and Crawford AM (1994) *Determination of Evolutionary Relationships Among Sheep Breeds Using Microsatellite*, Genomics, 22(2), 397-403.

Byrne K, Chikhi L, Townsend SJ, Cruickshank RH, Alderson GLH and Bruford MV *Genetic diversity within and among European sheeps types and its implications for breed conservation*, Molecular Ecology, Basımda.

Casati M, Gandini GC and Leone P (1990) *Genetic Variation and Distances of Five Italian native sheep breeds*, Animal Genetics, 21, 87-92.

Cerit H, Altınel A, Demir H, Elmaz Ö, Atasoy S, Abacı E ve Altunçul H (2001) *Damızlık seçiminde DNA tipleme yöntemlerinin kullanılmasının araştırılması*, VHAG-1471, TÜBİTAK.

Clarke SW, Tucker EM and Osterhoff AR (1989) *Blood groups and biochemical polymorphism in the Namaqua sheep breed*, *Animal Genetics*, 20, 279-286.

Crawford AM, Dodds KG, Pierson CA et al (1995) *An autosomal genetic linkage map of the sheep genome*, *Genetics*, 40, 703-724.

Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A and Solignac M (1999) *New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals*, *Genetics*, 153(4), 1989-2000.

Cornuet JM and Luikart G (1996) *Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data*, *Genetics*, 144(4), 2001-2014.

Çetinkaya B (1998) *Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Temel Prensipler*, *F.Ü Sağlık Bil Dergisi*, 12(2), 149-156.

de Gortari MJ, Freking BA, Cuthbertson RR, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Leymaster KA, Dodds KG, Crawford AM, Beattie CW (1998) *A second-generation linkage map of the sheep genome*, *Mam Genome*, 9, 204-209.

Deacon LJ and Lah M (1989) *The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis*, *Australian Veterinary Journal*, 66(12), 442-444.

DİE (2002) *Tarım İstatistikleri Özeti, 1982-2001*, DİE, Ankara.

Diez-Tascon C, Littlejohn RP, Almeida PAR and Crawford AM (2000) *Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites*, *Animal Genetics*, 31, 243-251.

Ellegren H, Moore S, Robinson N, Byrne K, Ward W and Sheldon BC (1997) *Microsatellite Evolution – A Reciprocal Study of Repeat Lengths at Homologous Loci in Cattle and Sheep*, *Mol Biol Evol*, 14(8), 854-860.

Erensayın C (2000) Genetik, Nobel Yayın Dağıtım Ltd Şti, Ankara.

Erlich HA, Gelfand D and Sninsky J (1991) *Recent advances in the polymerase chain reaction*, Science, 252, 1643-1651.

Erol İ, Yurtyeri A, Hildebrandt G and Kleer J (1990) *Polimeraz Zincir Reaksiyonu*, Seminer notu, yayımlanmamış, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.

Ertuğrul M ve Aşkın Y (1988) Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması, Prof.Dr.Orhan DÜZGÜNEŞ'in Meslekte 50.Yılı Şerefine Türkiye'de Hayvancılık, Genetik, İstatistik Sempozyumu, 13-14 Ekim, Ankara.

Ertuğrul M ve Akman N (2000) Hayvan Gen Kaynaklarının Korunması ve Türkiye Hayvan Gen Kaynakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, 17-21 Ocak, Ankara.

FAO (2003) http://www.fao.org.tr/waicent/portal/statistics_an.asp

Farid A, O'Reilly E and Kelsey Jr CR (2000) *Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers*, Canadian Journal of Animal Science, 80, 9-17.

Gardner EJ, Simmons MJ and Snustad DP (1991) *Population and Evolutionary Genetics* "Principles of Genetics", 8th ed, John Wiley & Sons, Inc, United States.

Gibbs RA (1990) *DNA amplification by the polymerase chain reaction*, Analytical Chemistry, 62, 1202-1214.

Goldstein DB and Schlötterer C (1998) *Microsatellites: Evolution and Application*, Oxford University Press, Oxford and Vienna.

Grigaliunaite I, Tapio M, Viinalass H, Grislis Z, Kantanen J and Miceikiene I (2003) *Microsatellite variation in the Baltic sheep breeds*, Veterinarija ir Zootechnika, 21(43), 66-73.

Guo SW and Thompson EA (1992) *Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles*, *Biometrics*, 48, 361-372.

Gutiérrez- Espeleta GA, Kalinowski ST, Boyce WM and Hedrick PW (2000) *Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implication for conservation*, *Conservation Genetics*, 1, 3-15.

Haley C and Visscher P (1999) *DNA Markers and Genetic Testing in Farm Animal Improvement: Current Applications and Future Prospects*, Annual Report 1998-1999, 28-39, Roslin Institute, Edinburgh.

Hancock JM (1998) *Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutation mechanism* “ *Microsatellites: Evolution and Application*”, Ed by Goldstein DB and Schlötterer C, Oxford University Press, Oxford and Vienna.

Hanslik S, Harr B, Brem G and Schlötterer C (2000) *Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations*, *Animal Genetics*, 31, 31-38.

Hedrick PW, Gutierrez-Espelata GA and Lee RN (2001) *Founder effect in an island population of bighorn sheep*, *Molecular Ecology*, 10, 851-857.

Hoelzel AR (1995) *Genetic Analysis of Populations* “*Molecular Biology and Biotechnology*”, Ed by Robert A Meyers, VCH Publishers, Inc, New York.

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH and Brow AD (1988) *DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction – amplified DNA*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 9436-9440.

Joobeur T, Periam N, de Vicente MC, King GJ and Arús P (2000) *Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers*, *Genome*, 43(4), 649-655.

Kalfoğlu ve Yükseloğlu (2002) *İnsan Genomu, Suç ve Suçun Önlenmesi*, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Özel Sayı, 71-81

Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, Lien S, Vilkki J, Brusgaard K, Eythorsdottir E, Danell B and Adalsteinsson S (2000) *Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds*, J Hered, 91 (6), 446-57.

Kappes SM (1999) *Utilization of gene mapping information in livestock animals*, Theriogenology, 51(1), 135-147.

Kawasaki ES (1990) *Amplification of RNA* In “ PCR Protocols: A Guide to Methods and Amplifications” Ed by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, 21-27, Academic Press Inc San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.

Kayihan GC (2000) *The genetic structure of Cedrus Libani A. Rich populations determined by DNA markers*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Ankara.

Konuk M ve Babaoğlu M (2001) *DNA'nın Moleküler Yapısı ve Kromozomlar* “Bitki Biyoteknolojisi 2. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları”, Ed Özcan S, Gürel E , Babaoğlu M, S.Ü Vakfı Yayınları, KONYA.

Lan R and Reeves PR (2000) *Unique adaptor design for AFLP fingerprinting*, BioTechniques, 29, 4, 745- 749.

Lewontin RC and Hubby JL (1966) *A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations II. Amount of Variation and Degree of Heterozygosity in Natural Populations of Drosophila Pseudoobscura*, Genetics, 54, 595-609.

Lewontin RC (1989) *DNA Sequence Polymorphism* “Evolution and Animal Breeding Reviews on Molecular and Quantitative Approaches in Honour of Alan Robertson”, Ed by Hill WG and Mackay FC, CAB International, UK.

Li MH, Zhao SH, Bian C, Wang HS, Wei H, Liu B, Yu M, Fan B, Chen SL, Zhu MJ, Li SJ, Xiong TA and Li K (2002) *Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis*, *Genet Sel Evol*, 34, 729-744.

Liu S, Saha S, Stelly D, Burr B, Cantrell RG (2000) *Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton*, *The American Genetic Association*, 91, 326-332.

Loftus RT, Ertugrul O, Harba AH, EI-Barody MAA, MacHugh DE, Park SDE and Bradley DG (1999) *A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East*, *Molecular Ecology*, 8, 2015-2022.

Luikart G, Biju-Duval MP, Ertugrul O, Zagdsuren Y, Maudet C and Taberlet P (1999) *Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (Capra hircus)*, *Animal Genetics*, 30(6), 431-438.

Luikart G and England PR (1999) *Statistical analysis of microsatellite DNA data*, *Tree*, 14(7), 253-256.

Lüleci G, Sakızlı M ve Alper Ö (2000) *Renkli Genetik Atlası*, Ed by Passarge E, Tavashi Matbaacılık Ltd Şti, İstanbul.

MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P and Bradley DG (1997) *Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (Bos taurus and Bos indicus)*, *Genetics*, 146, 1071-1086.

MacHugh DE, Loftus RT, Cunningham P and Bradley DG (1998) *Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers*, *Animal Genetics*, 29(5), 333-340.

Maciejowski J and Zieba J (1982) *Origin of animals and zootechnical systematics* "Genetics and Animal Breeding Part A. Biological and genetic foundations of animal breeding", Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam-Oxford-New York, PWN Polish Scientific Publishers Warszawa.

Maddox JF (2000) *Chromosomal assignments and polymorphism information content in sheep for 12 cattle microsatellites*, *Animal Genetics*, 31(2), 144-145.

Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, Cribiu EP, Freking BA, Beh KJ, Cockett NE, Kang et al (2001) *An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci*, *Genome Research*, 11(7), 1275-1289.

Maijala K (1997) *Genetic Aspect of Domestication, Common Breeds and their Origin* "The Genetics of Sheep", Ed by Piper L and Ruvinsky A, CAB International, UK.

Martin-Burriel I, Garcia-Muro E and Zaragoza P (1999) *Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites*, *Animal Genetics*, 30 (3), 177-182.

Martinez AM, Delgado JV, Rodero A and Vega-Pla JL (2000) *Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites*, *Animal Genetics*, 31(5), 295-301.

Maudet C, Luikart G and Taberlet P (2002) *Genetic diversity and assignment test among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis*, *J Anim Sci*, 80, 942-950.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988) *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*, *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.

Moazami-Goudarzi K, Laloe D, Furet JP, Grosclaude F (1997) *Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites*, *Animal Genetics*, 28(5), 338-45.

Morera L, Barba CJ, Garrida JJ, Barbancho M and de Andres DF (1999) *Genetic variation detected by microsatellites in five Spanish dog breeds*, *J Hered*, 90 (6), 654-656.

Mullis KB (1990) *The unusual origin of the polymerase chain reaction*, *Scientific American*, 262, 4, 36-42.

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Pres, Newyork.

Nizamhoğlu M, Altunok V, Kurtoğlu F, Düzgün H (2003) Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ndeki Yerli ve Melez Koyun Irklarında Biyokimyasal Polimorfizm, S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 97/028, Konya.

Oraler G (1990) Genetik I.Temel Genetik, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.

Öğüş A (2002) *DNA'nın Yapısı ve Analizi* “ Genetik Kavramlar”, Çeviri Ed Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara.

Öner C (2002a) *Genetik ve Evrim* “ Genetik Kavramlar”, Çeviri Ed Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara.

Öner C (2002b) *Deneyisel Yöntemler* “ Genetik Kavramlar”, Çeviri Ed Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara.

Öner R (2002c) *DNA Klonlarının Oluşturulması ve İncelenmesi* “ Genetik Kavramlar”, Çeviri Ed Öner C, Palme Yayıncılık, Ankara.

Peura T, Hyttinen JM, Turunen M and Janne J (1990) *A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction*, Theriogenology, 35 (3), 547-555.

Piper L and Ruvinsky A (1997) Preface “The Genetics of Sheep”, Ed by Piper L and Ruvinsky A, CAB International, UK.

Ponzoni RW (1997) *Genetic Resources and Conservation* “The Genetics of Sheep”, Ed by Piper L and Ruvinsky A, CAB International, UK.

Romanov MN and Weigend S (2001) *Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers*, Poult Sci, 80 (8), 1057-63.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase*, Science, 239, 487-491.

Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff G and Dolf G (1999) *Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis*, Animal Genetics, 30(1), 36-41.

Savelkoul PHM, Aarts HJM, Haas JD, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Raemaker JLW, Schouls L and Lenstra JA (1999) *Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art*, Journal of Clinical Microbiology, 37, 10, 3083-3091.

Schmid M, Saitbekova N, Gaillard C and Dolf G (1999) *Genetic diversity in Swiss cattle breeds*, Journal of Animal Breeding and Genetics, 116, 1-8.

Seixas D, Arnaud H, Queinnec G and Queinnec B (1988) *Approche du polymorphisme biochimique des enzymes erythrocytaires et plasmatiques du chien domestique*, Revue Med Vet, 139(3), 285-291.

Solak M, Şengil AZ ve Öztaş S (1997) *Mutasyonun Durumuna Göre Uygulanan Tanı Yöntemleri* "Rekombinant DNA Teknolojisi Temel İlkeleri ve Uygulama Alanları", 117-124, 1.Baskı, Şafak Basım Yayın Tic Ltd Şti, Manisa.

