

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
2012-YL-037**

**ÇİNE ÇAPARI VE KARYA KOYUNLARDA
CALPASTATİN GEN POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Nezih ATA

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. İbrahim CEMAL**

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Zootečni Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Nezih ATA tarafından hazırlanan “Çine Çaparı ve Karya Koyunlarda Calpastatin Gen Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi” başlıklı tez, 04.09.2012 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Orhan KARACA	ADÜ	
Üye : Doç. Dr. İbrahim CEMAL	ADÜ	
Üye : Yrd.Doç.Dr. Zeynel DALKILIÇ	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla / /2012 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

04.09.2012

Nezih ATA

ÖZET

ÇİNE ÇAPARI VE KARYA KOYUNLARDA CALPASTATİN GEN POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Nezih ATA

Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim CEMAL

2012, 64 sayfa

Bu çalışma yerli Çine Çaparı koyun ırkı ile sentetik Karya koyunlarında Calpastatin gen polimorfizminin tanımlanması amacıyla yapılmıştır. Calpastatinler calpainlerin endojen inhibitörleridir. Kesim sonrasında etin sertliğinin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynayan Calpastatin geni aynı zamanda kas gelişimini etkileyen aday genlerdendir. Calpastatin geni koyun genomunda 5. kromozomda bulunmaktadır.

Batı Anadolu’da yetiştiriciliği yapılan 97 baş Çine Çaparı ve 90 baş Karya koyundan rastlantısal olarak kan örneği alınmıştır. Intron L’den I’ya kadar olan bölümdeki koyun Calpastatin geni 565 bp’lik fragman oluşturacak şekilde PCR ile çoğaltılmıştır. Ardından, PCR ürünleri *MspI* restriksiyon enzimi ile kesilmiş, kesilen ürünler agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuş ve UV altında fotoğraflanmıştır. PCR ürünlerinin *MspI* enzimi ile kesimi sonucunda 306 ve 259 bp’lik fragmanlar oluşmuştur. Bireylerin genotiplerine ait bilgiler PopGene32 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Karya koyunlarda MM, MN ve NN genotiplerinin frekansları sırası ile 0.296, 0.496 ve 0.208 olarak, M ve N allellerinin frekansları sırası ile 0.544 ve 0.456 olarak belirlenmiştir. Çine Çaparı koyunlarda ise MM, MN ve NN genotiplerinin frekansları sırası ile 0.543, 0.388 ve 0.069, M ve N allellerinin frekansları sırası ile 0.737 ve 0.263 olarak bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Koyun, Çine Çaparı, Karya, Calpastatin, PCR-RFLP

ABSTRACT**DETECTING CALPASTATIN GENE POLYMORPHISM WITH PCR-RFLP METHOD IN ÇİNE ÇAPARI AND KARYA SHEEP**

Nezih ATA

M.Sc. Thesis, Department of Animal Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İbrahim CEMAL

2012, 64 pages

This study was carried out to determine Calpastatin gene polymorphism in native Çine Çaparı and synthetic Karya sheep. Calpastatin is an endogenous inhibitor of calpain. Calpastatin gene has a key role on meat tenderness after slaughter, and also has been known as candidate gene in muscle growth efficiency. Calpastatin gene located on 5th chromosome of sheep.

Randomly taken blood samples were collected from 97 Çine Çaparı and 90 Karya sheep raised in West Anatolia. Intron I from L domain of the ovine calpastatin gene was amplified by PCR to produce a 565 bp fragment. Then, PCR products were digested with restriction endonucleases enzyme MspI. Digested products were electrophoresed on agarose gel and visualized with gel documentation system. The MspI digestion of the PCR products produced fragments of 306 and 259 bp. Data analysis was done using PopGen32 software. In Karya sheep population MM, MN and NN genotype were identified with 0.296, 0.496 and 0.208 frequencies, M and N allele frequencies were identified with 0.544 and 0.456 respectively. In Çine Çaparı sheep population MM, MN and NN genotype were identified with 0.543, 0.388 and 0.069 frequencies, M and N allele frequencies were identified with 0.737 and 0.263, respectively.

Key words: Sheep, Çine Çaparı, Karya, Calpastatin, PCR-RFLP

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğretim dönemim boyunca her konuda bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, birçok güncel yöntemlere ve çalışmalara yönelik bilgi dağarcığının genişlemesine büyük katkı sağlayan, ne konuda olursa olsun her zaman büyük yardımını ve desteğini gördüğüm tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. İbrahim CEMAL'e,

Yaptığı çalışmalar ve projeler ile Üniversitemizde Bölümümüze kazandırdığı, toplanan örneklerin anlamlı hale gelebilmesi için gereken, laboratuvar koşullarını ve ortamını sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Orhan KARACA'ya,

Yaptığım çalışmaların paralelinde tezimin şekillenmesinde büyük emekleri olan değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Zeynel DALKILIÇ'a

Tez yazımı ve laboratuvar çalışmalarıyla birlikte bütün Yüksek Lisans döneminde yanımda bulunan ve her zaman sonsuz yardımını gördüğüm, devamında da doktora öğretim hayatım boyunca yanımda olacak olan değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Onur YILMAZ'a

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunar,

Laboratuvar çalışmaları boyunca sürekli yanımda olup eksiklikleri her zaman tamamlayıp yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Orhan KARACA hocamın değerli Yüksek Lisans öğrencisi Zir. Müh. Semih SEVİM'e

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK KURUL KARARI	v
ÖZET.....	vii
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Türkiye'de Koyun Varlığı ve Et Üretimi	4
2.2. Koyunlarda Et Verimi ve Kalite Özelliklerinin Genetiği ve Islahı	6
2.2.1. Koyunlarda Et Verimi ve Kalite Özelliklerinin Genetiği.....	6
2.2.2. Et Verimi ve Kalitesi ile ilgili Bazı Büyük Etkili Genler.....	8
2.2.2.1. Callipyge (CLPG) Geni.....	8
2.2.2.2. Rib-Eye Muscling (REM) - CARWELL.....	10
2.2.2.3. Çift Kas Geni (Double Muscle)	11
2.2.2.4. Leptin Geni.....	13
2.2.2.5. Calpastatin Geni	13
2.2.2.6. Calpastatin gen polimorfizmini belirlemek için PCR-RFLP yöntemi ile yapılmış çalışmalar	15
2.2.3. Koyunlarda Et Verimi ve Kalite Özelliklerinin Islahı.....	17
2.2.3.1. Klasik Islah Programlarına Dayalı Seleksiyon.....	17
2.2.3.2. Markör veya Gen Destekli Seleksiyon.....	20
2.4. Et Sertliğine Etki Eden Etmenler	21
2.5. Çine Çaparı ve Karya Koyun Genotipleri ve Yapılan Çalışmalar	21
2.5.1. Yerli Gen Kaynağı Çine Çaparı Koyunu	21
2.5.2. Çine Çaparı Koyun Irkına Yönelik Moleküler Genetik Araştırmalar	23
2.5.3. Karya Koyunu	24
2.5.4. Karya Koyununa Yönelik Moleküler Genetik Araştırmalar	25
2.6. Çalışma ile İlgili Moleküler Genetik Teknikler	26
2.6.1. DNA İzolasyonu.....	26
2.6.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	26
2.6.3. Restiriksiyon Endonükleazlar	27

2.6.4. RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)	27
2.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Hayvan Materyali.....	29
3.2. Metot.....	29
3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası	29
3.2.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	30
3.2.3. PCR ile DNA Çoğaltımı	31
3.2.4. RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)	33
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.2.6. Calpastatin Genotiplerine Yönelik Değerlendirmeler.....	36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	37
4.1. Calpastatin Genotiplerine İlişkin Gözlemler.....	37
4.2. Calpastatin Geni Bakımından Gen ve Genotip Frekansları	38
5. SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR	53

KISALTMALAR

GCAA : Günlük canlı ağırlık artışı

ADÜ-ÇÇKP: Adnan Menderes Üniversitesi- Çine Çaparı Koyunu Koruma Programı

ADÜ-GKYP: Adnan Menderes Üniversitesi-Grup Koyun Yetiştirme Programı

MAS : Marker Assisted Selection (İşaretli Destekli Seleksiyon)

TBE : Tris-Borate-EDTA

CAST : Calpastatin

QTL : Quantitative Trait Loci(Kantitatif Karakter Lokusu)

QTN : Quantitative Trait Nucleotide (Kantitatif Karakter Nükleotidi)

DNA : DeoxyriboNucleic Acid

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

bç : Baz çifti

RE : Restriction Endonuclease (Restiriksiyon Endonükleaz)

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Kısıtlanmış ParçaUzunluk Polimorfizmi)

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism (Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)

EA : Erdoğan AKTÜRK (Çine Çaparı Yetiştiricisi)

MV : Mustafa VURAL (Çine Çaparı Yetiştiricisi)

SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Farklılığı)

AB : Avrupa Birliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Callipyge fenotipi gösteren kuzular, solda ki iki kuzu normal fenotip gösteren, sağdaki iki kuzu callipyge fenotipi gösteren kuzular	8
Şekil 2. Double Muscle fenotipi gösteren koyunlar; solda Belçika'da yetiştiriciliği yapılan Texel, sağda Fransa'da yetiştiriciliği yapılan Lacaune koyunu	12
Şekil 3. Calpastatin geninin yapısı	14
Şekil 4. Çine Çaparı koç ve koyun	22
Şekil 5. Çine Çaparı Koyun popülasyonunun mevcut durumu	23
Şekil 6. Karya koç ve koyununa ait fotoğraflar	25
Şekil 7. DNA bant büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA boy markörü	35
Şekil 8. UV ışığının altında safe view ile boyanmış agaroz jelin görüntüsü	36
Şekil 9. Çalışma için kullanılan koyunlardan bazılarının jelde oluşan CAST geni M ve N allelleri bakımından genotiplere ait görüntü	37
Şekil 10. Karya ve Çine Çaparı koyunlara ait genel popülasyonunda CAST genotiplerinin oransal dağılımı	39
Şekil 11. Karya koyunu popülasyonunda CAST genotiplerinin oransal dağılımı	40
Şekil 12. Çine Çaparı popülasyonunda CAST genotiplerinin oransal dağılımı	41
Şekil 13. Çine Çaparı ve Karya koyunu için farklı sürü veya illerden alınan örnekler bakımından gözlenen allel frekanslarının dağılımı	45
Şekil 14. Sürüler arasındaki genetik uzaklığa göre çizilmiş dendogram	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Türkiye'de Yıllara Göre Koyun Varlığı	4
Çizelge 2. Türkiye'de yıllara göre kesinlen hayvan sayıları ve üretilen koyun eti miktarı	6
Çizelge 3. Koyun eti üretim miktarları ve 2010-2012 arası değişim miktarları.....	6
Çizelge 4. Callipyge fenotipin ortaya çıkışı.....	10
Çizelge 5. Geleneksel Texel ve Double muscle yaşıyan Texel hatlarının karşılaştırılması.	12
Çizelge 6. Çine Çaparı ve Karya koyunlarına ait kan örneklerinin, sürülere göre dağılımı	30
Çizelge 7. PCR karışımına katılan bileşenlerin hacim ve son konsantrasyonları	32
Çizelge 8. Genotiplerin belirlenmesinde kullanılan primerler ve baz dizilimleri.	32
Çizelge 9. Primerlere özgün DNA bölgelerinin çoğaltılabilmesi için gerekli olan ısı döngüleyici cihaz programı.....	33
Çizelge 10. Calpastatin geninin allellerinin ayrımı için uygulanan restiriksiyon işleminin bileşenleri	34
Çizelge 11. Oluşan tek nokta mutasyonları.....	34
Çizelge 12. Calpastatin gen dizilimindeki tek nokta mutasyonu (üstte) ve normal dizilim (altta).....	38
Çizelge 13. Çine Çaparı ve Karya koyunlarda CAST geni bakımından genotiplerin sayısal dağılımı ve gözlenen genotip frekansları	39
Çizelge 14. Farklı yerlerden kan örnekleri toplanan Karya Koyunlarında CAST geni bakımından genotiplerin dağılımı ve gözlenen genotip frekansları.	40
Çizelge 15. Yetiştirici elinde ve ADÜ-ÇÇKP kapsamında korunmakta olan Çine Çaparı Koyunlarında CAST geni bakımından genotiplerin dağılımı ve gözlenen genotip frekansları.	41
Çizelge 16. Karya koyununda CAST geni bakımından gen ve beklenen genotip frekansları	42

Çizelge 17. Çine Çaparı ırkına yönelik CAST bakımından gen ve beklenen genotip frekansları	43
Çizelge 18. Karya ve Çine Çaparı koyunlarında genotipteki bütün bireyler dahil edildiğinde CAST geni bakımından gen ve beklenen genotip frekansları.....	43
Çizelge 19. Çine Çaparı ve Karya koyunu için örnekleme yapılan sürü veya lokasyonlar bakımından yapılan değerlendirme ile elde edilen allel frekansları	44
Çizelge 20. CAST geni bakımından koyun genotiplere ait gözlenen ve beklenen sayılar ile ki-kare (χ^2) analiz sonuçları.....	46
Çizelge 21. Sürüler arası genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri	47
Çizelge 22. Bazı koyun popülasyonlarında CAST genine ait allel frekansları.....	48

1. GİRİŞ

Çiftlik hayvanlarında kantitatif karakter veya özellik olarak tanımlanan verim özellikleri veya fizyolojik özellikler genomda yer alan ve sayısı net olarak bilinmeyen çok sayıda genin toplamı etkilerine ve bu genler arası etkileşimlere göre şekillenmektedir. Kantitatif karakterlere yönelik fenotipin şekillenmesinde görevli tüm genlerin tek tek etkilerini şu an için tanımlamak mümkün olmadığı için klasik Mendel genetiği yöntemlerini kullanarak bu genleri tek tek inceleyebilmek ve ıslah etkinliklerini tamamen bu bilgilere dayalı yürütmek günümüzde olanaklı değildir.