Soysal Mİ, Togan İ, Nizamhoğlu M, Ergüven A, Altunok V, Tuna YT, Özkan E, Gürcan K, Bulut Z, Koban E (2001) *Türkiye Yerli ve Melez Koyun Irklarının Genetik Yapılarının Mikrosatellitlerle İncelenmesi*, VHAG-1553, TÜBİTAK.

Stahlberger-Saitbekova N, Schlapfer J, Dolf G and Gaillard C (2001) *Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis*, J Anim Breed Genet, 118, 379-387.

Taylor GR (1993) *Polymerase chain reaction: basic principles and automation* In "PCR 1 A Practical Approach" Ed by McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, 1-14, Oxford University Press, Oxford.

Tekin ME, Gürkan M, Karabulut O ve Düzgün H (2001) *Merinos, Akkaraman ve İvesi Irklarının Bazı Etçi Irklar ile Melezlerinde (Hasmer, Hasak, Hasiv ve Linmer) Performans Test ve Seleksiyon Çalışmaları. I. Döl Verimi ve Yaşama Gücü*, Hayvancılık Araştırma Dergisi, 2 (1), 1-8.

Temizkan G (2004) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler: Genel Bakış* "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler", Ed Temizkan G ve Arda N, İ.Ü. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN) Yayın No:2, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Togan İ, Soysal Mİ, Altunok V, Özkan E, Koban E (2003) Populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan yeni istatistik yöntemler, GAP 3. Tarım Kongresi, 2-3 Ekim, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Şanlıurfa.

Togan İ, Soysal Mİ, Altunok V, Ergüven A, Koban E ve Özkan E (2004) Yerli Koyun Irklarında Bulunan Genetik Çeşitlilik, TBAG-2127 (101T118), TÜBİTAK, Sonuç raporu yazım aşamasındadır.

Tucker EM and Clarke SW (1980) *Comparative aspects of biochemical polymorphism in the blood of Caprinae species and their hybrids*, Animal Blood Groups Biochemical Genetics, 11, 163-183.

Ülgenalp A (2002) *Gen Haritalaması Yapılırken Kullanılan Yöntemlere Bakış*, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Özel Sayı, 21-27.

Ünal N ve Akçapınar H (1996) *Dünyada ve Türkiye'de Koyun Islah Çalışmaları*, Türk Veteriner Hekimliği Dergisi, 8 (2), 18-26.

Vignal A, Milan D, SanCristobal M and Eggen A (2002) *A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics*, Genet Sel Evol, 34, 275-305.

Vosberg HP (1989) *The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids*, Human Genetics, 83, 1-15.

White TJ, Arnheim N and Erlich HA (1989) *The polymerase chain reaction*, Trends in Genetic, 5(6), 185-189.

Wright AP and Thomas DW (1990) *The Polymerase Chain Reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research*, Journal of Pathology, 162, 99-117.

Yalçın BC (1986) *Sheep and Goats in Turkey*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome-Italy.

Yalçın BC (1990) *Koyun Irkları “ Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği”*, Aytuğ CN, Alaçam E, Özkoç Ü, Yalçın BC, Gökçen H ve Türker H, TÜM VET Hayvancılık Hizmetleri Yayını, No:2, 387-422, Teknografik Matbaası, İstanbul.

Yang L, Zhao SH, Li K, Peng ZZ and Montgomery GW (1999) *Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers*, Animal Genetics, 30 (6), 452-455.

Yıldırım A ve Kandemir N (2001) *Genetik Markörler ve Analiz Metodları “Bitki Biyoteknolojisi 2. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları”*, Ed Özcan S, Gürel E , Babaoğlu M, S.Ü Vakfi Yayınları, KONYA.

Zane L, Bargelloni L and Paternello T (2002) *Strategies for microsatellite isolation : a review*, Molecular Ecology, 11, 1-16.

İnternet Adresleri:

ARKDB Veri Tabanı: <http://www.thearkdb.org>

FAO: http://www.fao.org.tr/waicent/portal/statistics_an.asp

Genetix 4.0 Programı: <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>

Populations Programı: <http://www.cnrs-gif/pge/bioinfo/populations>



9. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Yozgat ili Sarıkaya ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sarıkaya ilçesinde tamamladı. 1993 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdi ve 1998 yılında aynı fakülteden mezun oldu. 1998 yılı Eylül ayında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından yapılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak, 02.10.1998 tarihinde göreve başladı. Halen aynı anabilim dalında görevini sürdürmektedir.

Evli ve 1 çocuk babasıdır.



10. TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, beni bu konuda çalışmam için yönlendiren hocam Prof.Dr. Mehmet NİZAMLIOĞLU'na, metodu öğrenmemde çok büyük emeği olan, bana her zaman moral kaynağı olan ve zaman ayıran hocam Prof.Dr. İnci TOGAN'a , laboratuvar çalışmalarım boyunca gece gündüz birlikte çalıştığımız arkadaşlarım Evren KOBAN, Emel ÖZKAN, Havva DİNÇ, Ahmet ZEHİR, Arzu SANDIKÇI ve Ayşe KOCA'ya, tez çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'nın bütün öğretim elemanlarına, Doç.Dr.Emrullah EKEN'e, Yrd.Doç.Dr. Ercan KURAR'a, maddi katkılarından dolayı S.Ü BAP Koordinatörlüğü'ne, her zaman yardımlarını gördüğüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve ayrıca Sayın Cengiz ATEŞ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ANNEM'e ve kardeşlerime, her şart altında sabır, iyi niyet ve yardımını esirgemeyen eşim Arş.Gör.Dr. Oya BULUT'a ve her zaman moral ve mutluluk kaynağım olan oğlum Ali BULUT'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

EK-1

ÇALIŞILAN POPULASYONLARDAKİ MİKROSATELLİTLERE AİT ALLEL UZUNLUKLARI (bp)

POPULASYON		Oar FCB20	Oar JMP29	Oar JMP58	POPULASYON		Oar FCB20	Oar JMP29	Oar JMP58
AKKARAMAN	1	94104	139151	142154	HASAK	2	100108	131131	144160
AKKARAMAN	2	94096	137149	144144	HASAK	3	108122	139141	144144
AKKARAMAN	3	96108	139143	142144	HASAK	4	100104	115131	144168
AKKARAMAN	4	94096	133133	144154	HASAK	5	94100	141161	144168
AKKARAMAN	5	92094	137149	144150	HASAK	6	92098	115129	160168
AKKARAMAN	6	92094	131139	144146	HASAK	7	96104	117139	142158
AKKARAMAN	7	90094	131139	142168	HASAK	8	94108	131131	160168
AKKARAMAN	8	94106	141141	144154	HASAK	9	96098	141141	160160
AKKARAMAN	9	96108	131141	144144	HASAK	10	92096	133137	144168
AKKARAMAN	10	92092	135137	144164	HASAK	11	96104	131141	162168
AKKARAMAN	11	94094	139139	142144	HASAK	12	96104	127137	166168
AKKARAMAN	12	94098	137139	144160	HASAK	13	94104	131141	142144
AKKARAMAN	13	106124	131139	144154	HASAK	14	94104	131131	144158
AKKARAMAN	14	94098	139139	160168	HASAK	15	94106	131141	144144
AKKARAMAN	15	100106	131149	144166	HASAK	16	94098	137137	160160
AKKARAMAN	16	94094	137151	144150	HASAK	17	94104	139147	144162
AKKARAMAN	17	100106	131131	150164	HASAK	18	94106	131137	144168
AKKARAMAN	18	98106	141141	144160	HASAK	19	94104	131141	152158
AKKARAMAN	19	96108	139147	144144	HASAK	20	102106	131141	144152
AKKARAMAN	20	98098	129139	144162	HASAK	21	94104	139151	166168
AKKARAMAN	21	108120	129129	144158	HASAK	22	98108	141141	144168
AKKARAMAN	22	98108	137137	144160	HASAK	23	98108	115137	144154
AKKARAMAN	23	100108	137137	158158	HASAK	24	96104	131137	144144
AKKARAMAN	24	106112	129129	144164	HASAK	25	94104	131141	144160
AKKARAMAN	25	94098	137149	150162	HASAK	26	98100	131141	144162
AKKARAMAN	26	98112	141149	144144	HASAK	27	94104	131141	144144
AKKARAMAN	27	94098	129137	142144	HASAK	28	96102	137141	144168
AKKARAMAN	28	100100	129137	142144	HASMER	1	0	117147	158168
ASB	1	96100	119149	144162	HASMER	2	92092	141141	144144
ASB	2	96106	117139	154162	HASMER	3	92116	117145	144168
ASB	3	104108	117145	154160	HASMER	4	92104	127133	144144
ASB	4	100106	149149	160162	HASMER	5	94104	117135	160160
ASB	5	96100	117143	144168	HASMER	6	106106	131141	154154
ASB	6	100108	147147	162168	HASMER	7	92104	139161	160168
ASB	7	96100	117147	154160	HASMER	8	96112	119141	144160
ASB	8	100106	143147	154162	HASMER	9	100106	137141	144144
ASB	9	100106	139145	154154	HASMER	10	96108	131143	144144
ASB	10	108112	119147	152160	HASMER	11	104104	119139	160168
ASB	11	100106	117145	154154	HASMER	12	100108	143159	144158
ASB	12	96100	145145	160168	HASMER	13	96100	117131	144170
ASB	13	96100	143143	160162	HASMER	14	94102	131137	144168
ASB	14	100108	145149	160168	HASMER	15	100116	141143	144160
ASB	15	100100	139149	144148	HASMER	16	90094	131139	144160
ASB	16	106106	139143	160168	HASMER	17	94106	139139	144160
ASB	17	100106	117143	154168	HASMER	18	96110	131147	144168
ASB	18	96100	145149	162168	HASMER	19	102104	121159	144152
ASB	19	94106	137143	166168	HASMER	20	92096	141141	144162
ASB	20	100108	143147	160162	HASMER	21	96108	131141	144144
ASB	21	100108	139145	144160	HASMER	22	104116	119121	144160
ASB	22	100100	149149	148168	HASMER	23	100104	141141	142144
ASB	23	100112	149149	162162	HASMER	24	92104	131143	144150
ASB	24	100106	117145	144160	HASMER	25	104108	117131	144160
ASB	25	96106	117147	144160	HASMER	26	96108	141141	142144
ASB	26	100106	119145	160168	HASMER	27	100116	117139	142150
ASB	27	96100	139149	154162	HASMER	28	92108	135137	158160
ASB	28	94104	131141	144168	HASMER	29	94108	131131	144144
HASAK	1	102106	137141	144160	HASMER	30	96106	141159	144144

EK-1 (Devam)

ÇALIŞILAN POPULASYONLARDAKİ MİKROSATELLİTLERE AİT ALLEL UZUNLUKLARI (bp)

KONYA MER	1	92108	131147	144150	KIVIRCIK	2	98106	127137	158164
KONYA MER	2	96108	139141	160160	KIVIRCIK	3	92104	135139	142158
KONYA MER	3	92116	131143	158160	KIVIRCIK	4	96104	127139	152160
KONYA MER	4	96096	137137	144158	KIVIRCIK	5	98100	137137	160160
KONYA MER	5	94104	117137	142144	KIVIRCIK	8	110116	135135	164164
KONYA MER	6	92092	131139	142142	KIVIRCIK	9	98098	135159	138168
KONYA MER	7	92096	131139	144144	KIVIRCIK	11	104110	127137	138138
KONYA MER	8	96108	115145	158160	KIVIRCIK	12	98114	127137	138158
KONYA MER	9	100120	131159	142142	KIVIRCIK	16	94116	135135	138158
KONYA MER	10	96096	117131	160170	KIVIRCIK	18	94096	127135	138138
KONYA MER	11	96120	137137	144162	KIVIRCIK	20	100118	137137	142160
KONYA MER	12	92116	131141	144162	KIVIRCIK	21	100106	125137	138138
KONYA MER	13	96096	117119	150160	KIVIRCIK	22	104110	127135	138138
KONYA MER	14	96100	131147	158160	KIVIRCIK	23	94110	131135	138138
KONYA MER	15	92092	117129	142162	KIVIRCIK	24	92094	131137	156166
KONYA MER	16	90108	119121	158160	KIVIRCIK	25	94114	115137	158160
KONYA MER	17	90094	117131	160160	KIVIRCIK	27	92104	144156	0
KONYA MER	18	94104	131147	144160	KIVIRCIK	29	94094	127135	158158
KONYA MER	19	96120	117159	152158	KIVIRCIK	30	92092	127137	138138
KONYA MER	20	94098	139141	144144	KIVIRCIK	32	110118	142158	0
KONYA MER	21	92096	131145	142144	KIVIRCIK	33	94110	135145	138138
KONYA MER	22	96112	131147	142160	KIVIRCIK	34	96106	127135	138138
KONYA MER	23	102108	145159	142160	KIVIRCIK	35	94106	127137	138138
KONYA MER	24	106106	129143	142144	DAGLIÇ	1	96106	137137	144162
KONYA MER	25	90094	117139	158162	DAGLIÇ	2	94096	160160	0
KONYA MER	26	94094	131147	160170	DAGLIÇ	3	98106	139141	144150
KONYA MER	27	92104	117129	142162	DAGLIÇ	4	96120	144160	0
KONYA MER	28	96100	131137	158160	DAGLIÇ	5	98112	152160	0
KONYA MER	29	96104	115161	158160	DAGLIÇ	6	110112	137137	148158
KONYA MER	30	104116	131141	144146	DAGLIÇ	7	96098	137141	158160
AA	1	94104	137141	144168	DAGLIÇ	8	110120	129139	162164
AA	2	94096	137151	144154	DAGLIÇ	9	108112	135137	162168
AA	3	94098	131131	168168	DAGLIÇ	10	100108	139139	144168
AA	4	94104	131137	160168	DAGLIÇ	11	100120	129149	144144
AA	5	98098	131139	168168	DAGLIÇ	12	98098	139149	164168
AA	6	102108	131137	144154	DAGLIÇ	14	98112	137141	150162
AA	7	96096	137141	146164	DAGLIÇ	15	106108	137149	144168
AA	8	94104	131149	144168	DAGLIÇ	16	98106	142144	0
AA	9	94102	131137	144146	DAGLIÇ	17	98098	137147	142144
AA	10	92092	137143	142144	DAGLIÇ	18	98112	129129	144144
AA	11	102108	131131	144154	DAGLIÇ	19	98098	131139	144150
AA	12	94094	131141	144160	DAGLIÇ	20	106106	129143	142156
AA	13	96106	131143	144160	DAGLIÇ	21	98118	137139	144144
KARACABEY MER	1	108120	115141	144168	DAGLIÇ	22	100106	139143	164164
KARACABEY MER	2	98108	141141	144160	DAGLIÇ	23	98106	137139	142160
KARACABEY MER	3	94120	117143	144152	DAGLIÇ	25	98112	131139	144144
KARACABEY MER	4	100108	117117	144168	DAGLIÇ	26	94098	137137	144150
KARACABEY MER	5	94100	141141	144160	DAGLIÇ	27	98110	131149	144150
KARACABEY MER	6	94120	117141	144170	DAGLIÇ	28	98106	131149	144164
KARACABEY MER	7	94096	143159	144144	DAGLIÇ	29	106108	135137	162162
KARACABEY MER	8	96120	117139	144152	DAGLIÇ	30	98112	137139	144150
KARACABEY MER	9	98120	139147	142142	DAGLIÇ	31	98100	129147	142156
KARACABEY MER	10	94094	143143	144160	DAGLIÇ	32	98108	117147	144164
KARACABEY MER	11	94112	117141	144152	DAGLIÇ	33	98112	137139	144160
KARACABEY MER	12	94120	139143	142144	DAGLIÇ	34	98100	135137	144144
KIVIRCIK	1	94110	132132	142156	DAGLIÇ	35	98098	135139	144144

EK-2			
LOKUSLARA GÖRE F_{is} DEĞERLERİ			
	FCB20	JMP29	JMP58
AKKARAMAN	0.05838	0.26419	-0.07906
ASB	-0.18214	0.10204	-0.07143
HASAK	-0.14719	0.02383	-0.01974
HASMER	0.00478	0.10309	0.01456
MERİNOS	0.12696	-0.04370	0.03668
AA	0.20295	-0.12821	-0.05600
KM	-0.12037	0.19635	-0.15789
KIVIRCIK	0.03012	0.05920	0.38953
DAGLIC	-0.04734	0.06746	0.09119



EK-3

GeneClass 1.0.02 (16.II.99)
 COMPUTATION STARTED. Date: 14.09.2004 Time: 23:22:19.
 REFERENCE FILE: C:\Documents and Settings\Zafer BULUT\Desktop\Yemiden_istatistik\Yemiden_2\yemiden2.gtx
 TITLE: C:\Documents and Settings\Zafer BULUT\Desktop\Yemiden_istatistik\Yemiden_2\yemiden2.gtx
 SELECTED LOCI: Oar_FCB20 Oar_JMP29 Oar_JMP58
 SELF CLASSIFICATION

"Bayesian" Method.
 10000 simulated individuals, threshold=0.2000, Bayesian estimation of frequencies.

num.	name	group	loc.	AKKARAMAN	ASB	HASAK	HASMER	MERİÑOS	AA	KM	KIVIRCIK	DAGLIC	classified in												
1	51	[AKKARAMAN]	3	5.67	0.1388	9.88	0.0000	6.53	0.0308	7.95	0.0047	9.17	0.0003	5.80	0.0670	9.55	0.0002	9.33	0.0002	11.82	0.0000			
2	68	[AKKARAMAN]	3	3.44	0.0390	5.87	0.0519	5.76	0.0862	6.47	0.0510	6.46	0.0490	3.70	0.6130	7.28	0.0060	9.53	0.0001	4.63	0.4857	AKKARAMAN, AA, DAGLIC		
3	178	[AKKARAMAN]	3	4.87	0.3918	6.58	0.0182	7.25	0.0093	4.70	0.4953	4.75	0.5641	5.50	0.0989	3.99	0.3942	11.80	0.0000	5.24	0.2591	AKKARAMAN, HASMER, MERİÑOS, KM, DAGLIC		
4	219	[AKKARAMAN]	3	5.26	0.2469	8.25	0.0015	6.31	0.0430	6.38	0.0592	9.58	0.0000	6.49	0.0273	8.16	0.0014	11.83	0.0000	10.58	0.0000	AKKARAMAN		
5	1157	[AKKARAMAN]	3	4.06	0.7264	9.89	0.0000	8.58	0.0008	7.35	0.0124	7.20	0.0146	5.90	0.0578	10.87	0.0000	10.24	0.0000	6.81	0.0240	AKKARAMAN		
6	1165	[AKKARAMAN]	3	4.50	0.5453	10.16	0.0000	6.26	0.0456	6.09	0.0941	4.96	0.4530	4.18	0.3923	8.96	0.0004	9.28	0.0003	9.01	0.0006	AKKARAMAN, MERİÑOS, AA		
7	1289	[AKKARAMAN]	3	5.43	0.1981	9.96	0.0000	6.63	0.0259	5.98	0.1103	6.78	0.0280	6.15	0.0424	8.03	0.0020	8.31	0.0017	7.97	0.0036			
8	6469	[AKKARAMAN]	3	4.34	0.6124	6.39	0.0249	4.44	0.4114	4.58	0.5478	7.75	0.0051	4.57	0.2634	6.56	0.0191	11.71	0.0000	7.68	0.0064	AKKARAMAN, HASAK, HASMER, AA		
9	8464	[AKKARAMAN]	3	3.99	0.7565	6.43	0.0235	3.22	0.9061	3.19	0.9920	4.17	0.8351	3.63	0.6482	5.43	0.0935	12.56	0.0000	5.08	0.3062	AKKARAMAN, HASAK, HASMER, MERİÑOS, AA, DAGLIC		
10	8712	[AKKARAMAN]	3	5.65	0.1456	12.96	0.0000	9.47	0.0000	7.17	0.0171	8.82	0.0006	6.84	0.0159	12.05	0.0000	6.56	0.0384	7.49	0.0088			
11	9301	[AKKARAMAN]	3	3.48	0.9291	8.19	0.0015	5.07	0.2070	5.33	0.2551	5.03	0.4158	5.16	0.1462	3.62	0.5523	7.67	0.0064	5.51	0.1741	AKKARAMAN, HASAK, HASMER, MERİÑOS, KM		
12	Akk-16	[AKKARAMAN]	3	3.33	0.9571	7.84	0.0027	3.91	0.6485	6.57	0.0447	5.15	0.3622	4.03	0.4524	5.70	0.0663	6.60	0.0365	4.04	0.7369	AKKARAMAN, HASAK, HASMER, MERİÑOS, AA, DAGLIC		
13	Akk-18	[AKKARAMAN]	3	4.90	0.3823	7.18	0.0065	7.08	0.0131	6.74	0.0361	8.98	0.0006	6.46	0.0294	11.12	0.0000	11.63	0.0000	8.32	0.0014	AKKARAMAN		
14	Akk-19	[AKKARAMAN]	3	4.70	0.4546	7.11	0.0074	4.78	0.2916	7.20	0.0160	7.77	0.0049	4.98	0.1741	4.73	0.1862	6.26	0.0605	5.19	0.2698	AKKARAMAN, HASAK, DAGLIC		
15	Akk-20	[AKKARAMAN]	3	5.18	0.2721	5.28	0.1055	6.96	0.0154	8.43	0.0019	9.37	0.0001	8.15	0.0026	11.46	0.0000	10.40	0.0000	6.77	0.0254	AKKARAMAN		
16	Akk-21	[AKKARAMAN]	3	4.16	0.6897	10.93	0.0000	6.63	0.0263	7.77	0.0067	7.60	0.0068	5.55	0.0925	8.96	0.0004	10.21	0.0000	7.50	0.0087	AKKARAMAN		
17	Akk-22	[AKKARAMAN]	3	5.62	0.1497	9.60	0.0001	8.66	0.0007	7.38	0.0115	7.84	0.0038	8.32	0.0019	12.60	0.0000	8.33	0.0016	5.68	0.1383			
18	Akk-23	[AKKARAMAN]	3	4.56	0.5162	7.94	0.0027	3.81	0.6869	5.81	0.1394	6.16	0.0791	4.99	0.1714	5.46	0.0885	10.10	0.0000	4.91	0.3677	AKKARAMAN, HASAK, DAGLIC		
19	Akk-24	[AKKARAMAN]	3	4.53	0.5309	4.83	0.1745	5.04	0.2163	4.29	0.6757	4.55	0.6608	6.57	0.0239	4.34	0.2704	12.56	0.0000	4.57	0.5072	AKKARAMAN, HASAK, HASMER, MERİÑOS, KM, DAGLIC		
20	Akk-25	[AKKARAMAN]	3	4.34	0.6177	9.95	0.0000	5.85	0.0766	10.48	0.0000	6.79	0.0269	8.60	0.0010	8.11	0.0015	11.54	0.0000	3.39	0.9276	AKKARAMAN, DAGLIC		
21	Akk-26	[AKKARAMAN]	3	5.50	0.1808	12.20	0.0000	8.33	0.0015	9.96	0.0000	5.78	0.1456	10.64	0.0000	8.11	0.0000	10.61	0.0000	12.27	0.0000	4.56	0.5137	AKKARAMAN, DAGLIC
22	Akk-27	[AKKARAMAN]	3	4.00	0.7543	8.14	0.0017	4.19	0.5161	6.90	0.0285	5.45	0.2399	4.04	0.4483	6.89	0.0116	8.35	0.0015	3.81	0.8152	AKKARAMAN, HASAK, HASMER, MERİÑOS, KM, DAGLIC		
23	Akk-28	[AKKARAMAN]	3	5.48	0.1839	8.96	0.0005	5.89	0.0734	6.59	0.0424	5.66	0.1782	8.70	0.0007	9.93	0.0001	6.61	0.0356	5.87	0.1033			
24	Akk-29	[AKKARAMAN]	3	5.21	0.2633	10.33	0.0000	10.12	0.0000	10.52	0.0000	8.79	0.0006	9.70	0.0000	10.61	0.0000	12.27	0.0000	4.56	0.5137	AKKARAMAN, DAGLIC		
25	Akk-30	[AKKARAMAN]	3	4.81	0.4117	9.70	0.0001	8.98	0.0003	10.96	0.0000	8.59	0.0009	7.89	0.0035	11.59	0.0000	10.24	0.0000	4.75	0.4315	AKKARAMAN, DAGLIC		
26	Akk-31	[AKKARAMAN]	3	4.35	0.6074	8.08	0.0018	7.91	0.0032	8.65	0.0011	8.65	0.0009	6.35	0.0338	5.89	0.0518	14.08	0.0000	3.99	0.7524	AKKARAMAN, DAGLIC		
27	Akk-32	[AKKARAMAN]	3	3.39	0.9481	12.37	0.0000	5.14	0.1932	9.34	0.0001	5.53	0.2110	5.94	0.0539	7.61	0.0036	8.55	0.0011	4.25	0.6507	AKKARAMAN, MERİÑOS, DAGLIC		
28	Akk-33	[AKKARAMAN]	3	4.34	0.6117	8.98	0.0005	5.99	0.0645	7.46	0.0100	5.61	0.1871	8.87	0.0006	8.33	0.0010	9.47	0.0001	4.78	0.4216	AKKARAMAN, DAGLIC		
29	420-5	[ASB]	3	7.25	0.0120	3.92	0.5587	9.21	0.0002	7.56	0.0088	7.44	0.0093	10.04	0.0000	9.90	0.0001	13.49	0.0000	7.22	0.0135	ASB		
30	474-9	[ASB]	3	7.60	0.0075	3.88	0.5764	7.06	0.0134	6.29	0.0681	7.20	0.0143	9.23	0.0001	9.62	0.0002	11.63	0.0000	7.64	0.0068	ASB		
31	487-4	[ASB]	3	10.49	0.0000	4.53	0.2578	8.30	0.0151	5.80	0.1414	7.03	0.0184	8.83	0.0006	9.67	0.0001	11.66	0.0000	12.65	0.0000	ASB		
32	854-1	[ASB]	3	6.06	0.0795	3.23	0.9431	8.71	0.0006	8.96	0.0004	8.84	0.0006	9.66	0.0000	10.91	0.0000	10.31	0.0000	5.81	0.1151	ASB		
33	855-1	[ASB]	3	7.93	0.0040	3.63	0.7120	7.21	0.0102	4.47	0.5949	7.01	0.0188	7.70	0.0042	4.03	0.3704	12.26	0.0000	6.34	0.0519	ASB, HASMER, KM		
34	856-1	[ASB]	3	7.52	0.0084	3.97	0.5290	6.79	0.0202	6.87	0.0297	7.96	0.0033	10.75	0.0000	7.60	0.0037	12.86	0.0000	6.38	0.0484	ASB		
35	863-1	[ASB]	3	8.45	0.0020	3.46	0.8139	7.18	0.0102	5.67	0.1677	6.53	0.0435	10.27	0.0000	6.83	0.0124	11.58	0.0000	8.87	0.0006	ASB		
36	950-8	[ASB]	3	7.21	0.0125	3.41	0.8475	9.34	0.0001	7.06	0.0215	8.52	0.0010	10.80	0.0000	10.17	0.0001	13.37	0.0000	7.89	0.0046	ASB		
37	951-2	[ASB]	3	7.51	0.0085	3.68	0.6833	9.22	0.0002	7.02	0.0234	9.33	0.0001	10.91	0.0000	9.25	0.0003	10.05	0.0002	10.05	0.0002	ASB		