Kantitatif özelliklere ait fenotipleri şekillendiren genlerin sayısına ve bireysel özelliklerine ilişkin bilgilerin oldukça sınırlı düzeyde olmasından dolayı teorik çalışmalar kimi varsayımlara dayanmaktadır. Temel varsayıma göre kantitatif bir karakteri, tüm lokuslarda frekansları benzer, eklemeli etkileri ve dominans ilişkileri hemen hemen aynı olan çok sayıda gen etkilemektedir (Falconer ve Mackay, 1996; Roberts ve Smith, 1982). Bu tür karakterlere etkili genlerin sayısı ve etki düzeylerinin bilinmesinin olanaksızlığı kantitatif teorinin özgün yapısıyla ortaya çıkmasının temel nedenidir. Diğer bir ifadeyle, kantitatif karakterlerin kalıtımı poligenik modele dayanmaktadır (Kinghorn vd., 1994). Kantitatif karakterlerin kalıtımı, etkili genlerin etkileri toplamı ile açıklanmaktadır.

Kantitatif karakterler, özellikle de eşikli karakterler, çevre etmenlerinden çok daha yüksek derecede etkilenmektedirler (Cemal, 1996; Karaca vd., 1992). Dolayısıyla genetik varyasyon genel varyasyon içinde ancak çok küçük değerler olarak tanımlanabilmekte ve buna bağlı olarak damızlık seçiminde duyarlılık düşük düzeyde olmaktadır. Bunun sonucu olarak, verim özelliklerinin ıslahında klasik ıslah yöntemleri ile sağlanan yıllık genetik ilerleme oranı ancak %1-3 kadar olabilmektedir (Smith, 1985).

Çiftlik hayvanlarında verimlerin geliştirilmesi anlamında yapılan ıslah çalışmalarında genlerin toplamı etkilerinin fenotipe dayalı tahminini esas alan programlar bir önceki yüzyılda geliştirilerek kullanılmıştır. Bunun sonucunda, uzun vadeli çalışmalar ile yüksek verimli ırk, soy ve hatlar elde edilmiştir.

DNA'nın çift sarmal yapısının keşfinden sonra moleküler genetik alanında çok hızlı bir gelişme süreci yaşanmıştır. Özellikle son yıllarda DNA düzeyindeki

tanımlamalara yönelik yöntemlerde baş döndürücü hızda gelişmeler yaşanmaktadır. DNA düzeyinde yapılan tanımlamalardan elde edilen bilgiler ile hayvanlara ait fenotipik verilerin ilişkilendirilmesi sonucunda hayvanlara ait verim veya elde edilen ürünlerin kalitesi üzerine etkili olan, özellikle etki düzeyleri diğerlerine oranla kısmen veya çok büyük olan, bazı genlerin tanımlanması ve pratik genotip ayrımlarının yapılabilmesi mümkün olmuştur. Kantitatif karakter lokuslarının (QTL: Quantitative Trait Loci), major gen olarak adlandırılan kısmen daha büyük etkili kantitatif karakter lokuslarının, genomda yer alan verim ve kalite artışıyla bağlantılı bazı genom bölgelerinin veya fenotipte etkili kantitatif karakter nükleotidlerinin (QTN: Quantitative Trait Nucleotide) tanımlanmasına yönelik bu yöntemler sayesinde günümüzde genoma ait bu bilgiler fenotipe dayalı klasik ıslah programlarına monte edilerek daha isabetli damızlık değeri tahminleri yapılabilmekte ve seleksiyon çalışmalarında genetik ilerleme hızı daha yüksek seviyelere çekilebilmektedir. Çalışmalar kapsamında nihai hedef genomik seleksiyon olmasına karşın, sınırlı düzeyde sayılabilecek genom bilgilerine yönelik bir seleksiyon yaklaşımı günümüzde fenotipik seleksiyona bir alternatif oluşturamamakta ve dolayısıyla destekleyici rol üstlenmektedir. Zaman içinde genomu oluşturan genlere ait tanımlayıcı bilgiler geliştikçe ıslah çalışmaları daha hızlı genetik ilerleme olanağı sağlayacaktır.

Çiftlik hayvanı veya diğer hayvan türlerine ait genom bilgileri arttıkça bu bilgiler diğer türler için de referans oluşturmaktadır. Türlerin bazı ortak genom bölgelerine sahip olmalarından dolayı bir türde belirlenen bir gen diğer bir tür için aday gen olarak değerlendirilebilmektedir. Kimi çiftlik hayvanlarında (sığır, koyun, keçi, domuz gibi) ve farede belirlenen Calpastatin geni bu aday genlerden biridir. Farklı hayvan türleri üzerinde; Hitomi vd. (2000) farelerde, Javanmard vd. (2010) keçilerde, Choi vd. (2006) domuzlarda, Palmer vd. (1998) koyunlarda, Juszczuk-Kubiak vd. (2004) sığırlarda Calpastatin gen polimorfizmini belirleme üzerine çalışmalar yürütmüşlerdir. Calpastatinler calpainlerin endojen inhibitörleridir. Kesim sonrasında etin sertliğinin düzenlenmesinde anahtar bir rol oynayan Calpastatin geni aynı zamanda kas gelişimini etkileyen aday genlerdendir. Calpastatin geni koyun genomunda 5. kromozomda bulunmaktadır (Khederzadeh, 2011; Palmer vd., 1998).

Koyun genomunda Calpastatin genine yönelik ilk tanımlama Palmer vd. (1998) tarafından yapılmıştır. PCR-RFLP yöntemine dayalı çalışma sonucunda Dorset koyununda Calpastatin geninin iki farklı alleli (M ve N) saptanmıştır. Daha sonra

diğer koyun popölasyonlarında yapılan çalışmalarda da bu allellerin varlığı tespit edilmiş (Gábor vd., 2009; Gharahveysi vd., 2012; Khan vd., 2012; Khederzadeh, 2011; Mohammadi vd., 2008; Nanekarani vd., 2011a; Nanekarani vd., 2011b; Shahroudi vd., 2006; Suleman vd., 2012; Szkudlarek-Kowalczyk vd., 2011), hatta genin bulunduğu bölgeye yönelik DNA dizi analizi çalışmalarına ilave bazı tek nükleotid farklılıklarına (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) rastlanmıştır (Gregula-Kania ve Monika, 2011). Ancak, bugüne kadar ölkemizdeki koyun ırklarında bu gene yönelik bir tanımlama bilgisine literatürde rastlanmamıştır.

Bu alışma, yerli gen kaynağı olarak korunan ine aparı koyun ırkı ile Batı Anadolu'da yetiştiriciliği gittikçe yaygınlaşan Karya koyunlarında Calpastatin gen polimorfizminin DNA düzeyinde PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması amacıyla yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Türkiye'de Koyun Varlığı ve Et Üretimi

Hayvansal üretim, çıktıları açısından insanların protein kaynaklarını karşılamasında önemli bir üretim dalıdır. Hayvansal ürünler içinde et ve et ürünleri bu ihtiyacı karşılayanın yanında istihdam sağlama, ekonomik büyüme ve kalkınma açısından önem taşımaktadır.

Türkiye'de besi hayvancılığı, hayvan sayısı açısından incelendiğinde küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin ilk sırayı aldığı görülmektedir. Küçükbaş hayvan türleri arasında koyun yetiştiriciliği hayvansal üretimin en yoğun faaliyet alanını oluşturmaktadır. Ancak, 1991 yılında 40.4 milyon baş olan koyun sayısı 2010 yılında %53.6 oranında azalarak 21.75 milyon başa gerilemiştir (Özer, 2011). Yine TÜİK (Çizelge 1) verilerine bakıldığında, 2011 yılında gerileyen koyun sayısı bir önceki yıla göre %8.4 artarak 25.031.565 başa yükselmiştir (Anonim, 2011). Yıllara göre Türkiye'de ki koyun sayıları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1.Türkiye'de Yıllara Göre Koyun Varlığı

Yıl	Koyun sayısı (baş)	Yıl	Koyun sayısı (baş)
1991	40.432.340	2002	25.173.706
1992	39.415.938	2003	25.431.539
1993	37.541.000	2004	25.201.155
1994	35.646.000	2005	25.304.325
1995	33.791.000	2006	25.616.912
1996	33.072.000	2007	25.462.293
1997	30.238.000	2008	23.974.591
1998	29.435.000	2009	21.749.508
1999	30.256.000	2010	23.089.691
2000	28.492.000	2011	25.031.565
2001	26.972.000		

Not: 2011 Yılı bilgileri geçicidir. TÜİK, 2011

Türkiye'de et üretiminin yaklaşık %55'ini tavuk eti oluşturmaktadır. Geriye kalan %45'lik üretimin ise yaklaşık %76'sı sığırdan, %24'ü de koyun, keçi, manda ve diğer hayvan türlerinden sağlanmaktadır.

Koyunculukta gelirlerin büyük bölümü et veriminden sağlanmaktadır. Özellikle entansif tarımın uygulandığı ülke ve bölgelerde koyunlardan birim zamanda üretilen döl ve buna bağlı olarak da et veriminin ve kalitenin artırılması temel hedef haline gelmiştir. Bu nedenle, entansif tarımın yaygınlaştığı yörelerimizde yerli ırklarımız ve geleneksel üretim sistemlerimiz ile koyunculuğun karlı olarak yapılması güç bir durum haline gelmiştir. Kısaca, gerek entansif tarımın yaygınlaştığı yörelerde koyunun diğer hayvan türleriyle rekabet gücünü, gerek diğer bölgelerimizdeki koyun yetiştiricilerinin gelirlerini arttırmak için yerli ırklarımızın etçilik özelliklerinin ıslahı gerekmektedir.

Türkiye’de kırmızı et üretiminde, büyükbaş ve küçükbaş hayvan yetiştiriciliği önemli bir yere sahiptir. Sığırın Dünya ve Avrupa Birliği (AB) et üretimindeki payı sırasıyla % 22.8 ve % 18.7 olarak hesaplanabilmektedir. Koyun-keçinin Dünya ve AB et üretimindeki payı ise yine aynı sıra ile % 5 ve % 2.5’tir. Bu değerlerden dünya et üretiminde domuz, tavuk ve sığırın önemli bir yer aldığı, koyun, keçi ve mandanın katkılarının sınırlı olduğu anlaşılmaktadır (Anonim, 2012a).

Koyun varlığı ve bu varlığa bağlı koyun eti üretimi ve değişimleri ile ilgili güncel rakamlara Türkiye İstatistik Kurumu’ndan ulaştığımızda; yıllara göre koyun varlığı Çizelge 1, kesilen hayvan sayısı ve et üretim miktarları Çizelge 2, koyun et üretim miktarı ve değişim oranları da Çizelge 3’teki gibi olmaktadır (Anonim, 2011).

Çizelge 2. Türkiye’de yıllara göre kesilen hayvan sayıları ve üretilen koyun eti miktarı

	Kesilen hayvan sayısı (baş)	Et üretim miktarı (ton)		Kesilen hayvan sayısı (baş)	Et üretim miktarı (ton)
1991	7 926 513	128 626	2002	3 935 393	75 828
1992	7 478 617	122 887	2003	3 554 078	63 006
1993	6 868 528	112 806	2004	3 933 973	69 715
1994	7 650 160	126 306	2005	4 145 343	73 743
1995	5 493 520	102 115	2006	4 763 394	81 899
1996	5 536 300	98 127	2007	6 428 866	117 524
1997	6 488 056	116 104	2008	5 588 906	96 738
1998	7 899 041	144 703	2009	3 997 348	74 633
1999	7 104 853	132 476	2010	6 873 626	135 687
2000	6 110 853	111 139	2011	5 479 546	107 076
2001	4 747 268	85 661			

Not: 2010 yılından itibaren kırmızı et üretimi mezbahane ve mezbahane dışı kesimleri kapsamaktadır.

Çizelge 3. Koyun eti üretim miktarları ve 2010-2012 arası değişim miktarları

	Yıl	I.Dönem	II.Dönem	III.Dönem	IV.Dönem	Toplam
Miktar (Ton)	2010	27 306	26 042	28 940	53 400	135 687
	2011	19 856	23 959	23 491	39 770	107 076
	2012	17 330	19 969	-	-	-
Bir önceki döneme göre değişim (%)	2010		-4,6	11,1	84,5	-
	2011	-62,8	20,7	-2,0	69,3	-
	2012	-56,4	15,2	-	-	-
Bir önceki yılın aynı dönemine göre değişim (%)	2011	-27,3	-8,0	-18,8	-25,5	-
	2012	-12,7	-16,7	-	-	-

Not: Tablodaki rakamlar yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

2.2. Koyunlarda Et Verimi ve Kalite Özelliklerinin Genetiği ve Islahı

2.2.1. Koyunlarda Et Verimi ve Kalite Özelliklerinin Genetiği

Zirai üretim içinde ana kollardan biri olan hayvancılık, bölgenin ekonomik şartlarına ve işletmenin durumuna göre yön alır. Hayvancılıkta önemli olan hayvan sayısını artırmak değil, hayvan başına düşen verim ve kaliteyi yükseltmektir. Et hayvancılığı için gerekli şartları her yerde bulmak zordur. Et randımanı üzerinden fiyat biçmek yerine, etin gerçek kalitesini bilerek ve bunu bilimsel yollarla tespit ederek ürünün ücretinin belirlenmesi yüksek kalitede et üretimini teşvik edecektir.

Bunun farkına varılmasından sonra sadece et üretimi değil, et kalitesi üzerinde de önemle durulmakta ve et kalitesi ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanarak hızla ilerlemektedir.

Karşılaştırmalı koşullarda et verimi bakımından koçların damızlık değerinin tahmini için, bireysel verim kontrollerinden faydalanılmalıdır. Bu amaçla her generasyon elde edilen bireylerin ıslahı istenen karakter bakımından değerleri saptanır ve en üstün değer gösterenler seçilir. Bu arada sürü mevcudunun muhafazası ve üzerinde durulan özellik sayısı mutlaka dikkate alınmalıdır. Özelliklerin kalıtım derecesi yüksek olmalıdır.

Et kalite özelliklerinin belirlenebilmesi için hayvanların kesilmesi gerekmektedir. Kesilen hayvanlardan alınan değerler yaşayan akrabaları (damızlık değer tahmini) için kullanılmaktadır. Son yıllarda hayvanların et ile ilgili kimi genetik parametrelerini tahminleyebilmek için kesmek yerine ultrason ölçümü ile bazı çalışmalar yapılmaktadır. Damızlık koçlar canlıyken karkas değerlendirmesi, deri üzerinden sırt yağı ve kas derinliğini ölçmek suretiyle objektif olarak veya damızlık adayı koçun kardeşlerinin kesim sonuçlarıyla koçun karkas ve et-yağ kalitesi hakkında tahminde bulunma suretiyle yapılabilir. Daha güvenli tahmin için döllere ait karkas ve et kalitesi de tayin edilir.

Fogarty (1995) koyun ürünleri kriterleri için genetik parametreleri 4 grupta toplamıştır. Bunlar canlı ağırlık, yapağı ağırlığı, vücut kompozisyonu ve üremedir. Bu kriterler kalıtım derecesi, tekrarlanma derecesi, genetik ve fenotipik korelasyonlardan tahmin edilebilir. İlk dönem canlı ağırlıklarında özellikle ananın ve çevrenin ortak etkisi, toplam genetik varyans üzerinde önemli etkiye sahiptir. Ancak ananın etkisi yaş ilerledikçe ortadan kalkar.

Bennet (1990) karkas kompozisyonu ile yağ kompozisyonu arasında yüksek bir genetik korelasyon olduğunu bildirmiştir. Bu özellik seleksiyon kriteri olarak kullanılabilir, ölçülmesi kolaydır ve toplam vücut kompozisyonu hakkında fikir verir. Vücut kompozisyonu bakımından genetik varyasyonun detaylı analizinde yemden yararlanma ve enerji dengesi de analiz edilmeye başlanmıştır.

Greeff vd. (2008) Merinos koçlarında karkas ve et kalitesi için genetik parametreleri incelemişlerdir. Sıcak karkas, yağ ve kas kompozisyonuna et kalitesi ile etin pH değeri ve et rengi gibi değerleri irdeleyip kalıtım derecelerini

hesaplamışlardır. Canlı ağırlık üzerine analık etkisinin yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yağ ve göz kası derinliğini ultrason cihazı ile ölçüp aldıkları değerleri karkas ölçüleri ile karşılaştırdıklarında, aralarında yüksek bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. pH değerinin kas yüzdesi ile yüksek oranda pozitif, yağ kompozisyonu ile negatif bir korelasyon içinde olduğunu gözlemlemişlerdir.

2.2.2. Et Verimi ve Kalitesi ile ilgili Bazı Büyük Etkili Genler

2.2.2.1. Callipyge (CLPG) Geni

ABD'deki geleneksel, etnik tüketicilerin bir kısmı dışında kuzu eti tüketicileri pirzola ve bel kası büyük, yağ, kolesterol düzeyi düşük olan karkasları tercih etmektedirler (Shelley vd., 1970). 1983 yılında Moffat ticari Dorset sürüsünde doğan koç kuzuların özellikle arka çeyreklerinde kas hipertrofisi gösterdikleri bildirilmiştir. Sonraları koçların aynı fenotipten yavrular ürettiği ortaya çıkmıştır. Bu kuzular normal kuzulara göre bel bölgesinde yüksek düzeyde kaslanma ve karkasta düşük yağlanma göstermişlerdir. Cockett vd. (1994), bu özellik için Utah State Üniversitesinde bir mutant gen belirlemişlerdir. Bu özellik Callipyge olarak adlandırılmış (cally: güzel, pyge: but) ve bu gen: "CLPG" ile gösterilmeye başlanmıştır(Cockett vd., 1994). Callipyge geninde hipertrofik gelişme söz konusudur. Hipertrofi; doğumdan sonra kas liflerindeki artış sonucu meydana gelmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Callipyge fenotipi gösteren kuzular, solda ki iki kuzu normal fenotip gösteren, sağdaki iki kuzu callipyge fenotipi gösteren kuzular

1983'te anormal olarak büyük miktarda kaslanma gösteren bir Dorset koç Oklahomadaki bir sürüde belirlenmiştir. Koçun bu kas büyümesini bazı

yavrularına geçirdiği ve bunlardan da daha sonraki generasyonlara da geçtiği gözlemlenmiştir (Thomas, 1994). Bu gözlemler bu özelliğin genetik orjinli olduğunu desteklemiştir.

Callipyge genini taşıyan (expressed) kuzularda yüksek kaslanma yüzdesi, yüksek yemden yararlanma ve bel gözü kası alanında artma görülmektedir (Jackson vd., 1997). Hipertrofi sadece üç haftalık yaştan sonra ortaya çıkmaktadır (Koohmaraie vd., 1995). Kuzuların ağırlıkları 20-25 kg olunca genin etkisi fenotipik olarak gözlemlenmektedir. Bu nedenle Callipyge geni doğum güçlüğüne arttırıcı bir risk yaratmamaktadır. Kuzularda Callipyge geninin bulunması yemden yararlanmayı geliştirmekte ve normal kuzularla karşılaştırıldığında yem tüketimleri daha düşük olmaktadır (Jackson vd., 1997).

Bu büyük etikli genin kalıtımı otosomal dominant model yerine polar overdominans (Kutupsal üstün dominans) modele uygun bir kalıtım göstermektedir. Yapılan bir çalışmada Callipyge fenotipi gösteren koçların erkek torunları ve normal dişiler arasında yapılan kontrollü çiftleştirmeler sonucunda 209 normal 203 Callipyge geni taşıyan toplam 412 kuzu üretilmiştir. Bununla birlikte Callipyge allellerini taşıyan koyunlar (CLPG/clpg) ile normal koçların (clpg/clpg) çiftleştirilmesi durumunda Callipyge fenotipine sahip yavrular üretilmez. Dolayısıyla bu durum otosomal dominant modele uygun değildir (Cockett vd., 1994).

Normal fenotipe sahip yavrular clpg / clpg genotipindeki baba ve CLPG / clpg genotipindeki anaların çiftleştirilmesinden elde edilmektedir. Analardan kalıtsal olarak dominant CLPG alleli gelen yavruarda Callipyge fenotipi gözlemlenmez (clpg pat / CLPG mat vs). Bu durumun tersinde yani; dominant callipyge alleleline sahip babalar ile resesif callipyge alleleline sahip anaların çiftleştirilmesi sonucu doğan yavrular callipyge fenotipi gösterirler (Cockett vd., 1996).

Otozomal dominant modelde, iki heterozigot ebeveynin çiftleştirilmesi sonucu %75 Callipyge, %25 normal genotipe sahip yavrular üretilcektir. Ancak Callipyge mutasyonu otozomal dominant modele uymadığı için heterozigot bireylerin çiftleştirilmesi sonucunda %25 callipyge, %75 normal yavru elde edilecektir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada heterozigot bireyler çiftleştirilmiş ve %22 Callipyge %78 normal yavru elde edilmiştir. Sonuçta Callipyge fenotipi sadece babadan dominant CLPG ve anadan resesif clpg allellerinin bulunması

durumunda ortaya çıkmaktadır. Bu durum polar overdominance (kutupsal üstün dominans) olarak bilinmektedir (Cockett vd., 1996).

Çizelge 4. Callipyge fenotipin ortaya çıkışı

	♂ CLPG	♂ clpg
CLPG ♀	CLPGpat/CLPGmat %25 (Normal)	CLPGpat/clpgmat %25 (Normal)
clpg ♀	CLPGpat/ clpgmat %25 (Callipyge)	clpg pat / clpg mat %25 (Normal)

Karkasta butlar daha yüksek bir pazar değerine sahip olduğundan arka bacaklarda meydana gelen yüksek düzeyde kaslanma ekonomik avantaj sağlamaktadır. Omuz karkas ağırlığı içerisindeki düşük yüzde göstermektedir. Bu nedenle but daha fazla tercih edilmekte, bu da Callipyge geni taşıyan kuzuların pazardaki üstünlüğünü göstermektedir. Tüketiciler açısından etin yumuşaklığı, sululuğu ve tadı ilk sırada gelmektedir. Callipyge taşıyan hayvanlar diğerlerine göre daha etkin bir şekilde büyümekte, yüksek ağırlıklardaki karkaslara sahip olmakta ve et verimleri yüksek olmaktadır. Bütün bu özellikler Callipyge'in olumlu özellikleri arasında sayılmaktadır.

Callipyge fenotipine sahip hayvanların etleri normal etlerle karşılaştırıldığında daha serttir ve normal olanlara göre iki kat daha zor kesilir. Araştırmacılar Callipyge'in bu özelliğini ortadan kaldırmak için çalışmalar yapmaktadır. Callipyge geni, etin sertliği gibi fiziksel özellikleri üzerine olumsuz etkilerde bulunmaktadır.

2.2.2.2. Rib-Eye Muscling (REM) - CARWELL

Carwell geni bir şekilde Callipyge geni ile benzerlik gösterir. Callipyge geni ile aynı genomik bölge de (18. Kromozomun distal ucunda) haritalanmış olup daha çok göz kası üzerinde kaslanma etkisi vardır (McLaren vd., 2001; Nicoll vd., 1998). Yine de genel fenotipik etkiler Callipyge geni ile aynı değildir. Carwell geni daha çok göz kasında ki kaslanmadan sorumludur

Carwell geni ilk olarak 1980'lerin sonunda Avustralya Poll Dorset koyununda alışılmadık bir göz kası ölçümü sonucunda tespit edilmiştir (Banks, 1997). Callipyge geninin tersine Carwell geni sadece göz kasındaki kaslanmayla sınırlıdır, yağ derinliği, canlı ağırlık veya but ağırlığı gibi koşullardan sorumlu

değildir (McEwan vd., 1998). Carwell göz kası ağırlığını ve alanını yaklaşık olarak %7 – 11 oranında artırmaktadır (McEwan vd., 2000). Calpastatin geni gibi et sertliği üzerinde ya da kas içindeki yağ dağılımında herhangi bir etkide bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda bilinmeyen bir modifiye lokusun muhtemel epistatik etkisi ile Carwell'in kalıtımı baba etkili görülmektedir (Nicolli vd., 1998).

2.2.2.3. Çift Kas Geni (Double Muscle)

Ekstremler kas hipertrofisi birçok türde gözlenmiştir. Sığırdaki bu durum çift kaslılık (double muscling) olarak adlandırılmıştır. Çift kaslılık yüksek kas oranı, yüksek bir kas:kemik oranı ve düşük yağ oranı ile kendini göstermektedir. Bu kondisyona sahip hayvanların vücudundaki tüm kaslar büyümekte ve normal hayvanlarla karşılaştırıldığında karkas randımanı yüksek olmaktadır (Breg ve Butterfield, 1985).

Çift kas genine sahip sığırlar çok sayıda kas hücresine sahiptirler (Kambadur vd., 1997). Diğer normal sığırlara göre çok yüksek kapasitede protein sentezine sahiptirler (Bjercke vd., 1984). TGF- β superfamily üyelerinden olup büyüme faktörü 8 (GDF-8) olarak bilinip miyostatin olarak adlandırılan gen, ilk olarak çift kas fenotipi gösteren hayvanlarda tanımlanmıştır (Kambadur vd., 1997; McPherron vd., 1997; McPherron ve Lee, 1997). Monogenik olarak kalıtılan bu fenotipe sahip hayvanlarda Double Muscle geninin sığır 2. kromozomunun sentromerik ucunda olduğu saptanmıştır (Grobet vd., 1997). Bu genin fenotipik olarak gözlenmesi, proteinin karboksi-terminal kodlayan bölümde 11 bp'lik bir bölgenin silinmesi (delesyon) sonucu oluşmaktadır (Grobet vd., 1997; Kambadur vd., 1997). Bir diğer yandan daha sonra yapılan çalışmalarda aynı zamanda G→A dönüşmesi şeklinde olan tek nokta mutasyonu sonucu çift kaslılık fenotipinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Kambadur vd., 1997; McPherron ve Lee, 1997). Belirlenen bu değişimler ilk olarak; delesyonla oluşan mutasyon Çift Kaslı Belçika Mavisini sığırlarında, tek nokta mutasyonu ise Çift Kaslı Piedmontese sığırlarında tespit edilmiştir.