EK-3 (Devam)

38	951-8 [ASB]	3	10.57	0.0000	6.09	0.0388	10.35	0.0000	7.07	0.0211	6.86	0.0251	12.26	0.0000	7.47	0.0045	13.83	0.0000	10.02	0.0002
39	952-2 [ASB]	3	10.02	0.0000	3.56	0.7563	9.81	0.0000	7.02	0.0234	9.12	0.0033	11.03	0.0000	10.61	0.0000	10.99	0.0000	11.15	0.0000
40	952-8 [ASB]	3	9.04	0.0006	3.43	0.8285	7.91	0.0032	6.26	0.0713	7.35	0.0111	8.76	0.0006	7.83	0.0024	7.47	0.0088	9.27	0.0005
41	953-2 [ASB]	3	7.30	0.0114	3.62	0.7194	8.47	0.0009	6.04	0.1005	5.74	0.1544	8.61	0.0010	6.45	0.0220	10.44	0.0000	6.89	0.0208
42	954-2 [ASB]	3	7.97	0.0035	3.31	0.9047	9.20	0.0002	7.76	0.0067	9.59	0.0000	8.76	0.0006	8.80	0.0006	10.65	0.0000	8.19	0.0021
43	955-2 [ASB]	3	6.48	0.0409	4.22	0.3954	9.31	0.0001	8.85	0.0005	9.86	0.0000	9.48	0.0001	8.11	0.0015	11.93	0.0000	5.55	0.1651
44	956-2 [ASB]	3	6.31	0.0546	3.91	0.5600	7.47	0.0064	5.40	0.2319	8.32	0.0018	6.04	0.0478	7.08	0.0090	8.57	0.0001	5.70	0.1353
45	956-8 [ASB]	3	8.66	0.0013	3.35	0.8784	8.78	0.0004	5.83	0.1350	10.23	0.0000	8.75	0.0006	7.88	0.0023	12.14	0.0000	8.53	0.0011
46	959-2 [ASB]	3	8.35	0.0020	3.20	0.9593	9.53	0.0000	8.72	0.0008	9.59	0.0000	10.15	0.0000	10.66	0.0000	10.81	0.0000	7.99	0.0033
47	960-2 [ASB]	3	6.26	0.0596	6.27	0.0295	7.08	0.0129	7.73	0.0071	9.99	0.0000	6.00	0.0499	9.50	0.0002	7.88	0.0041	7.70	0.0063
48	964-8 [ASB]	3	7.21	0.0125	3.60	0.7330	8.32	0.0015	6.19	0.0800	5.72	0.1591	10.52	0.0000	6.74	0.0147	13.32	0.0000	6.50	0.0411
49	971-9 [ASB]	3	6.49	0.0404	3.76	0.6424	8.85	0.0183	4.85	0.4257	5.13	0.3695	8.65	0.0008	6.12	0.0368	10.14	0.0000	7.00	0.0182
50	974-9 [ASB]	3	8.18	0.0025	4.03	0.4956	10.52	0.0000	10.61	0.0000	13.16	0.0000	9.60	0.0000	9.64	0.0002	11.29	0.0000	6.96	0.0192
51	990-0 [ASB]	3	6.96	0.0188	4.33	0.3428	11.22	0.0000	10.67	0.0000	9.85	0.0000	11.70	0.0000	10.39	0.0000	13.16	0.0000	5.84	0.1099
52	994-0 [ASB]	3	9.01	0.0006	3.34	0.8944	7.53	0.0057	5.00	0.3711	5.32	0.2896	10.38	0.0000	7.56	0.0038	10.01	0.0000	7.81	0.0054
53	995-0 [ASB]	3	7.56	0.0080	3.90	0.5706	5.85	0.0776	4.58	0.5467	4.38	0.7458	8.32	0.0013	6.11	0.0375	11.46	0.0000	5.99	0.0875
54	996-0 [ASB]	3	10.11	0.0000	3.57	0.7446	9.30	0.0001	5.99	0.1087	8.24	0.0020	10.49	0.0000	10.54	0.0000	8.78	0.0008	10.02	0.0002
55	999-0 [ASB]	3	5.54	0.1687	3.46	0.8137	8.51	0.0009	8.42	0.0020	9.37	0.0001	9.07	0.0004	10.27	0.0000	11.75	0.0000	7.26	0.0131
56	12778 [ASB]	3	5.10	0.3042	7.10	0.0074	2.65	0.9970	3.64	0.9189	6.58	0.0398	3.01	0.9028	7.07	0.0090	9.79	0.0000	7.83	0.0052
57	49 [HASAK]	3	6.24	0.0603	7.83	0.0027	4.08	0.5708	4.63	0.5212	5.78	0.1448	4.45	0.2964	9.06	0.0003	10.69	0.0000	6.63	0.0321
58	108 [HASAK]	3	4.69	0.4581	5.52	0.0806	3.84	0.6759	3.83	0.8651	4.24	0.8088	5.41	0.1102	6.89	0.0116	9.97	0.0000	5.68	0.1388
59	160 [HASAK]	3	5.72	0.1292	7.88	0.0025	4.67	0.3320	5.61	0.1793	7.11	0.0164	6.52	0.0260	5.08	0.1302	14.30	0.0000	6.44	0.0444
60	213 [HASAK]	3	7.78	0.0036	7.50	0.0036	3.84	0.6724	6.14	0.0859	7.24	0.0131	7.08	0.0107	8.50	0.0009	8.86	0.0004	9.35	0.0004
61	403 [HASAK]	3	6.69	0.0315	7.50	0.0036	4.34	0.4509	4.89	0.4072	7.96	0.0033	7.22	0.0088	5.50	0.0847	11.74	0.0000	7.91	0.0043
62	522 [HASAK]	3	7.75	0.0062	12.87	0.0000	6.06	0.0592	11.19	0.0000	8.01	0.0031	8.46	0.0015	9.09	0.0003	8.47	0.0015	9.38	0.0004
63	1114 [HASAK]	3	8.01	0.0035	9.11	0.0003	6.30	0.0433	5.36	0.2436	4.31	0.7732	9.23	0.0001	7.93	0.0022	7.79	0.0051	8.56	0.0009
64	1136 [HASAK]	3	5.32	0.2267	6.38	0.0254	3.68	0.7468	4.60	0.5356	6.19	0.0740	3.36	0.7845	7.06	0.0091	8.22	0.0023	6.84	0.0223
65	1141 [HASAK]	3	5.65	0.1434	7.97	0.0023	4.23	0.4988	6.30	0.0666	5.46	0.2389	5.06	0.1630	8.53	0.0012	6.37	0.0487	6.37	0.0487
66	1159 [HASAK]	3	5.22	0.2561	9.48	0.0001	5.11	0.1986	5.23	0.2867	8.36	0.0015	5.59	0.0873	9.94	0.0001	9.53	0.0001	8.82	0.0006
67	1204 [HASAK]	3	6.67	0.0323	6.27	0.0296	3.76	0.7082	4.89	0.4060	6.64	0.0366	5.47	0.1024	9.95	0.0001	10.30	0.0000	8.13	0.0023
68	1222 [HASAK]	3	8.94	0.0006	8.73	0.0008	5.40	0.1358	7.82	0.0062	10.98	0.0000	7.58	0.0056	12.23	0.0000	5.87	0.1051	11.41	0.0000
69	1236 [HASAK]	3	4.63	0.4867	9.35	0.0002	3.38	0.8569	3.94	0.8216	4.33	0.7647	3.83	0.5477	6.90	0.0109	9.33	0.0002	7.83	0.0052
70	1351 [HASAK]	3	5.10	0.3014	9.36	0.0002	3.46	0.8352	4.31	0.6655	4.12	0.8534	4.77	0.2185	9.72	0.0001	7.35	0.0099	8.20	0.0020
71	7129 [HASAK]	3	3.52	0.9202	6.77	0.0129	3.09	0.9517	3.53	0.9458	4.92	0.4709	3.62	0.6519	6.57	0.0191	10.18	0.0000	5.08	0.3091
72	7144 [HASAK]	3	4.61	0.4926	8.61	0.0011	4.48	0.3987	7.74	0.0069	5.49	0.2253	4.10	0.4251	7.24	0.0064	4.40	0.5441	5.27	0.2456
73	7184 [HASAK]	3	5.63	0.1486	5.51	0.0817	5.02	0.2202	5.50	0.2040	5.05	0.4076	8.00	0.0030	7.51	0.0042	11.02	0.0000	7.14	0.0152
74	8058 [HASAK]	3	4.04	0.7401	6.34	0.0270	3.37	0.8592	4.61	0.5314	6.80	0.0266	3.11	0.8713	9.35	0.0003	7.37	0.0096	4.82	0.4011
75	8064 [HASAK]	3	7.54	0.0083	10.18	0.0000	4.26	0.4862	5.39	0.2360	5.51	0.2186	7.22	0.0088	9.19	0.0003	7.73	0.0055	10.71	0.0000
76	8110 [HASAK]	3	8.29	0.0020	8.92	0.0006	4.45	0.4094	5.09	0.3357	6.57	0.0409	5.95	0.0538	9.06	0.0003	12.14	0.0000	8.95	0.0006
77	8177 [HASAK]	3	6.72	0.0298	8.61	0.0011	5.51	0.1171	9.17	0.0004	11.42	0.0000	6.66	0.0206	9.72	0.0001	8.55	0.0011	11.82	0.0000
78	8275 [HASAK]	3	4.86	0.3974	8.21	0.0015	3.63	0.7709	5.92	0.1190	8.18	0.0024	4.34	0.3317	3.89	0.4315	12.64	0.0000	5.08	0.3066
79	8374 [HASAK]	3	6.24	0.0603	9.69	0.0001	5.34	0.1445	9.36	0.0001	8.10	0.0026	6.08	0.0457	8.28	0.0011	11.05	0.0000	7.88	0.0048
80	8389 [HASAK]	3	4.45	0.5648	6.90	0.0108	3.09	0.9490	3.70	0.9074	4.00	0.8912	3.09	0.8739	9.44	0.0003	8.09	0.0029	6.29	0.0549
81	8688 [HASAK]	3	4.80	0.4174	7.03	0.0080	2.74	0.9940	3.38	0.9750	4.17	0.8357	3.37	0.7787	6.90	0.0109	9.11	0.0003	7.95	0.0039
82	9037 [HASAK]	3	4.64	0.4846	7.62	0.0034	3.98	0.6171	6.58	0.0438	5.72	0.1595	7.22	0.0088	7.62	0.0036	11.53	0.0000	4.61	0.4926
83	9194 [HASAK]	3	4.28	0.6400	7.54	0.0036	2.61	1.0000	3.24	0.9903	4.53	0.6717	3.16	0.8611	6.57	0.0191	10.09	0.0000	7.34	0.0120

EK-3 (Devam)

130	8360	[MERINOS]	3	10.62	0.0000	11.16	0.0000	11.63	0.0000	6.61	0.0411	6.15	0.0803	12.26	0.0000	11.89	0.0000	13.01	0.0000	12.58	0.0000
131	8365	[MERINOS]	3	8.03	0.0033	7.71	0.0032	6.92	0.0164	5.43	0.2256	4.28	0.7922	7.68	0.0046	7.74	0.0029	9.38	0.0002	9.49	0.0004
132	8368	[MERINOS]	3	5.77	0.1636	6.20	0.0328	3.93	0.6422	4.22	0.7024	4.08	0.8680	5.29	0.1266	7.73	0.0029	9.11	0.0003	7.95	0.0039
133	8449	[MERINOS]	3	12.51	0.0000	11.66	0.0000	10.68	0.0000	8.37	0.0022	5.77	0.1487	13.65	0.0000	6.36	0.0248	10.50	0.0000	11.18	0.0000
134	8470	[MERINOS]	3	3.71	0.9857	8.35	0.0013	3.54	0.8016	5.76	0.1496	5.69	0.1685	4.18	0.3923	3.09	0.8163	10.09	0.0000	4.17	0.6815
135	8650	[MERINOS]	3	6.73	0.0293	9.29	0.0003	7.02	0.0147	4.97	0.3815	3.80	0.9407	6.22	0.0387	9.77	0.0001	8.40	0.0015	9.45	0.0004
136	8729	[MERINOS]	3	6.38	0.0465	7.61	0.0034	7.54	0.0056	5.99	0.1088	4.47	0.7017	8.26	0.0022	7.64	0.0034	9.89	0.0000	6.27	0.0575
137	9102	[MERINOS]	3	11.60	0.0000	10.65	0.0000	10.06	0.0000	6.61	0.0409	5.89	0.1239	9.28	0.0001	8.75	0.0006	10.48	0.0000	12.28	0.0000
138	9287	[MERINOS]	3	5.26	0.2451	8.64	0.0010	8.28	0.0013	7.48	0.0010	6.38	0.0551	7.84	0.0036	8.23	0.0012	11.76	0.0000	5.14	0.2888
139	9319	[MERINOS]	3	8.00	0.0035	9.07	0.0004	8.23	0.0016	7.00	0.0239	5.23	0.3261	11.91	0.0000	9.03	0.0004	10.92	0.0000	8.68	0.0007
140	9327	[MERINOS]	3	7.30	0.0114	8.38	0.0013	6.76	0.0211	6.19	0.0785	4.98	0.4452	7.28	0.0080	6.88	0.0119	9.07	0.0003	9.10	0.0005
141	9439	[MERINOS]	3	8.51	0.0016	11.28	0.0000	7.43	0.0068	8.03	0.0042	4.99	0.4396	10.97	0.0000	11.41	0.0000	11.36	0.0000	10.29	0.0001
142	9498	[MERINOS]	3	5.22	0.2555	7.39	0.0047	4.57	0.3689	5.06	0.3477	4.02	0.8858	7.21	0.0090	10.49	0.0000	5.28	0.2263	6.01	0.0836
143	9570	[MERINOS]	3	10.70	0.0000	11.34	0.0000	5.78	0.0836	7.78	0.0065	5.43	0.2464	10.22	0.0000	10.61	0.0000	7.86	0.0045	12.67	0.0000
144	9572	[MERINOS]	3	7.82	0.0052	10.92	0.0000	7.23	0.0097	5.73	0.1574	5.72	0.1601	5.71	0.0756	10.75	0.0000	11.71	0.0000	11.21	0.0000
145	606	[AA]	3	4.86	0.3969	7.10	0.0074	2.92	0.9707	4.20	0.7074	6.98	0.0196	3.21	0.8382	7.07	0.0090	9.01	0.0003	7.20	0.0138
146	12248	[AA]	3	4.36	0.6061	7.95	0.0023	5.36	0.1395	7.35	0.0124	8.51	0.0010	3.91	0.5127	9.30	0.0003	10.46	0.0000	9.06	0.0005
147	12254	[AA]	3	5.57	0.1629	8.75	0.0008	3.78	0.6996	7.20	0.0160	8.36	0.0016	3.06	0.8884	7.53	0.0039	6.95	0.0209	6.23	0.0610
148	12255	[AA]	3	5.60	0.1556	6.84	0.0117	3.30	0.8796	4.74	0.4700	6.32	0.0620	3.12	0.8643	9.95	0.0001	5.36	0.2007	7.97	0.0035
149	12256	[AA]	3	5.57	0.1629	8.57	0.0012	4.66	0.3335	8.18	0.0030	9.39	0.0001	4.43	0.3064	7.49	0.0043	7.35	0.0099	4.72	0.4463
150	13065	[AA]	3	6.18	0.0660	8.24	0.0015	4.89	0.2579	5.32	0.2577	7.23	0.0134	3.60	0.6619	11.29	0.0000	12.72	0.0000	8.50	0.0012
151	13074	[AA]	3	6.10	0.0747	10.37	0.0000	8.45	0.0010	9.02	0.0004	7.48	0.0087	5.05	0.1634	10.03	0.0001	9.47	0.0001	7.66	0.0065
152	13087	[AA]	3	5.17	0.2729	6.08	0.0391	5.29	0.1568	6.22	0.0746	3.48	0.7260	9.35	0.0003	3.48	0.7260	9.79	0.0000	7.61	0.0075
153	13117	[AA]	3	6.36	0.0483	10.92	0.0000	5.74	0.0886	6.99	0.0244	5.86	0.1293	3.18	0.8520	10.87	0.0000	10.46	0.0000	8.89	0.0006
154	13127	[AA]	3	5.35	0.2191	10.62	0.0000	7.96	0.0029	5.19	0.2985	4.84	0.5148	5.10	0.1564	8.23	0.0012	9.08	0.0003	7.97	0.0037
155	13137	[AA]	3	6.65	0.0338	8.25	0.0015	4.89	0.2577	5.03	0.3598	7.11	0.0164	3.67	0.6238	10.15	0.0001	13.62	0.0000	9.33	0.0005
156	13172	[AA]	3	3.92	0.7819	7.16	0.0066	3.00	0.9603	3.90	0.8348	4.27	0.7959	3.20	0.8382	4.99	0.1428	9.07	0.0003	6.51	0.0407
157	22985	[AA]	3	5.28	0.2371	4.73	0.1970	6.08	0.0580	4.02	0.7908	4.50	0.6877	4.31	0.3500	7.64	0.0034	9.72	0.0000	5.57	0.1603
158	008-1	[KM]	3	7.77	0.0058	9.65	0.0001	6.11	0.0557	8.23	0.0024	7.81	0.0045	7.82	0.0037	4.01	0.3857	14.30	0.0000	7.73	0.0063
159	028-1	[KM]	3	4.56	0.5162	8.14	0.0017	3.71	0.7336	5.66	0.1680	5.77	0.1470	4.70	0.2301	3.72	0.4999	11.96	0.0000	5.21	0.2664
160	62-1	[KM]	3	9.66	0.0002	7.91	0.0024	9.57	0.0000	7.46	0.0100	6.14	0.0820	9.45	0.0001	2.80	0.9161	13.48	0.0000	8.66	0.0007
161	195-1	[KM]	3	8.16	0.0025	4.06	0.4832	5.91	0.0716	4.58	0.5453	7.17	0.0154	8.59	0.0012	4.01	0.3781	12.86	0.0000	6.54	0.0372
162	292-1	[KM]	3	4.42	0.5767	5.99	0.0432	3.51	0.8123	3.77	0.8816	5.17	0.3537	5.85	0.0618	3.30	0.7031	9.92	0.0000	6.29	0.0552
163	338-1	[KM]	3	8.89	0.0006	10.03	0.0000	8.45	0.0010	6.92	0.0272	5.55	0.2045	9.28	0.0001	3.11	0.8003	14.72	0.0000	8.49	0.0012
164	342-1	[KM]	3	6.64	0.0343	7.46	0.0043	8.14	0.0017	4.43	0.6115	5.02	0.4213	5.68	0.0778	3.70	0.5157	10.60	0.0000	7.69	0.0063
165	362-1	[KM]	3	9.07	0.0006	7.39	0.0047	7.76	0.0040	7.08	0.0206	5.39	0.2623	10.04	0.0000	3.61	0.5559	12.26	0.0000	7.56	0.0080
166	372-1	[KM]	3	6.25	0.0602	12.02	0.0000	9.01	0.0002	10.43	0.0000	6.09	0.0887	9.88	0.0000	5.15	0.1192	10.07	0.0000	5.47	0.1873
167	402-1	[KM]	3	5.52	0.1726	5.63	0.0685	7.16	0.0111	5.09	0.3362	5.56	0.2022	4.24	0.3714	3.22	0.7485	9.66	0.0000	7.11	0.0157
168	447-1	[KM]	3	8.60	0.0015	7.23	0.0064	6.93	0.0162	5.64	0.1726	6.30	0.0638	9.28	0.0001	3.41	0.6640	13.48	0.0000	8.07	0.0025
169	553-1	[KM]	3	5.16	0.2790	9.27	0.0003	8.98	0.0003	7.00	0.0239	5.33	0.2888	6.77	0.0176	3.10	0.8064	11.28	0.0000	5.75	0.1269
170	1	[KIVIRCİK]	3	11.87	0.0000	14.72	0.0000	12.44	0.0000	11.51	0.0000	11.51	0.0000	10.98	0.0000	10.32	0.0000	6.05	0.0829	9.96	0.0002
171	2	[KIVIRCİK]	3	7.29	0.0115	13.65	0.0000	8.01	0.0025	10.57	0.0000	10.39	0.0000	8.99	0.0005	13.75	0.0000	4.46	0.5142	6.66	0.0304
172	3	[KIVIRCİK]	3	6.66	0.0327	13.66	0.0000	8.29	0.0015	5.83	0.1350	6.85	0.0252	9.52	0.0000	11.71	0.0000	5.06	0.2863	9.83	0.0002
173	4	[KIVIRCİK]	3	9.87	0.0001	7.89	0.0025	5.83	0.0796	6.03	0.1026	7.42	0.0098	8.77	0.0000	8.45	0.0009	5.96	0.0946	11.64	0.0000
174	5	[KIVIRCİK]	3	5.09	0.3060	7.56	0.0035	4.95	0.2411	7.66	0.0080	5.86	0.1293	6.26	0.0366	7.83	0.0024	4.92	0.3342	4.88	0.3769
175	8	[KIVIRCİK]	3	11.35	0.0000	15.36	0.0000	15.36	0.0000	13.80	0.0000	11.92	0.0000	13.24	0.0000	5.34	0.2094	8.40	0.0014	8.40	0.0014

EK-3 (Devam)