Sığırlarda bu gen yağsız et oranında %25 civarında bir artış sağlarken bazı zararlı etkileri de beraberinde getirmektedir. Çift kaslı buzağı taşıyan ineklerde doğum ağırlığı erkekler için %16,5 ve dişiler için %25,4 artmakta ve bu durum doğal buzağılamayı zorlaştırmaktadır (Hanset, 1991). Bu sebepten dolayı çoğu zaman

doğumlarda sezaryen uygulaması mecburi olmakta ve sonucunda ek bir masraf gerekliliğini ortaya koymaktadır.

İlk defa 80' li yıllarda Belçika' da Valon bölgesi sponsorluğunda bir araştırma yapılmıştır. Liège genetik üniversitesine bağlı veteriner fakültesinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Texel DM ve normal Texel hatları karşılaştırılmıştır. Araştırma ilk bilimsel çalışma olarak kabul edilir.

Et kalitesi ile yüksek karkas özellikleri Texel DM'in ana çekiciliği olarak kabul edilir. Liège Üniversitesi veteriner fakültesinde ki çiftlikte 121 ve 28 etli (DM) Texel koç üzerinde yapılan çalışma da sonuçlar (ortalama ve standart sapma)) aşağıda verilmiştir (Anonim, 2012d).

Çizelge 5. Geleneksel Texel ve Double muscle yaşıyan Texel hatlarının karşılaştırılması.

	Geleneksel Texel	Texel DM
Final Ağırlık	47,2 (5,2)	47,7 (3,2)
Karkas ağırlığı	23,6 (3,2)	24,9 (2,4)
Karkas Randımanı (%)	49,9 (2,8)	52,3 (2,8)
Deri	6,4 (1,0)	5,8 (0,9)
İç organlar	9,9 (1,7)	9,9 (1,0)



Şekil 2. Double Muscle fenotipi gösteren koyunlar; solda Belçika'da yetiştiriciliği yapılan Texel (Beltex), sağda Fransa'da yetiştiriciliği yapılan Lacauze koyunu

Double muscle geni taşıyan hayvanlarda oluşabilecek sorunlar, dişilerde döl veriminin azalmasına, üst solunum yolu hastalıklarına karşı duyarlılığın artmasına ve doğum güçlüğüne neden olmaktadır. Sığır ve koyunda çift kaslılık geninin negatif özelliklerine rağmen etin pazarlama kısmında getirdiği olumlu etkilerinden dolayı Avrupa'daki koyun üreticileri bu fenotipi seçmektedirler.

2.2.2.4. Leptin Geni

Leptin geni; hayvanların büyüme ve enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir anahtar rol oynayan büyük etkili bir gendir. 16 kilo dalton (kDa) ağırlığında olan ve 146 amino asit içeren leptin geni, 21 sinyal peptidin bölünmesi sonrasında ilk olarak adipoz dokudan salgılanmakta ve sonra kan dolaşımına karışmaktadır (Barb ve Kraeling, 2004; Zhang vd., 1994; Hashemi, vd., 2011). Leptin geni, sığırlarda 4. Kromozomda, insanlarda 7. kromozomda bulunmaktadır (Barendse vd., 1994; Stone vd., 1996).

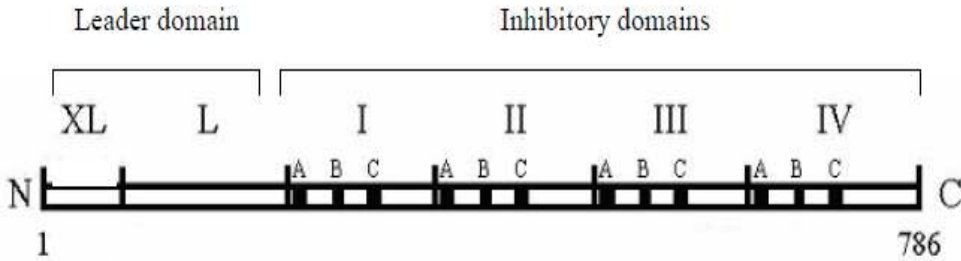
Yapılan çalışmalar Leptin geninin, sığırların yem alımının ve enerji metabolizmasının düzenlenmesinde, büyüme, vücut ağırlığı, canlı ağırlık, döl verimi üzerinde, hastalıklara karşı direnç mekanizmasında önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır (Barb, 1999; Campfield vd., 1995; Fruhbeck vd., 1998; Houseknecht ve Portocarrero, 1998; Leifers vd., 2005; Macajova vd., 2004).

Hashemi vd., (2010) yaptıkları çalışmada, 130 Makoi koyununda PCR-SSCP yöntemi ile genotipleme yapmışlardır. Çalışma sonucunda AB, BB, AC, BC ve CC genotip frekanslarını sırası ile, 0.17, 0.09, 0.14, 0.37 ve 0.23 olarak belirlemişlerdir. A, B ve C için allel frekanslarını sırası ile 0.15, 0.37 ve 0.48 olarak belirlemişlerdir.

2.2.2.5. Calpastatin Geni

Calpastatin geni koyunlarda 5. kromozomda sığırlarda 7. kromozomda yer aldığı belirlenmiştir (Khederzadeh, 2011; Palmer vd., 2000). Calpastatin geni protein düzeyinde sığır genomunda irdelenmiştir. Molekül ağırlığı yaklaşık 76 kDa olarak belirlenen calpastatin, beş ana alandan oluşmaktadır (Killefer ve Koohmaraie, 1994). Üzerinde bulunan 5 alandan N-terminal leader (L) olarak adlandırılan alanın, calpainleri baskılama üzerinde herhangi bir rol oynamadığı gözlemlenmiştir (Emori vd., 1987). Bu alanın hücre içinde yerleşeceği bölgeyi belirlemede rol oynayabileceği düşünülmektedir (Averna vd., 2001). Geri kalan

dört alan ise oldukça homolog ve calpainleri baskılama eğilimde bulunmuştur (Cong vd., 1998; Emori vd., 1987). Bu alanların içinde A, B ve C olmak üzere üç adet oldukça yüksek seviyede korunan bölge olduğu belirlenmiştir. Bu bölgelerden A ve C Ca^{+2} iyonları ile calpaine sıkıca bağlıdır fakat herhangi bir calpain baskılama etkinliği söz konusu değildir. Fakat B bölgesi calpain enzimlerini baskılamaktadır (Tomba vd., 2002).



Şekil 3. Calpastatin geninin yapısı

Fizyolojik seviyede incelendiğinde Calpastatin geni, calpainlerin endojen inhibitörleridir. Page vd. (2002) yaptıkları bir çalışmada calpainin kesim sonrasında ölüm sertliği oluşurken etin sertlik derecesinde, miyofibrillar proteinleri yıkıma uğratarak öncül rol oynadığını göstermişlerdir. Özellikle et verim özellikli çiftlik hayvanları üzerine çalışan birçok araştırmacı, Calpastatinin etin sertliğindeki fizyolojik rolünü Calpastatin geni ile birlikte irdemişlerdir (Boehm vd., 1998; Huff-Lonergan vd., 1996; Killefer ve Koohmaraie, 1994; Lonergan vd., 1995). Calpastatin seviyeleri arasındaki farklılık üzerine; türler arasında Koohmaraie vd. (1991), ırklar arasında Shackelford vd. (1994) ve Shackelford vd. (1995), kaslar üzerinde Geesink ve Koohmaraie (1999) çalışmışlardır. Goll vd. (1998) yaptıkları bir çalışmada çiftlik hayvanlarında Calpastatin aktivitesi ve kas özellikleri üzerine ayrıntılı bir makale yayınlamışlardır. Ouali ve Talmant (1990) birlikte yaptıkları çalışmada, sığır, koyun ve domuzda kesim sonrasında ki 24 saatte geçen süre içerisindeki calpastatin aktivitesinin yüksek oranda etin sertliğini etkilediğini bulmuşlardır.

2.2.2.6. Calpastatin gen polimorfizmini belirlemek için PCR-RFLP yöntemi ile yapılmış çalışmalar

Koyun genomunda, nükleotid dizilimi çıkarılarak restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerini belirleyip, genotipleri rutin bir şekilde belirlememizi sağlayan literatürde geçen ilk çalışma Palmer vd. (1998) tarafından yapılmıştır. Çalışmada 6 baş Dorset Down koyunun nükleotid dizilimleri çıkarılıp, bu bölgelere özgü primerler dizayn edip, *MspI* ve *NcoI* restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerini belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda etin sertliği üzerine etkili calpastatin geninin iki farklı alleli (M ve N) saptanmıştır. Devamında birçok araştırmacı, kendi bölgelerinde yetiştirilen koyunlarda genotipleme çalışması yapmıştır.

Shahroudi vd. (2006), yaptıkları çalışmada 100 baş saf yetiştirilmiş Karagül koyunundan aldıkları kan örneklerinden izole ettikleri DNA'ları PCR-RFLP işlemine tabi tutmuşlardır. *MspI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu elde ettikleri allel frekanslarını M ve N için sırası ile 0.79 ve 0.21 olarak bulmuşlardır. Genotiplerin popülasyonda görülme frekanslarını MM, MN ve NN için sırası ile 0.61, 0.36 ve 0.03 olarak belirlemişlerdir.

Mohammadi vd. (2008) yaptıkları bir çalışmada; farklı yetiştirme bölgelerinde bulunan 111 baş Arap koyunundan aldıkları kanlarda PCR-RFLP yöntemi ile calpastatin gen polimorfizminin varlığına bakılmıştır. Restriksiyon endonükleaz enzimi olarak *MspI* enzimini kullanmışlardır. Bireylerde genotipleme yaparken A ve B olmak üzere isimlendirdikleri iki allel belirlemişlerdir. AA, AB ve BB genotiplerinin popülasyonda bulunma frekanslarını; sırası ile %70,27, %28,82 ve %0,9 olarak belirlemişlerdir. A ve B allellerinin bulunma frekanslarını ise 0,85 ve 0,15 olarak tespit etmişlerdir.

Gábor vd. (2009), yaptıkları çalışmada; Slovakya'da Tsigai, Doğu Friz, Lacaune ve Lacaune x Tsigai melezi koyunlar üzerinde Calpastatin gen polimorfizmine bakmışlardır. Çalışmada popülasyonu temsil etmesi amaçlanan toplam 96 baş koyun kullanılmıştır. Kısıtlanmış parça uzunluklarına bakabilmek için, PCR ürünlerinin kesiminde *MspI* restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Kesim sonrası 3 genotipin (MM, MN ve NN) bulunma frekansları; sırası ile 0.87, 0.13, 0 olarak tespit edilmiştir. Burada NN genotipi gözlenmemiştir.

Khederzadeh (2011) tarafından İran'ın Gholistan bölgesinde yetiştirilen 120 baş Dalagh koyunundan aldıkları DNA örneklerinde yapılan çalışmada kesim için *MspI* enzimi kullanılmıştır. Örnekleme yapılan Dalagh koyunu popülasyonunda PCR ile çoğaltılmış bölgelerin enzim ile kesimi sonucunda; MM, MN ve NN genotiplerinin bulunma frekanslarını sırası ile 0.66, 0.29 ve 0.05 olarak bulunmuştur. M ve N allellerinin bulunma frekansları sırası ile 0.80 ve 0.20 olarak bulunmuşlardır. Yaptıkları ki-kare testinde popülasyon Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur.

Nanekarani vd. (2011a) yaptıkları bir çalışmada, İran'nın Loristan bölgesindeki 100 baş Lori koyun kanından DNA örnekleme yapmışlardır. *MspI* restiriksiyon enzimi ile kesime bıraktıkları PCR ürünlerinden genotipleme sonucunda AA, BB ve AB genotipleri için frekansları sırası ile 0.41, 0.13 ve 0.46 olarak bulunmuşlardır. A ve B allellerinin bulunma frekanslarını 0.64 ve 0.36 olarak saptamışlardır.

Nanekarani vd. (2011b) yaptıkları başka bir çalışmada, İran'nın Gholistan bölgesindeki doğu ve batı bölgelerinde bulunan 120 baş Atabi koyununu örnek popülasyonu temsil etmesi için belirlemişlerdir. Toplanan kanlardan izole edilen DNA'ları PCR metodu ile çoğaltıp, *MspI* enzimi ile kesime bırakmışlardır. Pop Gene yazılımı ile analizlerin yapıldığı çalışmada; AA, AB ve BB genotiplerinin görülme frekanslarını sırası ile 0.68, 0.27 ve 0.05 olarak belirlemişlerdir. A ve B olarak isimlendirdikleri calpastatin allellerinin bulunma frekanslarını sırası ile 0.81 ve 0.19 olarak belirlemişlerdir.

Khan vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada, Pakistan'ın Islamabad bölgesinde 300 baş Balkhi ve 300 baş Kajli koyunlarından olmak üzere toplam 600 baş koyundan alınan kan örneklerinde PCR ile çoğalttıkları bölgelerde genotipleme yapabilmek için *MspI* restiriksiyon enzimini kullanmışlardır. Calpastatin gen polimorfizmi varlığında canlı ağırlık artışındaki değişimlerin önemlilik derecelerini incelemişlerdir. Genotipleme sonucunda elde ettikleri değerler; Balkhi koyunlarında MM, MN ve NN genotiplerinin gözlenme frekanslarını sırası ile; 0.76, 0.24 ve 0, Kalji koyunlarında 0.74, 0.24 ve 0.2 olarak bulunmuşlardır. Genotiplerde günlük canlı ağırlık artışındaki değişimlere göre istatistiki olarak önemli farklılığın sadece MN genotipinde olduğu ve bu farklılıkların, Balkhi koyunlarında 0-8 ay arası Kalji Koyunlarında ise 0-4 ay arasında olduğu belirlenmiştir.

Suleman vd. (2012) yaptıkları çalışmada Pakistan yerli koyunlarından 100 baş Thalli, 100 baş Lohi ve 100 baş Kajli koyunlarından olmak üzere toplam 300 baş koyunda çalışma yapmışlardır. Çalışmada *MspI* restiriksiyon enzimini kullanılmıştır. Çalışma sonucunda MM, MN ve NN genotiplerinin sırası ile; Lori koyunları için 0.77, 0.20 ve 0.03 olarak, Kajli koyunlarında 0.68, 0.26 ve 0.06 olarak, Thalli koyunlarında ise %80, %20 ve %0 olarak bulmuşlardır. Ki-kare testi sonucunda bütün popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu bildirmişlerdir. Daha önceki çalışmalarla birlikte bu çalışmanın sonuçlarını da birleştirerek Pakistan'ın yerli koyunlarında MM genotipini ve M allelini dominant olarak belirlemişlerdir.

Gharahveysi vd. (2012) yaptıkları çalışmada, kan örneklerini İran'da yetiştiriciliği yapılan 100 baş Zel koyunundan almışlardır. Genotipleme yapabilmek için restiriksiyon enzimi olarak *MspI* kullanmışlardır. Çalışma sonucunda genotiplerin frekanslarının sonuçları; MM, MN ve NN için sırası ile 0.62, 0.26 ve 0.12 olarak bulunmuştur. M ve N allellerinin bulunma frekanslarını sırası ile 0.75 ve 0.25 olarak hesaplanmıştır.

Szkudlarek-Kowalczyk vd. (2011) yaptıkları çalışmada 82 baş Polish Merino koyunundan, 41 baş Berrichon du Cher koyunundan, 59 baş Mutton koyunundan ve 30 baş Ile de France koyunundan olmak üzere dört ırk üzerinde toplam 212 baş koyundan kan örnekleri toplamışlardır. PCR-RFLP metodu uyguladıkları izole edilen DNA'ları *MspI* ve *NcoI* olmak üzere iki restiriksiyon enzimi ile kesime uğratmışlardır. Genel popülasyonda *MspI* kesimi sonucu elde edilen M ve N allelleri frekansları sırası ile 0.835 ve 0.165 hesaplanırken *NcoI* enzimi ile kesim sonucunda M ve N allellerinin frekansları sırası ile 0.96 ve 0.04 olarak hesaplanmıştır.

2.2.3. Koyunlarda Et Verimi ve Kalite Özelliklerinin Islahı

2.2.3.1. Klasik Islah Programlarına Dayalı Seleksiyon

Islah kelime anlamı itibari ile düzeltme, iyileştirme anlamına gelmektedir. Ziraat üretimi alanında baktığımızda bir hayvan veya bitki türünden daha iyi verim alabilmek amacıyla yapılan işlemler silsilesini anlatmaktadır (Anonim, 2012c). İnsanlık ve toplumlar geçmişten günümüze gelen, sürekli bir şekilde hayvanlardan daha iyi yararlanabilmek amacı ile belirli girişimlerde bulunmuşlardır.

Yetiştiriciler başlarda tam olarak anlaşılamayan kalıtsallığı, zamanla üstün performanslı hayvanların sonraki nesillere, uygun çevre şartları sağlandığında, bu özelliklerini yavrularına bıraktıklarını görerek bu özelliği kullanmaya çalışarak anlamaya başlamışlardır. Bu durum kullanılarak tarihte farkında olmadan birçok ıslah çalışması yapılmıştır. Genetik yapı ve genetik yapının esasları XX. yy. başlarından sonra anlaşılabilmiştir. Hayvan ıslahı, hayvanın genetik yapısının ve çevre şartlarının iyileştirilmesi ile yapılabilen bir süreç olmaktadır. Bu cümleden çıkaracağımız anlam hayvan ıslahı genetik yapı ve çevre şartlarında meydana gelen iyileştirmelere bağlı olarak gerçekleşir.

Hayvanın genetik yapısı ve bu hayvana sağlanan çevre koşulları hayvanın verim potansiyelini etkileyen iki önemli unsurdur. Hayvanın genetik değeri ne kadar iyi olursa olsun sağlanan çevre şartları iyi değilse hayvan potansiyelinin altında bir verim sergiler. Bununla birlikte hayvana sağlanan çevre şartları ne kadar iyi olursa olsun o hayvanın genetik değeri iyi değilse veriminin çok yüksek olması beklenemez. Bu sınırlayıcı faktörler arasındaki dengeyi kurup en yüksek seviyeye çıkardığımız zaman esas amacımız olan az sayıda hayvandan minimum girdi ile en yüksek performansı alabiliriz. Bu amacı güderken yapmamız gereken, üstün performansı sergileyen hayvanların çiftleşmesine izin verip sürü ortalamasının altında kalan hayvanları sürüden uzaklaştırmaktır. Bu işleme seleksiyon denilir. Seleksiyon kelime anlamı olarak seçme anlamına gelmektedir (Anonim, 2012c). Hayvancılık için seleksiyon, en iyi performansa sahip olan hayvanların seçilmesi veya alıkonularak sahip oldukları genetik değerleri bir sonraki generasyonlara bırakmasına izin verilmesi, performansı düşük olan hayvanların sürüden uzaklaştırılarak çiftleşmelerine izin verilmemesi anlamına gelmektedir.

Araştırmacılar ve uygulayıcılar tarafından değişik şartlarda başarılı olan çeşitli seleksiyon metotları geliştirilmiştir. Seleksiyon metotları iki grupta toplanabilir. Birisi ferdin kendisinden sağlanan verilere dayanılarak yapılan seleksiyondur. Diğeri ise ferdin akrabalarından sağlanan verilere dayanılarak yapılan seleksiyondur.

Klasik ıslah programlarına seleksiyon öncelikli olarak bireysel verilere göre seleksiyon ve kan bağı olan bireyler arasında yapılan akraba verilerine göre seleksiyon olmak üzere iki ana başlık altında incelenir;

a-Bireysel Verilere Göre Seleksiyon

- i. Dış görünüşe göre seleksiyon
- ii. Bireysel verim kabiliyetine göre seleksiyon

b-Akraba Verimlerine Göre Seleksiyon

- i. Pedigriye göre seleksiyon
- ii. Familya ortalamasına göre seleksiyon
- iii. Kombine seleksiyon
- iv. Öz kardeşlere göre seleksiyon (Ful-sib-testing)
- v. Üvey kardeşlere göre seleksiyon (Half-sib-testing)
- vi. Yavru verimlerine göre seleksiyon (progeny test)

Seleksiyon iki çeşittir, bunlardan ilki doğal seleksiyon ikincisi ise bizlerin yaptığı yapay seleksiyondur. Doğal seleksiyon şartlara ve çevreye uyum sağlamış canlıların üreyebilmelerine izin veren, güçlü olan yaşar mantığı ile işleyen bir süreçtir. Yapay seleksiyon ise belirli bir verim yönünden en iyi olan hayvanların döl vermesine izin verilmesi şeklinde süren bir süreçtir. Bu iki seleksiyon çeşidi çoğu zaman birbirine zıt bir şekilde ilerleyiş gösterir. Verim yönünden genetik değerini ve bu verimi verebilmesi için çevresel koşullarını iyileştirdiğimiz bir canlı biyolojik olan sınırının üzerine çıktığı için doğa bu canlıyı ayıklama yoluna gitmektedir. Bu yüzden verim yönünden iyileştirirken insanların, bu canlılar için bir takım önlemleri de alması gerekmektedir. Seleksiyon yaparken her bir bireyin bir özellik için gösterdiği performanslar ayrı ayrı ele alınırken, aynı zamanda sahip olduğu diğer özelliklerinde performans değerlerinin bütünü ile ele alınmaktadır. Herhangi bir özellik bakımından iyi değerlere sahip olan hayvan diğer özellikler bakımından nadiren üstün olmaktadır. Bu yüzden seleksiyon yaparken, tek bir özellik bakımından değil, birçok özelliğin toplamının kombinasyonu şeklinde yapmamız gerekmektedir.

Birden fazla karakterin seleksiyonla geliştirilmesi için klasik ıslahla yapılan seleksiyon yöntemleri bulunmaktadır. Bu seleksiyon yöntemleri daha ayrıntılı incelenmesi gereken daha karışık ve daha fazla uğraş gerektiren seleksiyon modelleridir.

Bu seleksiyon yöntemlerini;

- i. Sıra ile (Tandem=Teksel) Seleksiyon
- ii. Baraj Metodu (Bağımsız Ayıklama Düzeyleri = Independent Culling Levels)
- iii. İndeks Metodu (Selection Index = Total score = Toplam Puan)
- iv. BLUP Yöntemi

Günümüzde biyoteknoloji ve moleküler biyolojinin gelişmesi ile bu seleksiyon yöntemlerine destek olup çok daha hızlı ve doğru sonuçlar alınan yöntemler geliştirilmiştir (Aksoy, 2003). Biyoteknoloji yapay tohumlama ve embriyo transferini de konu aldığı için biraz daha geniş kapsamlıdır. Moleküler biyoloji ise daha yakın bir gelecekte ortaya çıkmasına rağmen hücrelerin, kromozomların ve genlerin anlaşılması, bunların işleyiş mekanizmalarının çözülmesi üzerine çok hızlı bir gelişme göstermiştir. Bu iki genç bilim alanının hayvan ıslahında da yardımcı araçlar olarak kullanılabilecekleri anlaşıldıktan sonra çalışmalar yoğunlaşp hız kazanmıştır (Aksoy, 2003). .

2.2.3.2. Markör veya Gen Destekli Seleksiyon

Hayvancılıkta markör veya belirteç destekli seleksiyon (MAS: Marker Assisted Selection) ile son dönemlerde dile getirilen gen destekli seleksiyon (GAS: Gene Assisted Selection) hayvan genetiği ile moleküler biyoloji bilim dallarının birleşiminin bir ürünüdür. Hayvanın ortaya koyacağı fenotipi etkileyen etmenler genetik ve çevre unsurlarıdır. Kantitatif kalıtım çok sayıda genin etkisi altında olan kalıtım biçimidir. Yani bir diğer ifade ile poligenik bir kalıtım modeli teşkil etmektedir. Poligenik kalıtım, çevre etmenlerinden en üst düzeyde etkilenen bir kalıttır. Bu etkilenim yüzünden bazı verim yönlü genler çevre faktörleri yüzünden maskelenebilmektedir.

Biyoteknolojinin gelişmesi ile canlılarda verim yönünden aday genlerin bulunmasına dair pratik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler sayesinde fenotipte ileriki dönemlerde ortaya çıkan bazı verim yönlü genleri çok erken dönemde tahminleyebilmekteyiz.

Sellier (1994)'e atfen, markör destekli seleksiyon yaşa ve cinsiyete bağımlı olmaksızın yapılabilmektedir ve bu nedenle seleksiyon yoğunluğunu kantitatif yönetime göre daha etkili kullanmayı mümkün kılmaktadır. Öte yandan markör

destekli seleksiyon kantitatif genetik yöntemlerinde kullanılan bilgilere ek olarak destekleyici bilgiler sunmaktadır, bu nedenle gerçek damızlık değerin tahmin edilmesindeki performansı artırmaktadır. Bir diğer avantaj ise kuşak aralığının seleksiyon ilerlemesine olan etkisinin iyileştirilmesidir. Markör destekli seleksiyonda, hayvanla ilgili genetik bilgiler doğumla birlikte ya da çok genç yaşta elde edilebilir. Bu nedenle, hayvanın verim zamanını beklemeye gerek kalmadan gerekli seleksiyon uygulanabilir (Ün vd., 2000).