176	9 [KIVIRCIK]	3 10.30 0.0000 14.21 0.0000 11.35 0.0000 10.96 0.0000 13.15 0.0000 10.16 0.0000 9.34 0.0003 5.56 0.1582 8.87 0.0006	
177	11 [KIVIRCIK]	3 12.72 0.0000 13.49 0.0000 10.34 0.0000 9.76 0.0000 12.51 0.0000 10.57 0.0000 14.39 0.0000 3.19 0.9633 12.41 0.0000 KIVIRCIK	
178	12 [KIVIRCIK]	3 11.02 0.0000 15.99 0.0000 9.87 0.0000 12.53 0.0000 11.96 0.0000 11.49 0.0000 13.75 0.0000 3.92 0.7514 10.91 0.0000 KIVIRCIK	
179	13 [KIVIRCIK]	3 10.43 0.0000 14.72 0.0000 12.26 0.0000 8.72 0.0008 10.46 0.0000 12.21 0.0000 12.01 0.0000 3.81 0.7887 10.79 0.0000 KIVIRCIK	
180	14 [KIVIRCIK]	3 10.67 0.0000 12.73 0.0000 10.62 0.0000 9.35 0.0001 12.12 0.0000 10.56 0.0000 10.66 0.0000 3.26 0.9472 11.35 0.0000 KIVIRCIK	
181	20 [KIVIRCIK]	3 6.92 0.0207 9.61 0.0001 7.37 0.0073 7.96 0.0045 7.02 0.0186 8.28 0.0222 9.22 0.0003 5.31 0.2167 5.95 0.0920 KIVIRCIK	
182	21 [KIVIRCIK]	3 10.00 0.0000 10.11 0.0000 10.39 0.0000 10.74 0.0000 11.16 0.0000 11.03 0.0000 12.82 0.0000 4.64 0.4398 9.94 0.0002 KIVIRCIK	
183	23 [KIVIRCIK]	3 13.78 0.0000 14.94 0.0000 12.72 0.0000 9.93 0.0000 14.72 0.0000 12.84 0.0000 14.39 0.0000 3.19 0.9633 13.04 0.0000 KIVIRCIK	
184	22 [KIVIRCIK]	3 10.35 0.0000 13.49 0.0000 11.51 0.0000 9.20 0.0003 11.97 0.0000 10.51 0.0000 10.32 0.0000 3.91 0.7554 9.79 0.0002 KIVIRCIK	
185	24 [KIVIRCIK]	3 7.12 0.0149 11.74 0.0000 6.96 0.0154 9.07 0.0004 8.43 0.0015 7.03 0.0114 13.16 0.0000 5.75 0.1205 9.96 0.0002	
186	25 [KIVIRCIK]	3 8.99 0.0006 12.10 0.0000 6.95 0.0159 9.77 0.0000 6.98 0.0196 9.38 0.0001 10.02 0.0001 5.23 0.2401 10.30 0.0001 KIVIRCIK	
187	27 [KIVIRCIK]	3 8.67 0.0013 10.24 0.0000 7.91 0.0032 7.48 0.0098 7.71 0.0055 7.22 0.0090 10.40 0.0000 4.74 0.4046 10.35 0.0001 KIVIRCIK	
188	29 [KIVIRCIK]	3 8.19 0.0022 13.50 0.0000 8.38 0.0013 7.50 0.0097 9.58 0.0000 10.51 0.0000 10.32 0.0000 3.91 0.7554 9.79 0.0002 KIVIRCIK	
189	30 [KIVIRCIK]	3 10.47 0.0000 14.08 0.0000 9.66 0.0000 9.22 0.0001 10.21 0.0000 9.30 0.0001 13.41 0.0000 3.56 0.8725 13.17 0.0000 KIVIRCIK	
190	32 [KIVIRCIK]	2 11.81 0.0000 11.81 0.0000 11.81 0.0000 10.62 0.0000 11.93 0.0000 10.53 0.0000 10.40 0.0000 4.98 0.3121 7.62 0.0071 KIVIRCIK	
191	33 [KIVIRCIK]	3 12.63 0.0000 12.51 0.0000 14.17 0.0000 10.23 0.0000 12.66 0.0000 12.42 0.0000 12.23 0.0000 3.88 0.7678 11.47 0.0000 KIVIRCIK	
192	34 [KIVIRCIK]	3 11.06 0.0000 11.96 0.0000 11.09 0.0000 9.35 0.0001 12.65 0.0000 11.44 0.0000 12.82 0.0000 3.65 0.8393 10.66 0.0000 KIVIRCIK	
193	35 [KIVIRCIK]	3 9.52 0.0003 11.16 0.0000 8.47 0.0009 9.37 0.0001 10.80 0.0000 8.87 0.0006 12.23 0.0000 3.13 0.9750 10.33 0.0001 KIVIRCIK	
194	1 [DAGLIC]	3 4.54 0.5247 5.70 0.0631 4.69 0.3239 5.90 0.1243 5.16 0.3560 5.90 0.0578 10.32 0.0000 8.61 0.0010 4.00 0.7504 AKKARAMAN, HASAK, MERINOS, DAGLIC	
195	2 [DAGLIC]	2 6.27 0.0586 6.88 0.0110 6.22 0.0478 6.63 0.0399 6.22 0.0717 5.36 0.1181 5.52 0.0838 6.41 0.0483 4.79 0.4142 DAGLIC	
196	4 [DAGLIC]	2 8.07 0.0446 9.39 0.0002 6.29 0.0437 6.63 0.0399 6.76 0.0295 6.97 0.0132 7.27 0.0061 11.41 0.0000 3.80 0.8186 AKKARAMAN, DAGLIC	
197	4 [DAGLIC]	2 8.57 0.0015 9.60 0.0001 9.71 0.0000 9.74 0.0000 7.73 0.0054 8.66 0.0037 6.79 0.0135 8.36 0.0015 4.71 0.4483 DAGLIC	
198	5 [DAGLIC]	2 8.03 0.0033 10.24 0.0000 9.77 0.0000 10.62 0.0000 9.37 0.0001 8.79 0.0006 7.55 0.0038 9.59 0.0000 3.79 0.8199 DAGLIC	
199	6 [DAGLIC]	3 9.42 0.0003 11.46 0.0000 11.23 0.0000 9.68 0.0000 9.98 0.0000 11.20 0.0000 12.89 0.0000 8.06 0.0031 6.04 0.0796	
200	7 [DAGLIC]	3 5.04 0.3246 10.01 0.0000 4.42 0.4213 6.99 0.0242 5.05 0.4082 6.03 0.0485 8.21 0.0012 6.80 0.0265 5.44 0.1948 AKKARAMAN, HASAK, MERINOS	
201	8 [DAGLIC]	3 8.16 0.0025 12.98 0.0000 12.26 0.0000 12.86 0.0000 9.92 0.0000 12.84 0.0000 11.37 0.0000 11.44 0.0000 5.53 0.1706	
202	9 [DAGLIC]	3 6.83 0.0231 7.89 0.0025 9.15 0.0002 7.33 0.0126 10.25 0.0000 9.61 0.0000 10.78 0.0000 10.72 0.0000 5.12 0.2927 DAGLIC	
203	10 [DAGLIC]	3 4.54 0.5247 4.29 0.3649 4.93 0.2460 4.58 0.5453 7.55 0.0077 6.84 0.0159 4.55 0.2194 10.65 0.0000 4.60 0.4953 AKKARAMAN, ASB, HASAK, HASMER, KM, DAGLIC	
204	11 [DAGLIC]	3 4.83 0.4070 8.48 0.0012 9.27 0.0001 10.47 0.0000 7.85 0.0038 10.00 0.0000 7.41 0.0049 14.30 0.0000 4.81 0.4037 AKKARAMAN, DAGLIC	
205	12 [DAGLIC]	3 5.41 0.2025 9.52 0.0001 9.31 0.0001 12.41 0.0000 12.93 0.0000 6.03 0.0480 8.88 0.0004 8.62 0.0010 4.24 0.6544 AKKARAMAN, DAGLIC	
206	14 [DAGLIC]	3 5.60 0.1563 10.73 0.0000 8.68 0.0006 9.06 0.0004 7.38 0.0105 9.58 0.0000 10.19 0.0000 12.50 0.0000 4.38 0.5885 DAGLIC	
207	15 [DAGLIC]	3 4.58 0.5082 4.84 0.1729 6.41 0.0379 6.94 0.0268 9.55 0.0000 4.73 0.2247 9.77 0.0001 11.37 0.0000 4.33 0.6135 AKKARAMAN, AA, DAGLIC	
208	16 [DAGLIC]	2 7.56 0.0080 9.47 0.0001 7.91 0.0032 9.94 0.0000 9.08 0.0004 7.51 0.0061 8.83 0.0005 4.83 0.3668 3.99 0.7533 KIVIRCIK, DAGLIC	
209	17 [DAGLIC]	3 4.70 0.4550 10.68 0.0000 5.68 0.0963 8.58 0.0014 6.15 0.0804 6.54 0.0253 6.89 0.0116 9.08 0.0003 3.75 0.8342 AKKARAMAN, DAGLIC	
210	18 [DAGLIC]	3 4.39 0.5942 10.86 0.0000 7.66 0.0046 10.08 0.0000 7.03 0.0184 8.56 0.0013 7.02 0.0100 12.94 0.0000 3.85 0.8062 AKKARAMAN, DAGLIC	
211	19 [DAGLIC]	3 4.04 0.7332 10.75 0.0000 6.33 0.0423 7.72 0.0073 6.48 0.0476 6.13 0.0429 8.11 0.0015 9.80 0.0000 3.56 0.8889 AKKARAMAN, DAGLIC	
212	20 [DAGLIC]	3 7.88 0.0047 10.69 0.0000 10.95 0.0000 10.16 0.0000 8.70 0.0009 10.00 0.0000 10.52 0.0000 10.24 0.0000 6.21 0.0629	
213	21 [DAGLIC]	3 5.24 0.2501 9.91 0.0000 6.12 0.0547 8.38 0.0022 7.62 0.0065 5.98 0.0510 7.53 0.0039 8.26 0.0020 3.71 0.8464 AKKARAMAN, DAGLIC	
214	22 [DAGLIC]	3 6.28 0.0570 7.00 0.0083 10.74 0.0000 8.41 0.0021 9.50 0.0001 8.60 0.0011 8.77 0.0006 8.43 0.0015 5.50 0.1774	
215	23 [DAGLIC]	3 4.36 0.6021 9.12 0.0003 5.43 0.1297 7.56 0.0087 5.76 0.1499 5.85 0.0622 8.45 0.0009 5.30 0.2201 4.12 0.7075 AKKARAMAN, KIVIRCIK, DAGLIC	
216	25 [DAGLIC]	3 3.91 0.7879 8.35 0.0013 5.85 0.0776 6.54 0.0465 5.94 0.1128 5.79 0.0675 6.25 0.0292 10.60 0.0000 3.46 0.9152 AKKARAMAN, DAGLIC	
217	26 [DAGLIC]	3 3.60 0.8989 10.93 0.0000 5.98 0.0659 7.77 0.0067 6.20 0.0735 5.14 0.1503 8.16 0.0014 8.00 0.0035 3.90 0.7856 AKKARAMAN, DAGLIC	
218	27 [DAGLIC]	3 6.38 0.0470 11.46 0.0000 10.17 0.0000 9.89 0.0000 7.69 0.0044 11.46 0.0000 11.17 0.0000 4.61 0.4936 DAGLIC	
219	28 [DAGLIC]	3 4.46 0.5594 9.13 0.0003 8.31 0.0015 10.67 0.0000 9.84 0.0000 5.18 0.1419 11.46 0.0000 9.72 0.0000 4.09 0.7151 AKKARAMAN, DAGLIC	
220	29 [DAGLIC]	3 6.49 0.0405 7.38 0.0048 8.02 0.0023 7.42 0.0108 8.28 0.0020 9.46 0.0001 12.65 0.0000 9.16 0.0003 5.09 0.3049 DAGLIC	
221	30 [DAGLIC]	3 4.20 0.6748 10.16 0.0000 8.41 0.0012 7.98 0.0043 6.87 0.0245 7.89 0.0035 8.27 0.0012 10.76 0.0000 3.15 0.9699 AKKARAMAN, DAGLIC	

EK-3 (Devam)

222 31 [DAGLIC] 3| 7.55 0.0082| 12.54 0.0000| 9.12 0.0002| 12.11 0.0000| 8.30 0.0019| 12.54 0.0000| 9.04 0.0003| 10.06 0.0000| 5.67 0.1400|
223 32 [DAGLIC] 3| 7.43 0.0095| 8.73 0.0008| 7.98 0.0027| 8.84 0.0005| 7.58 0.0068| 8.81 0.0006| 6.06 0.0403| 13.32 0.0000| 5.20 0.2690|DAGLIC
224 33 [DAGLIC] 3| 4.20 0.6748| 7.84 0.0027| 6.25 0.0468| 7.25 0.0148| 5.98 0.1074| 6.20 0.0394| 6.58 0.0190| 8.85 0.0004| 3.44 0.9211|AKKARAMAN, DAGLIC
225 34 [DAGLIC] 3| 4.35 0.6081| 9.51 0.0001| 6.30 0.0435| 6.81 0.0317| 8.01 0.0031| 7.43 0.0069| 7.88 0.0024| 7.32 0.0108| 3.54 0.8960|AKKARAMAN, DAGLIC
226 35 [DAGLIC] 3| 4.35 0.6076| 10.38 0.0000| 6.71 0.0233| 7.58 0.0087| 8.56 0.0010| 6.70 0.0197| 6.09 0.0385| 8.10 0.0028| 3.25 0.9539|AKKARAMAN, DAGLIC
COMPUTATION TERMINATED. Date: 14.09.2004 Time: 23:22:22.

EK-4

Populasyonların Çalışılan Lokuslara Göre Bulunan Allel Frekansları ve Özgün Alleller
OarFCB20 Lokusuna Ait Allel Frekansları

(N)	AKKARAMAN	ASB	HASAK	HASMER	MERINOS	AA	KM	KIVIRCIK	DAGLIC
90	0.0179	0.0000	0.0000	0.0172	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
92	0.0714	0.0000	0.0357	0.1379	0.1667	0.0769	0.0000	0.1042	0.0000
94	0.2679	0.0357	0.2143	0.0862	0.1167	0.3077	0.3333	0.2083	0.0303
96	0.0893	0.1607	0.1250	0.1379	0.2667	0.1538	0.0833	0.0625	0.0606
98	0.1607	0.0000	0.1071	0.0000	0.0167	0.1154	0.0833	0.1042	0.3788
100	0.0893	0.4107	0.0714	0.1034	0.0500	0.0000	0.0833	0.0625	0.0758
102	0.0000	0.0000	0.0536	0.0345	0.0167	0.1154	0.0000	0.0000	0.0000
104	0.0179	0.0357	0.2143	0.1724	0.0833	0.1154	0.0000	0.1042	0.0000
106	0.1071	0.2143	0.0714	0.0862	0.0333	0.0385	0.0000	0.0833	0.1515
108	0.1071	0.1071	0.0893	0.1207	0.0833	0.0769	0.1250	0.0000	0.0758
110	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172	0.0000	0.0000	0.0000	0.1458	0.0455
112	0.0357	0.0357	0.0000	0.0172	0.0167	0.0000	0.0417	0.0000	0.1212
114	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0417	0.0000
116	0.0000	0.0000	0.0000	0.0690	0.0500	0.0000	0.0000	0.0417	0.0000
118	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0417	0.0152
120	0.0179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.2500	0.0000	0.0455
122	0.0000	0.0000	0.0179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
124	0.0179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

OarJMP29 Lokusuna Ait Allel Frekansları

(N)	AKKARAMAN	ASB	HASAK	HASMER	MERINOS	AA	KM	KIVIRCIK	DAGLIC
115	0.0000	0.0000	0.0536	0.0000	0.0333	0.0000	0.0417	0.0208	0.0000
117	0.0000	0.1429	0.0179	0.1000	0.1333	0.0000	0.2500	0.0000	0.0152
119	0.0000	0.0536	0.0000	0.0500	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
121	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0167	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
125	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0208	0.0000
127	0.0000	0.0000	0.0179	0.0167	0.0000	0.0000	0.0000	0.2083	0.0000
129	0.1250	0.0000	0.0179	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0909
131	0.1250	0.0179	0.3036	0.1833	0.2500	0.4231	0.0000	0.0417	0.0606
132	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0417	0.0000
133	0.0357	0.0000	0.0179	0.0167	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
135	0.0179	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500	0.0606
137	0.2143	0.0179	0.1607	0.0500	0.1000	0.2692	0.0000	0.2500	0.2576
139	0.2143	0.1071	0.0714	0.1000	0.0833	0.0385	0.1250	0.0417	0.1970
141	0.1071	0.0179	0.2857	0.2333	0.0667	0.1154	0.2917	0.0000	0.0455
142	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0208	0.0152
143	0.0179	0.1429	0.0000	0.0667	0.0333	0.0769	0.2083	0.0000	0.0303
144	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0208	0.0303
145	0.0000	0.1786	0.0000	0.0167	0.0500	0.0000	0.0000	0.0208	0.0000
147	0.0179	0.1250	0.0179	0.0333	0.0833	0.0000	0.0417	0.0000	0.0455
149	0.0893	0.1964	0.0000	0.0000	0.0000	0.0385	0.0000	0.0000	0.0758
151	0.0357	0.0000	0.0179	0.0000	0.0000	0.0385	0.0000	0.0000	0.0000
152	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0152
156	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0208	0.0000
158	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0208	0.0000
159	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.0500	0.0000	0.0417	0.0208	0.0000
160	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0606
161	0.0000	0.0000	0.0179	0.0167	0.0167	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

OarJMP58 Lokusuna Ait Allel Frekansları

(N)	AKKARAMAN	ASB	HASAK	HASMER	MERINOS	AA	KM	KIVIRCIK	DAGLIC
138	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4773	0.0000
142	0.1071	0.0000	0.0357	0.0500	0.1833	0.0385	0.1250	0.0682	0.0690
144	0.4643	0.1250	0.4107	0.5000	0.2167	0.3462	0.5000	0.0000	0.4138
146	0.0179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0167	0.0769	0.0000	0.0000	0.0000
148	0.0000	0.0357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172
150	0.0714	0.0000	0.0000	0.0333	0.0333	0.0000	0.0000	0.0000	0.1034
152	0.0000	0.0179	0.0357	0.0167	0.0167	0.0000	0.1250	0.0227	0.0000
154	0.0714	0.1786	0.0179	0.0333	0.0000	0.1154	0.0000	0.0000	0.0000
156	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0455	0.0345
158	0.0536	0.0000	0.0536	0.0500	0.1500	0.0000	0.0000	0.1591	0.0345
160	0.0714	0.2321	0.1607	0.1833	0.2667	0.1154	0.1250	0.1136	0.0517
162	0.0357	0.1964	0.0536	0.0167	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000	0.1034
164	0.0536	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0385	0.0000	0.0682	0.1034
166	0.0179	0.0179	0.0357	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0227	0.0000
168	0.0357	0.1964	0.1964	0.1000	0.0000	0.2692	0.0833	0.0227	0.0690
170	0.0000	0.0000	0.0000	0.0167	0.0333	0.0000	0.0417	0.0000	0.0000

NOT: Bold yazı ile belirtilen rakamlar özgün allelleri ifade etmektedir.

EK-5**Mikrosatellitlerin 2'şerli Kullanılmasıyla Hesaplanan DA Değerleri****Tablo Ek 4.1 OarFCB20-OarJMP29 lokusları kullanılarak hesaplan DA Değerleri**

	AKK	ASB	HSK	HSM	KMER	AA	KCBM	KIV	DAG
AKK	0	0.368	0.176	0.283	0.240	0.190	0.381	0.269	0.301
ASB		0	0.453	0.297	0.322	0.517	0.407	0.550	0.371
HSK			0	0.186	0.194	0.122	0.414	0.316	0.367
HSM				0	0.103	0.269	0.375	0.329	0.385
KMER					0	0.254	0.331	0.368	0.444
AA						0	0.496	0.465	0.418
KCBM							0	0.384	0.376
KIV								0	0.406
DAG									0

Tablo Ek 4.2 OarFCB20-OarJMP58 lokusları kullanılarak hesaplan DA Değerleri

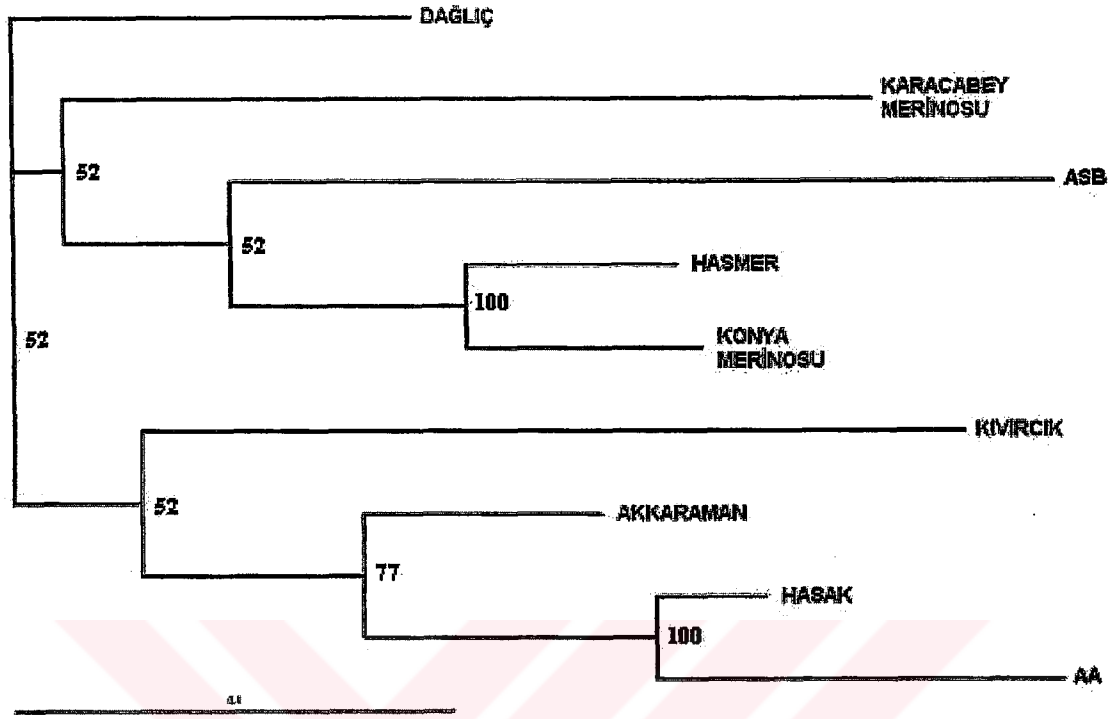
	AKK	ASB	HSK	HSM	KMER	AA	KCBM	KIV	DAG
AKK	0	0.302	0.149	0.166	0.179	0.179	0.223	0.265	0.327
ASB		0	0.232	0.244	0.384	0.373	0.420	0.454	0.431
HSK			0	0.111	0.207	0.122	0.248	0.301	0.402
HSM				0	0.119	0.199	0.294	0.319	0.514
KMER					0	0.312	0.282	0.289	0.528
AA						0	0.308	0.335	0.419
KCBM							0	0.393	0.473
KIV								0	0.495
DAG									0

Tablo Ek 4.3 OarJMP29-OarJMP58 lokusları kullanılarak hesaplan DA Değerleri

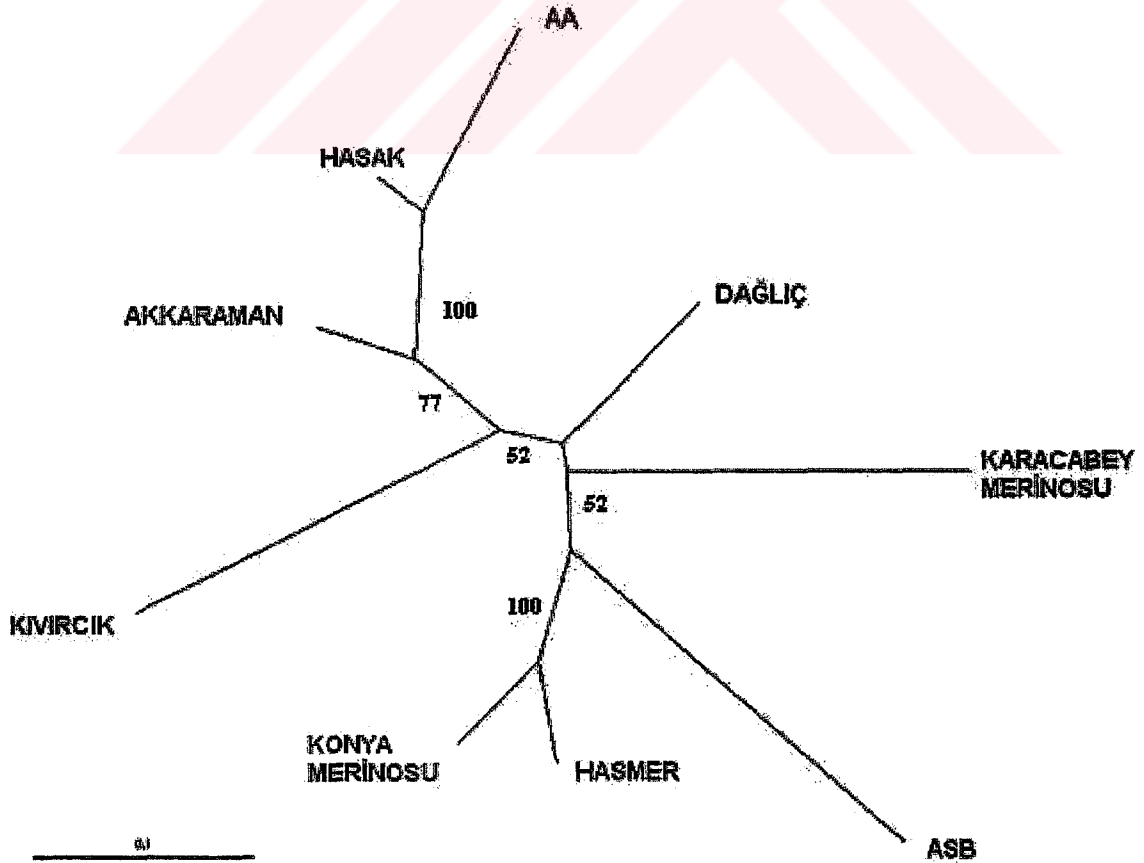
	AKK	ASB	HSK	HSM	KMER	AA	KCBM	KIV	DAG
AKK	0	0.399	0.179	0.215	0.256	0.184	0.412	0.300	0.432
ASB		0	0.395	0.304	0.379	0.399	0.391	0.545	0.447
HSK			0	0.138	0.219	0.174	0.310	0.404	0.415
HSM				0	0.140	0.238	0.187	0.398	0.414
KMER					0	0.373	0.302	0.408	0.495
AA						0	0.433	0.516	0.392
KCBM							0	0.381	0.446
KIV								0	0.528
DAG									0