2.4. Et Sertliğine Etki Eden Etmenler

Araştırmacılar, çevresel şartların değiştirilmesi ile etin sertliğinde önemli bir değişim olacağını göstermişlerdir. Bu çalışmalara örnek verecek olursak; May vd. (1992) karkas soğutma sırasında, Nour vd. (1994) elektrik ile karkasa muamele sonucunda, Huff-Lonergan vd. (1996) kesim sonrası bekleme süresinde değişimlerle, Wulf vd. (1996) pişirme metodu ile, Swanek vd. (1999) D3 vitamini ilavesi ile ve etin sertlik derecesinde değişimlerin olduğunu ortaya koyan çalışmalar yapmışlardır. Bazı araştırmacılar ise, kesim sonrasında ölüm sertliği gerçekleşmeden önce ve sonrasında Ca^{+2} uygulaması ile etin sertliğindeki değişimleri ortaya koyan birçok çalışma gerçekleştirmiştir (Alarcon-Rojo ve Dransfield, 1989; Koohmaraie vd., 1988; Koohmaraie vd., 1989; Koohmaraie ve Shackelford, 1991; Koohmaraie vd., 1990; Morgan vd., 1991; Wheeler vd., 1991; Whipple ve Koohmaraie, 2010). Etin sertlik derecesindeki değişimler aynı zamanda genetik çeşitlilik, biyolojik ve fizyolojik farklılıklar, kesim esnasındaki biyofizyolojik değişimler ve kesim sonrası süre içinde gerçekleşen kimyasal değişimlerden ileri gelmektedir (Koohmaraie, 1996). Bu faktörlere ek olarak protein, yağ, su ve etin kollojen kompozisyonun oranları da etin sertliğini etkilemektedir (Cross vd., 1973).

2.5. Çine Çaparı ve Karya Koyun Genotipleri ve Yapılan Çalışmalar

2.5.1. Yerli Gen Kaynağı Çine Çaparı Koyunu

Çine Çaparı, Aydın iline özgü bir koyun ırkıdır. Başlıca yayılma alanı Aydın il sınırları içinde bulunan Madran Dağı ve eteklerinde bulunan Çine ve Bozdoğan ilçeleri olmuştur. Bunun yanında, Koçarlı ve Nazilli ilçelerinin kimi dağlık köylerinde de geçmişte yaygın olarak yetiştirildiği belirtilmektedir. Yağlı kuyruklu olan ırk yöre ekolojisine çok iyi uyum sağlamıştır. Mer'ada sürü idaresinin kolay,

süt veriminin yüksek, hastalıklara ve sıcağa dayanıklı olduğu yetiştiriciler tarafından ortak dile getirilen hususlardır (Karaca ve Cemal, 1998; Karaca vd., 2004; Karaca vd., 1999).

Çine Çaparı koyun ırkı yağlı kuyrukludur ancak kuyruk yapısı diğer yağlı kuyruklu koyun ırklarımızdan daha toplu ve kuyruk ucu genellikle içe kıvrıktır. Vücut beyaz, baş, bacaklar ve karın altı kahverengi-siyah-beyaz beneklidir. Erkeklerin tümü spiral boynuzlu, dişiler ise genellikle boynuzsuzdur (Şekil 4).

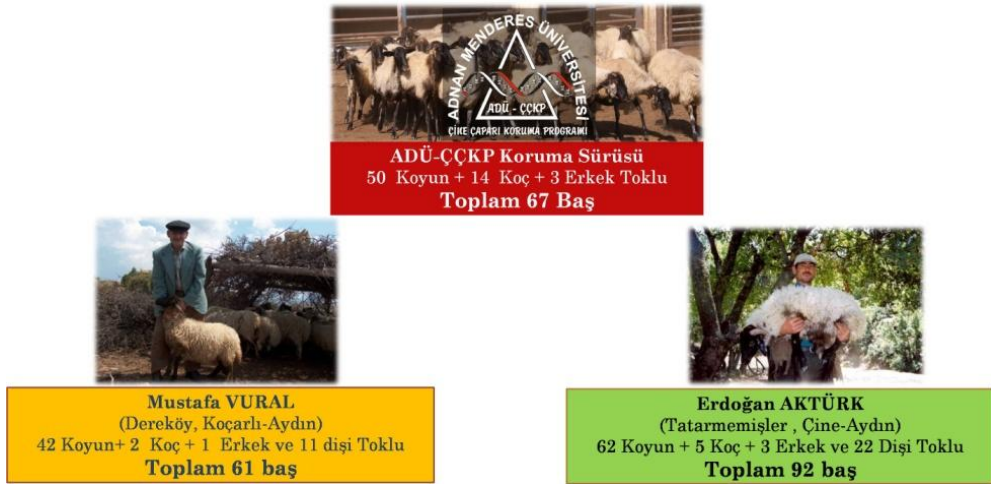


Şekil 4. Çine Çaparı koç ve koyun

Son 20 yıllık süreçte Sakız, Kıvırcık veya Sakız x Kıvırcık melezi ince kuyruklu koçlar ile yapılan sistemsiz çevirme melezlemeleri sonucu Çine Çaparı koyun ırkı ağır yok olma tehdidi altına girmiştir. Hızlı bir yok olma süreci yaşayan Çine Çaparı ırkının özelliklerinin tanımlanması ve ırkın gen kaynağı olarak korunması için 1996 yılında Adnan Menderes Üniversitesi'nde çalışmalara başlanmıştır. Devreye sokulan Adnan Menderes Üniversitesi - Çine Çaparı Koruma Programı (ADÜ-ÇÇKP) kapsamında üniversite bünyesinde bir koruma sürüsü oluşturulmuş ve ırkı elinde tutan son yetiştiricilerin sürüleri izlemeye alınmıştır. Ayrıca, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) koordinatörlüğündeki yerinde koruma projesi çerçevesinde 2005 yılından bu yana yetiştiriciler destekleme kapsamına alınmıştır. ADÜ-ÇÇKP programı kapsamında Çine Çaparı koyunlar üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda tanımlayıcı özellikleri ortaya konulmuş ve 2008 yılında TC. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yerli hayvan ırkı olarak tescil edilmiştir.

Üniversite bünyesindeki koruma sürüsü ile son 2 yetiştiriciye ait koruma sürülerinde şu anda mevcut olan toplam 220 baş hayvan Şekil 5’de özetlenmiştir. Bu özetlenen hayvan varlıkları günümüzde Çine Çaparı koyun ırkına ait bilinen son örneklerdir (Karaca vd., 2011).

Lokal bir ırk olduğundan ve araştırma kurumları tarafından varlığı bilinmediğinden, ırkın geçmişteki sayısal durumu, yayılma alanı ve verim özellikleri konusunda son yıllarda üniversitemizde yapılan araştırmalar dışında yazılı kaynak bulunmamaktadır (Karaca ve Cemal, 2005a; Karaca vd., 2004; Karaca vd., 2011).



Şekil 5. Çine Çaparı Koyun popülasyonunun mevcut durumu

2.5.2. Çine Çaparı Koyun ırkına Yönelik Moleküler Genetik Araştırmalar

Binbaş ve Cemal (2006) tarafından yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan Çine Çaparı koyunlarda DNA düzeyindeki genetik çeşitlilik şansa bağlı çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) belirteçleri ile araştırılmıştır. Çalışmada, 3 sürüde (ADÜ-ÇÇKP koruma sürüsü ve 2 yetiştirici sürüsü, EA ve MV) yer alan 72 baş hayvanda 24 RAPD primeri kullanılarak genotipleme yapılmıştır. Sürüler arası ve sürüler içi genetik benzerlikler ve genetik uzaklıklar incelenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek benzerlik ADÜ-ÇÇKP koruma sürüsü ile EA ait sürü arasında ortaya çıkmıştır.

Erdoğan ve Cemal (2010) tarafından yapılan ve 3 sürüde bulunan toplam 128 baş Çine Çaparı koyunda PCR RFLP yöntemi ile yapılan β -Lactoglobulin (β -LGB) gen polimorfizminin araştırıldığı çalışmada A ve B allelleri için elde edilen frekanslar sırasıyla 0.3047 ve 0.6953 olmuştur. AA AB ve BB genotipleri için elde edilen frekanslar ise sırasıyla 0.078, 0.453 ve 0.469 olarak bulunmuştur.

İ. Cemal vd. (2009) 3 Çine Çaparı koruma sürüsünde bulunan toplam 123 baş hayvanda 10 mikrosatellit işaretleyici ile genetik çeşitliliğin tanımlanması amacıyla yaptıkları çalışmada en düşük ve en yüksek allel sayılarının 7 (OarCP34) ve 17 (OarFCB193) arasında değiştiğini ve ortalama allel sayısının 11.5 olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek benzerlik ADÜ-ÇÇKP koruma sürüsü ile EA ait sürü arasında ortaya çıkmıştır. Çalışmada, ADÜ-ÇÇKP sürüsünün diğer iki yetiştirici sürüsünden daha yüksek bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

2.5.3. Karya Koyunu

Batı Anadolu'da son 20-30 yıldır koyun genotiplerinde tüketici taleplerinin de etkisiyle bir değişim söz konusudur. Bu durum Batı Anadolu'da yer alan özellikle yağlı kuyruklu ırkların (Ödemiş, Çine Çaparı, Dağlıç gibi) Sakız, Kıvırcık veya Sakız x Kıvırcık melezi koçlar ile çevirme melezlemesine tutularak ince kuyruklu bir forma dönüşmesine sebep olmuştur (Karaca ve Cemal, 2005b; Karaca vd., 1998).

Karya koyununun oluşumuna katkıda bulunan ırkların katkı düzeyi tam olarak belli değildir. Yoğunluk Sakız ve Kıvırcık kanına ait olmakla birlikte yöresel genotiplerinde katkısı söz konusudur. Yapılan saha araştırmalarında yetiştiriciliğinin yoğun olduğu Aydın, Denizli, İzmir illeri dışında Manisa, Uşak, Afyon, Balıkesir gibi çevre illerde de yetiştirildiği dikkati çekmektedir (Karaca vd., 2009).

Genotipin tanımlanması ve geliştirilmesi amacıyla hayata geçirilen ve bünyesinde birçok AR-GE etkinliği barındıran Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP) kapsamında Karya koyunu Üst Sürüsü oluşturma çabaları Aydın ilinde başlatılmıştır. Genotipe, geçmişte bölgede hüküm süren Karya uygarlığının isminin verilmesi uygun görülmüştür. Karya Tipi olarak anılmakla birlikte yetiştiriciler arasında Karya koyunu olarak benimsenmiş ve

hızla yaygınlaşmıştır (Karaca ve Cemal, 2005b; Karaca vd., 1998; Karaca vd., 2009).

Karya koyununun morfolojik özellikleri Şekil 6’da verildiği gibi, hakim renk beyaz olmakla birlikte genellikle göz etrafı, burun ucu, kulaklar, diz ve ayaklar siyah renktedir (Karaca vd., 2009).



Şekil 6. Karya koç ve koyununa ait fotoğraflar

ADÜ-GKYP kapsamında 1996 yılından beri yürütülen açık çekirdek yetiştirme sistemini model olarak alan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından, 2006 yılında devreye sokulan Aydın ve Denizli illerinin her birinde 6300’er baş olmak üzere toplam 12600 baş hayvanın döl verimi ve gelişme özelliklerine ait verim kayıtları tutulduğu “Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı” projesinin 5 yıllık ilk aşaması tamamlanmıştır. Projeden elde edilen olumlu sonuçlar sebebiyle projede ikinci 5 yıllık dönem aşılmış ve projeye dahil olan hayvan sayıları Aydın ili için 6300 Denizli ili için ise 12600 baş olarak güncellenmiştir. Projeye katılan yetiştiricilere projeye katılan hayvan sayısına göre TAGEM tarafından destekleme yapılmaktadır.

2.5.4. Karya Koyununa Yönelik Moleküler Genetik Araştırmalar

Ülkemiz koyun popülasyonu içerisinde yüksek döl verimi ile öne çıkan Karya koyunlardan elde edilen yumurtlama sayıları ve doğumda kuzu sayıları bakımından elde edilen performans verileri ile genetik parametreler bu genotipte döl verimini etkileyen bir major genin varlığına işaret etmektedir. Bu nedenle I. Cemal vd. (2009) tarafından döl verimini etkilediği bilinen Booroola ve Inverdale genleri bakımından popülasyon taranmıştır. Aday genlere yönelik yapılan tarama

sonucunda kuşkulanan genin Booroola ve Inverdale genlerinden farklı olduğu belirlenmiştir.

Yılmaz ve Karaca (2012) tarafından ADÜ-GKYP Karya elit sürüsünde pedigree kayıtlarının doğruluğunu test etmek amacıyla 10 adet mikrosatellit işaretleyici ile babalık testi yapılmıştır. Çalışmada 105 allel gözlemlenmiştir. Lokuslar bazında gözlenen heterozigotluk oranı 0.541 ile 0.841 arasında, beklenen heterozigotluk oranı ise 0.699 ile 0.831 arasında olmuştur. Çalışmada, lokusların bireysel olarak dışlama olasılıkları ve artan lokus kombinasyonları için dışlama olasılıkları sırasıyla 0.295 ile 0.514; 0.363 ile 0.994 arasında değişmiştir. Karşılama olasılığı değeri 0.054 ile 0.154, tanımlama gücü değeri ise 0.85 ile 0.94 arasında değişmiştir.

2.6. Çalışma ile İlgili Moleküler Genetik Teknikler

2.6.1. DNA İzolasyonu

Hücrelerin liziz solüsyonu ile hücre zarının parçalanarak içindeki DNA, RNA ve proteinlerin serbest bırakılması, ardından RNase ile RNA'ların, tuz ile proteinlerin uzaklaştırılarak DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesine dayanan yöntemdir.