EK-6

Mikrosatellitlerin 2'serli Kullanılarak Komşu Birleştirme Metoduyla Çizilen Ağaçlar

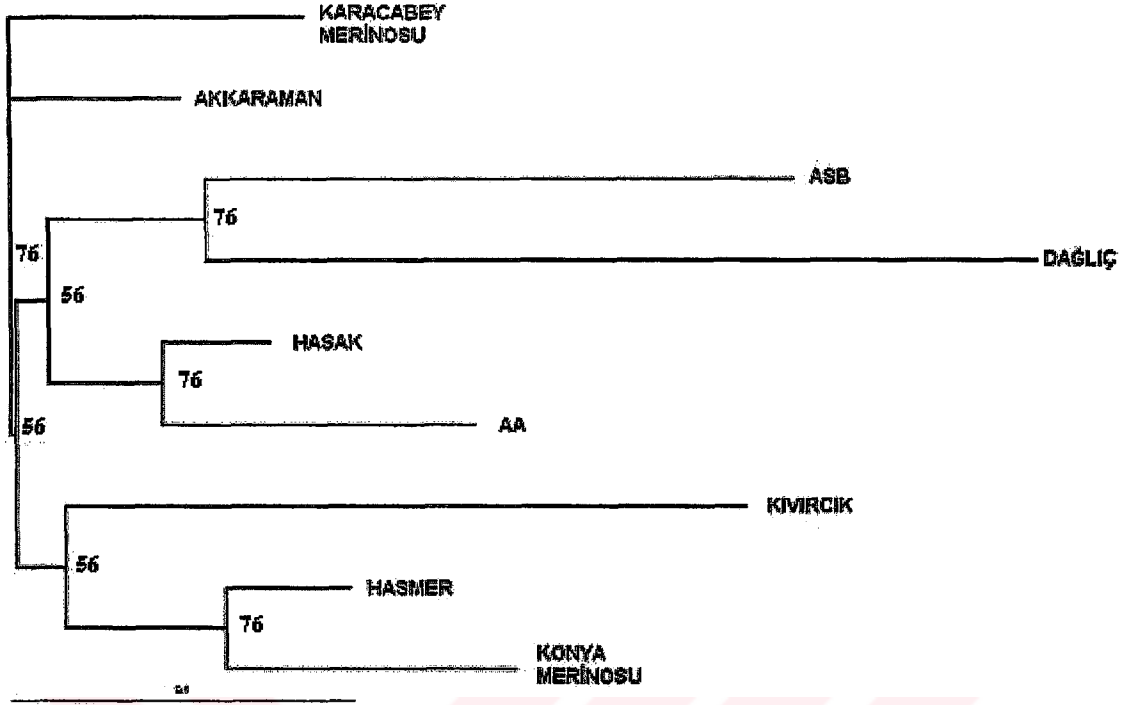


Şekil Ek 6.1.a OarFCB20-OarJMP29 Lokusları Kullanılarak Çizilen Ağaç

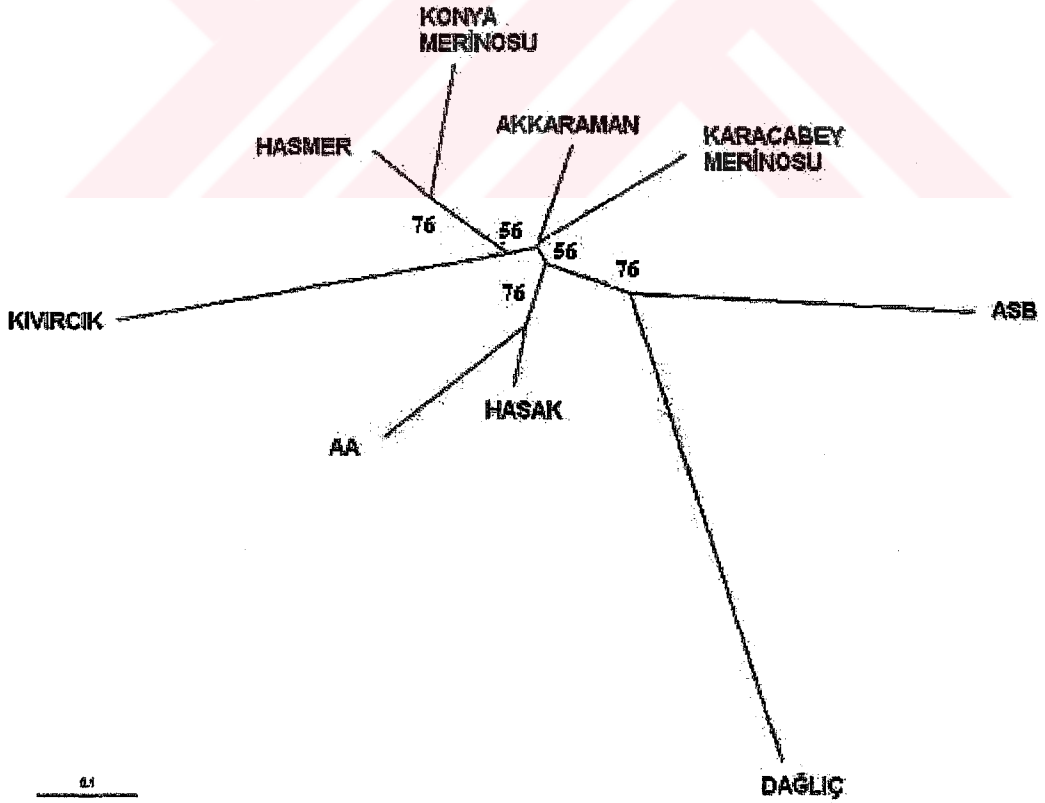


Şekil Ek 6.1.b OarFCB20-OarJMP29 Lokusları Kullanılarak Çizilen Ağaç

EK-6 (Devam)

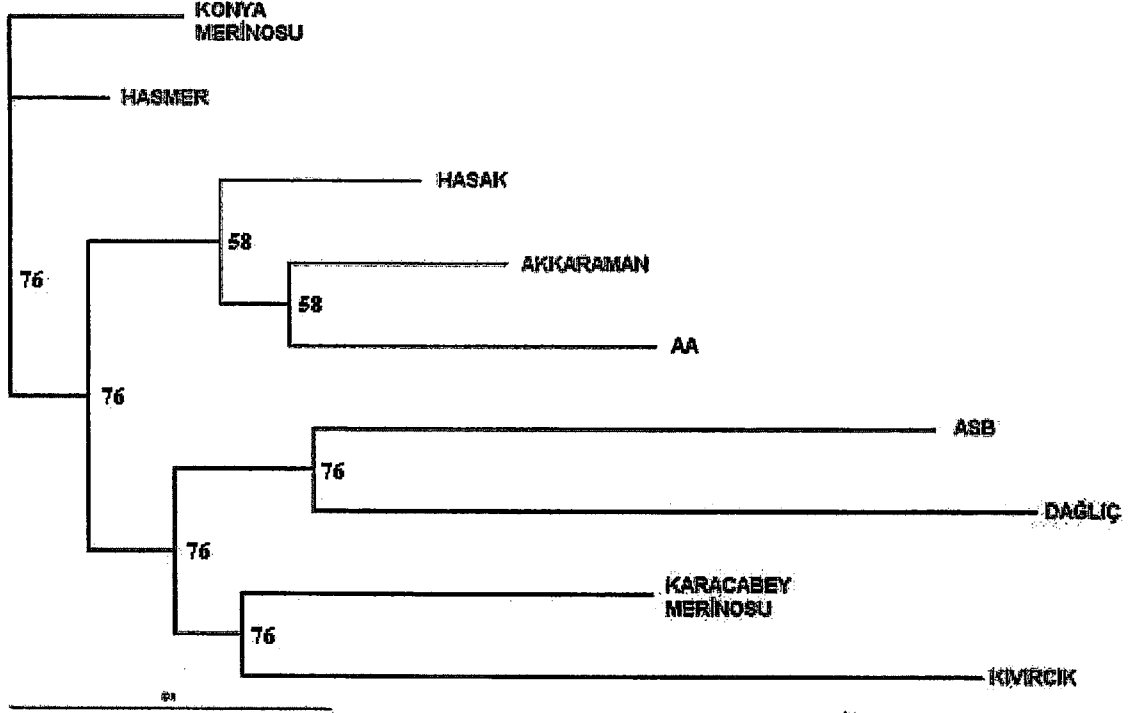


Şekil Ek 6.2.a OarFCB20-OarJMP58 Lokusları Kullanılarak Çizilen Ağaç

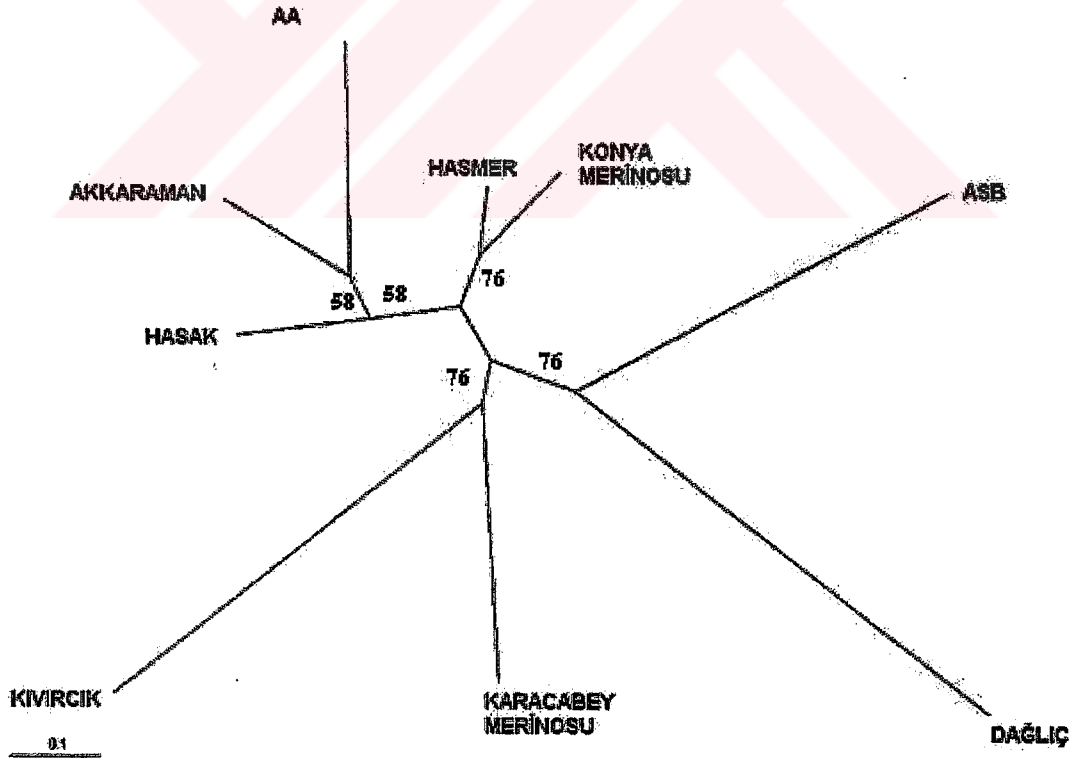


Şekil Ek 6.2.b OarFCB20-OarJMP58 Lokusları Kullanılarak Çizilen Ağaç

EK-6 (Devam)



Şekil Ek 6.3.a OarJMP29-OarJMP58 Lokusları Kullanılarak Çizilen Ağaç



Şekil Ek 6.3.b OarJMP29-OarJMP58 Lokusları Kullanılarak Çizilen Ağaç