2.6.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA üzerinde ilgilendiğimiz özgül bir bölgenin, in-vitro koşullarda çok sayıda kopyasını elde ettiğimiz bir yöntemdir. Bu yöntemin dayandığı üç ana basamak bulunmaktadır (Mullis, 1990). Bunlar:

Ayrılma (Denaturation): Kalıp DNA'yı 1-5 dk arasında süre ile 92-95 °C ye maruz bırakarak çift sarmal yapısını bozup, tek zincir haline getirilir. Bu sayede bir sonraki basamağa hazırlanır. Bazı durumlarda PCR işleminde çift zincirli DNA'yı ayırmak için bir ön ayırma işlemi olan pre-denaturation için süre 5-10 dk arsında değişen daha uzun süre sıcaklığa maruz bırakılan işlem uygulanabilmektedir (Watson vd., 1992).

Yapışma (Annealing): Bu basamak 55-72 °C de 30-60 sn süre ile gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında ayrılan tek zincirlere, sentezlettiğimiz olügonükleotid primerler tanıdıkları bölgelere yapışırlar (Innis ve Gelfand, 1990). Bu basamakta sıcaklığı ayarlarken sitozin ve guanin bazlarının toplamının dört katı ile adenin ve timin

bazılarının iki katlarının toplamı primerin bağlanma sıcaklığını vermektedir. Bazı literatürde Primerlerin Tm sıcaklıklarının 5°C altındaki sıcaklıkların uygun olacağını söylemektedir (Innis ve Gelfand, 1990). Primerleri sentezletirken dikkat etmemiz gereken en önemli faktör birbirlerinin tamamlayıcıları olmamaları yani dimer oluşturmamaları gerekmektedir.

Uzama (Extension): Bu basamakta bağlanan primerler, 72 °C' de 1-5 dk sürede, *Taq* polimeraz enzimi ile serbest halde bulunan dNTP bazlarını ekleyerek ilgilendiğimiz bölgenin tamamlanmasını sağlamaktadır. Bu işlemin genel olarak 72°C'de yapılmasının sebebi PCR karışımına eklediğimiz DNA'nın uzamasını sağlayan *Taq* DNA polimeraz'ın bu sıcaklıkta en iyi çalışmasıdır (Erlich vd., 1991).

Bu üç temel basamak bir PCR'da genellikle 35 kez tekrarlanır ve sonucunda milyonlarca kopya oluşturur. Bütün döngüler tamamlandıktan sonra bütün parçaların uzadığından emin olmak için son uzama (Final Extension) denilen bir basamak gerçekleştirilir.

2.6.3. Restiriksiyon Endonükleazlar

Restiriksiyon Endonükleaz (RE) enzimleri DNA'yı çok spesifik bölgelerden tanıyıp her iki zincirini kesen enzimlerdir. Günümüzde 230'dan fazla DNA dizilimini tanıyıp kesen 3000'den fazla Restiriksiyon Endonükleaz enzimlerinin varlığından söz edilmektedir (Murray, 2000). Bu enzimler laboratuvar ortamında izole edilebilmektedirler. İzole edilen RE'lar özellikle rutin olarak yapılan moleküler biyoloji tekniklerde yoğun olarak kullanılmaktadırlar.

2.6.4. RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

Bu teknik, PCR ile çoğaltılmış hedef DNA bölgesi üzerinde, restriksiyon endonükleaz adı verilen DNA'ları belirli bölgelerden tanıyıp çift iplikçisini kesen enzimlerle, belirli sıcaklıkta belli sürelerde inkübasyona bırakılarak kesilmesi esasına dayanmaktadır.

Canlılarda özellikle, DNA'nın protein kodlamayan bölgelerinde bazı dizi farklılıkları ya da tek nokta nükleotid değişimleri meydana gelmektedir. Bir nükleotid değişimi veya bir bölgenin insersiyonu ya da delesyonu ile gerçekleşen nükleotid dizilimindeki değişimler sonucunda restiriksiyon enzimlerinin kesim

bölgeleri ortadan kalkabilir ya da yeni bir kesim bölgesi meydana gelebilir (van Mansfeld ve Bos, 1992). SNP adı verilen tek nükleotid değişimleri sonucunda, gen ifade edilirken farklı proteinler sentezleyen ve fenotipte değişimlere neden olan bölgeleri enzimlerle keserek rutin ve hızlı bir şekilde genotipleme yapabilmemize imkan sağlamaktadır(Pandey vd., 2012).

PCR ürünlerinin, RE'lar ile kesilip elektroforez jel ayrıştırılması ile oluşan bantların UV altında ışığa veren boyalarla boyanıp, baz uzunluklarına göre sıralanması ve kesim sayısına bağlı kıyaslama esasına dayanarak yapılan genotipleme tekniğine "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), "Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi" denir.

2.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, nükleik asitlerin agaroz jelde, boyutları, ağırlıkları ve şekillerine göre bir yük alanı içerisinde ağırlıklarının logaritması ile ters orantılı bir hızda göç etme esasına dayanan tekniktir. Negatif yüklü DNA moleküllerinin, pozitif yüklü uca doğru ilerleyecek şekilde, belirli bir elektrik yükü içerisinde ayırt edilebilmesini sağlayan bir tekniktir. Kısa uzunluktaki ya da ağırlığı daha düşük olan nükleik asitler, daha uzun veya ağır olan moleküllere göre agaroz jeldeki porlardan rahat geçtiği için, daha hızlı bir şekilde ilerlemektedirler (Anonim, 2012b). Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketleri, agaroz yoğunluğu ile nükleik asit moleküllerinin boyutları ve şeklinden etkilenir.

Proteinler gibi nükleik asitler de molekül ağırlıklarının logaritmasıyla ters orantılı hızda göç ederler. Bu nedenle, analiz edilen moleküllerin ağırlıkları aynı jelde molekül ağırlıkları bilinen standart nükleik asit parçalarının da (DNA ladder) yürütülmesiyle tayin edilebilir. Agaroz jel elektroforezi ile özellikle değişik kökenli (plazmid, kromozom, organelere ait) DNA'ların izole edildikleri ve/veya restriksiyon enzimleriyle kesildikleri durumda molekül ağırlıkları ve miktarlarına göre elektriksel akımla belirli oranlarda ilerleyerek birbirinden ayrılması ile genotipleme tayinleri yapılabilmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Materyali

Araştırmanın hayvan materyalini, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Koyunculuk Ünitesi ile kimi yetiştirici sürülerinde bulunan Karya ve Çine Çaparı koyunlar oluşturmuştur. Çalışma kapsamında 97 baş Çine Çaparı ve 90 baş Karya genotiplerinden olmak üzere toplam 187 baş koyuna ait örnekler yer almıştır.

3.2. Metot

Sürülerin belirlenmesi, kan örneklerinin toplanması, DNA izolasyonu, PCR ile hedef DNA bölgesinin çoğaltımı, Restriksiyon Endonüklez enzimleri ile PCR ürünlerinin kesime tabi tutulması, elektroforez ile bantların (DNA fragmanlarının) ayrıştırılması, elde edilen bantların görüntülenmesi, genotiplerin okunması ve elde edilen verilerin analiz edilmesi aşamalarından oluşan bu çalışma kapsamındaki tüm bu aşamalara ait ayrıntılı bilgiler uygulanma sıraları baz alınarak aşağıda alt başlıklar halinde ayrıntılandırılmıştır. Çalışma kapsamındaki tüm laboratuvar çalışmaları Prof.Dr. Orhan KARACA tarafından yürütülen ve TÜBİTAK-KAMAG tarafından desteklenen 109G014 nolu ve “*Eşme Yöresi Kıvırcık Melezi Koyun Popülasyonu Damızlık Üretim Sürecinin Yetiştirici Koşullarında Yapılandırılması*” isimli proje kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalında oluşturulan Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Çalışma kapsamında yer alan koyunların boyun toplardamarından (vena jugularis) 4,5 ml kan örneği antikoagülant olarak K3 EDTA içeren vakumlu tüplere alınmıştır.

Çalışmanın hayvan materyalini oluşturan Çine Çaparı koyunlarına ait kan örnekleri ADÜ-ÇÇKP (Adnan Menderes Üniversitesi), Erdoğan Aktürk (Tatarmemişler köyü, Çine, AYDIN) ve Mustafa VURAL’a (Dereköy, Koçarlı, Aydın) ait sürülerdeki 97 baş koyundan, Karya koyunlarına ait kan örnekleri ise ADÜ-GKYP üst sürüsü, Aydın ve Denizli’de TAGEM’in yürüttüğü “Halk Elinde

Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı” projesinde bulunan yetiştiricilerin sürülerinden 90 baş olmak üzere toplamda 187 baş koyundan alınmıştır (Çizelge 5).

Çizelge 6. Çine Çaparı ve Karya koyunlarına ait kan örneklerinin, sürülere göre dağılımı

İrk	Kan Alınan Sürüler	N
Karya	ADÜ-GKYP üst sürüsü	24
	Aydın’da Bulunan Karya Yetiştiricileri	22
	Denizli’de Bulunan Karya Yetiştiricileri	44
Çine Çaparı	ADÜ-ÇÇKP koruma sürüsü	70
	Erdoğan AKTÜRK (EA)	20
	Mustafa VURAL (MV)	7
Toplam		187

Yetiştirici işletmelerinin laboratuara uzak oluşundan dolayı alınan kan örnekleri, DNA izolasyonu basamağına kadar geçen sürenin uzunluğuna bağlı olarak buzdolabı (+4 °C) veya derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Koyunlardan alınan kan örneklerinden hazır ticari izolasyon kiti (Invitrogen DNA izolasyon kiti, Medsantek, İZMİR) kullanılarak DNA izole edilmiştir. Kit ile DNA izolasyonun basamakları aşağıda verilmiştir:

- DNA ekstraksiyonunda öncelikle buzdolabı ya da derin dondurucuda bulunan kan örnekleri dışarı çıkarılıp, oda sıcaklığı olan 25°C’ ye kadar ısınmaları sağlanmıştır.
- Sıcak su banyosu 55 °C’ye ayarlanıp ısınması beklenmiştir.
- Steril olan mikro santrifüj tüpüne öncelikle 200 µl kan örneği konmuştur.
- Üzerine 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNase A eklenmiştir.
- Karışım homojen bir hal alana kadar vortex cihazında iyice karıştırılıp oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Ardından, karışımın üzerine 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip tekrar homojen bir hal alması için güçlü bir şekilde vortexlenmiştir.
- Proteinlerin parçalanması için 55°C’de 10 dk termal blokta inkübasyona bırakılmıştır.

- Termal bloklardan alınan örneklerin üzerine lizasyon gerçekleşmesi için, 200 µl %96-100 ethanol eklenip, 5 s homojen bir hal alabilmesi için iyice vortexlenmiştir.
- Kit içerisinde yer alan PureLink™ Spin kolonu, toplama tüpünün içine yerleştirilmiştir.
- Yaklaşık 640 µl olan lizat karışımı, toplama tüpünün içindeki kolona pipetlenmiştir.
- 10.000 g'de 1 dk süreyle santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpleri santrifüj sonrası içindeki sıvı ile birlikte atılıp, kolonlar yeni bir toplama tüpünün içine yerleştirilmiştir.
- Kolonun içine 500 µl Wash Buffer 1 eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk 10.000 g'de santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpünün içindeki sıvı atılıp kolona 500 µl Wash Buffer 2 eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında en yüksek hızda 3 dk santrifüj yapılmıştır.
- Daha sonra kolon steril bir 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpünün içine yerleştirilmiştir.
- Kolon içine 100 µl Elution Buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Oda sıcaklığında en yüksek hızda 3 dk santrifüj uygulanmıştır.
- Kolon içerisine tekrar 100 µl Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 1 dk inkübasyondan sonra yine oda sıcaklığında en yüksek hızda 3 dk süreyle santrifüj edilerek sonuçta toplam 200 µl elution buffer içinde genomik DNA örneği elde edilmiştir.
- Elde edilen DNA örnekleri analizler yapılana dek buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

3.2.3. PCR ile DNA Çoğaltımı

Tüplerdeki toplam hacim 25 µl olacak şekilde 10X PCR buffer, MgCl₂, dNTP karışımı (ATP, GTP, CTP, TTP), ileri (Forward) ve geri (Reverse) olmak üzere iki primer, *Taq* DNA polimeraz enzimi, genomik DNA ve steril ddH₂O içeren PCR karışımı oluşturulmuştur. Yapılan optimizasyon denemeleri ile PCR karışımını oluşturan bileşenlerin en uygun miktarları belirlenmiştir. Her bir DNA örneği için PCR karışımı katılan bileşenlerin hacim ve son konsantrasyonlarına ait ayrıntılar Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 7. PCR karışımına katılan bileşenlerin hacim ve son konsantrasyonları

Bileşen Adı	1 Örnek için (µl)	Son Konsantrasyon
ddH ₂ O	10,38	-
10X PCR Buffer	2,50	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2,00	2mM
dNTP Karışımı* (3 mM)	6,67	0,2mM
Forward Primer (10 µM)	0,625	0,25µM
Reverse Primer (10 µM)	0,625	0,25 µM
<i>Taq</i> DNA Polimeraz Enzimi (5 U/µl)	0,20	1U
Genomik DNA (~50 ng/µl)	2,00	~100ng/µl

DNA'nın et verimi ve kalitesi yönünden Calpastatin gen polimorfizmine uygun bölgesinin çoğaltımı için ileri ve geri olmak üzere koyun genomu dizilimine özgün iki primer sentezletilmiştir. Her bir primer (ileri ve geri) toplam 20 baz uzunluğunda dizilime sahiptir (Çizelge 7). Primerleri dizayn edebilmek için daha önceki literatür çalışmalarına bakılmış Khederzadeh (2011), tarafından yapılan çalışmada ki primerler kullanılmıştır.

Çizelge 8. Genotiplerin belirlenmesinde kullanılan primerler ve baz dizilimleri.

Primer isimleri	Primer Baz Dizilimleri (5' -> 3')
CAST F :	CCTTGTCATCAGACTTCACC
CAST R :	ACTGAGCTTTTAAAGCCTCT

PCR aşamasında DNA'nın Calpastatin gen polimorfizmine uygun özgün primer bölgelerinin çoğaltılabilmesi için, hazırlanan PCR karışımı ile birlikte izole edilen genomik DNA'lar 0.2 ml'lik ince cidarlı mikro santrifüj tüpleri içerisinde sıcaklık döngüleyici (ABI Veriti) cihaza koyulmuş ve DNA çoğaltımı yapılmıştır. Sıcaklık döngüleyici de (PCR) primerlere özgü DNA bölgelerinin çoğaltılabilmesi için uygulanan program aşağıda verilen Çizelge 8'de özetlenmiştir.

Çizelge 9. Primerlere özgün DNA bölgelerinin çoğaltılabilmesi için gerekli olan ısı döngüleyici cihaz programı.

Basamak	Sıcaklık	Süre
Ön Ayrım (Pre denaturation)	: 95 °C'de	2 dakika
Ayrım (Denaturation)	: 95 °C'de	1 dakika
Primerlerin Bağlanması (Annealing)	: 65 °C'de	1 dakika
Uzama (Extension)	: 72 °C'de	2 dakika
} 35 döngü		
Son Uzama (Final Extension)	: 72 °C'de	10 dakika
Bekleme	: 4°C'de	∞

PCR aşaması sonucunda elde edilen çoğaltılmış DNA bölgeleri genotipleme aşaması için restriksiyon enzimleri ile kesilmişlerdir.

3.2.4. RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

Calpastatin geninin M ve N allellerinin ayrımı amacı için yapılan PCR tabanlı DNA çoğaltımı işlemi için bütün bireylerin özgül bölgelerinin çoğaltım işlemi tamamlanmıştır. Çoğaltılan bölgelerin var olup olmadıklarını görebilmek için ürünler agaroz jelde görüntülenmiştir. PCR ile çoğaltım sonrası oluşan bölgelerin uzunluklarının bütün bireyler için eşit olmasından dolayı bireyler arası bir ayrım yapmak mümkün olamamaktadır. Dolayısı ile ayrım yapabilmek için çoğalttığımız bölgelerin bu bölgelere özgül kesim (restriksiyon) enzimleri ile işleme tabi tutulması gerekmektedir. M ve N allellerinin ayrımını yapabilmek için *MspI* (Fermentas, Dateks, İzmir) enziminden faydalanılmıştır.

Restriksiyon enzimleri ile kesim aşamasında PCR tüpleri içerisinde bulunan ve gene özgül çoğaltılmış DNA parçaları içeren 25 µl hacmindeki PCR ürünü üzerine Çizelge 9'da verilen ve restriksiyon enzimini de içeren bileşenler eklenmiştir. PCR ürünü ve restriksiyon enzimi ile birlikte karışımı bulunan tüpler 37 °C'de en az 6 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 10. Calpastatin geninin allellerinin ayrımı için uygulanan restriksiyon işleminin bileşenleri

Calpastatin Geni M ve N Allellerinin Ayrımı İçin Kullanılan Bileşenler	
Bileşenler	1 örnek için (µl)
ddH ₂ O	18
10X Buffer Tango	2
MspI enzimi (10U/µl)	1,5
Toplam	21,5

Genin M ve N allellerinin ayrımına yönelik primer çiftleri ile çoğaltılan 565 bç uzunluğundaki PCR ürünü DNA fragmanlarının restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda; homozigot kesim olan MM alleli için 306 ve 259 bç uzunluğunda iki bant, eğer kesim olmamış ise homozigot NN bireyi için yaklaşık 565 bç uzunluğunda bir bant ve heterozigot MN alleleline sahip bireyler içinde 259, 306 ve 565 bç uzunluğunda üç bant oluşmaktadır. Farklı boylarda bantların oluşmasının nedenleri calpastatin geninin üzerinde oluşan tek nokta mutasyonu (CC■G → CC■G) nedeni ile *MspI* restriksiyon enziminin kesim noktasının (...C▼CGG...) ortadan kalkmasıdır (Gregula-Kania ve Monika, 2011).

Çizelge 11. Oluşan tek nokta mutasyonları

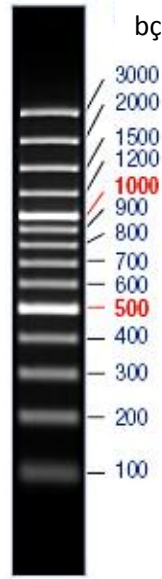
MspI kesim bölgesi	
Ovine CAST- a	241 gcttctcttggtgcagagcc ggg gctctgggtgcacaggcttcagttggtgtggcttgag
Ovine CAST- b	241 gcttctcttggtgcagagcc agg gctctgggtgcacaggcttcagttggtgtggcttgag

Restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası oluşan bu DNA parçalarının ayrıştırılıp gözlemlenebilmesinde bir sonraki aşamayı elektroforez oluşturmaktadır.

3.2.5. Agaroze Jel Elektroforezi

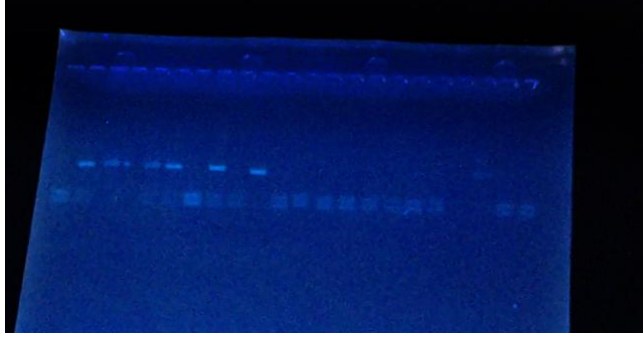
PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA bölgelerinin baz uzunluklarına göre ayırt edilebilmesi için agaroz jel elektroforezinden faydalanmıştır. DNA parçalarının ayrımı için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu jeli hazırlayabilmek için 2 g agaroz hassas terazide tartılıp, ısıya dayanıklı bir şişe içine pH'sı 8.3'e ayarlanmış 100 ml 0.5X TBE çözeltisi eklenerek mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Jel kaynarken arada fırından çıkarılarak içindeki agarozun tamamen çözündüğünü görebilmek için birkaç defa kontrol edilmiştir.

Tamamen içindeki agaroz çözündüğünde (şeffaf bir hal aldığı anda) fırından çıkarılıp 50-60 °C arası sıcaklığa kadar soğutulmuştur. Bu sıcaklığa ulaştıktan sonra cam şişenin içine, etidyum bromid türevi boyama işlemi yapan safe view eklenmiştir. Artık tamamen hazırlanan agaroz jel, isminden de anlaşılacağı gibi jel halini alabilmesi için son hazırlık olan içine PCR-RFLP ürünlerinin yükleneceği kuyucukların oluşmasını sağlayacak tarakların takılı olduğu yatay elektroforez küvetine dökülerek katılaşması beklenmiştir. Katılaştıktan jelden taraklar kuyucukları bozmayacak kadar özenli bir şekilde çıkartılmıştır. Son olarak daha önceden hazırlanan 0.5X TBE çözeltisi elektroforez tankına dökülüp, elektroforez küveti içerisindeki hazırlanan jel tanka küvetle birlikte yerleştirilmiştir. Çıkartılan taraklar sayesinde oluşan kuyucuklara 10 µl PCR-RFLP içine 2µl yükleme boyası (6X Loading Dye) karışımı olacak şekilde elde edilen ürünler yüklenmiştir. Jelin ilk kuyucuğuna oluşacak bantları doğru yorumlayabilmek için gerekli olan 3 kb DNA boy markörü (Fermantas, 100-3000 bp) yine yükleme boyası (6X Loading Dye) ile boyanarak toplam 6 µl olacak şekilde yüklenmiştir.



Şekil 7. DNA bant büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA boy markörü

Yükleme işlemi bittikten sonra elektroforez tankını, elektroforez güç kaynağına bağlayıp, örnekler agaroz jelde 65 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonunda agaroz jel UV ışığın altında görüntülenip fotoğraflanmıştır (Vilber Lourmat). Bu görüntüleme sonucunda bireyler için genotip tayini yapılmıştır.



Şekil 8. UV ışığının altında safe view ile boyanmış agaroz jelin görüntüsü

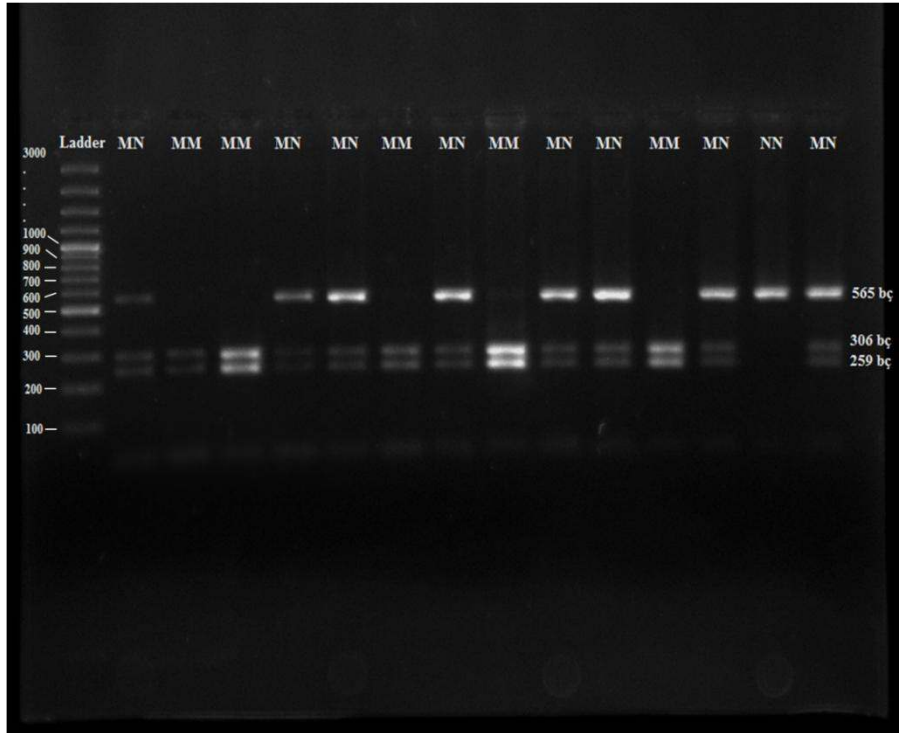
3.2.6. Calpastatin Genotiplerine Yönelik Değerlendirmeler

Jel fotoğraflarından her bireye ait genotip belirlenip not edildikten sonra Calpastatin genetik varyantları bakımından gen ve genotip frekansları direkt sayım yöntemi ile belirlenmiştir. Gen ve genotip frekansları 2 sürü için ayrı ayrı hesaplanmakla birlikte popülasyonun tamamı için de hesaplanmıştır. Ayrıca sürülerin veya popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığını kontrol etmek üzere ki-kare (χ^2) testinden faydalanılmıştır. Tüm hesaplamalar ve χ^2 analizleri için PopGene32 programı (Yeh vd., 1997) kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Calpastatin Genotiplerine İlişkin Gözlemler

PCR-RFLP sonucu oluşan bantlar safe wiew ile boyanmış agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde fotoğraflanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Çalışma için kullanılan koyunlardan bazılarının jelde oluşan CAST geni M ve N allelleri bakımından genotiplere ait görüntü

Calpastatin gen polimorfizminin belirleyebilmek için yapılan, genin M ve N allellerinin ayırımına yönelik primer çiftleri ile çoğaltılan 565 bp uzunluğundaki PCR ürünü DNA fragmanlarının restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda; homozigot kesim olan MM alleli için 306 ve 259 bp uzunluğunda iki bant, eğer kesim olmamışsa homozigot NN bireyi için yaklaşık 565 bp uzunluğunda bir bant ve heterozigot MN alleleline sahip bireyler içinde 259, 306 ve 565 bp uzunluğunda üç bant oluşmaktadır. Farklı boylarda bantların oluşmasının nedenleri Calpastatin geninin üzerinde oluşan tek nokta mutasyonu nedeni ile *MspI* restriksiyon enziminin (...C▼CGG...) kesim noktasının ortadan kalkmasıdır (Anonim, 1997b).

Çizelge 11’de üstte G→A şeklinde oluşan tek nokta mutasyonu (Anonim, 1997b) ve altta normal dizilim (Anonim, 1997a) verilmiştir.

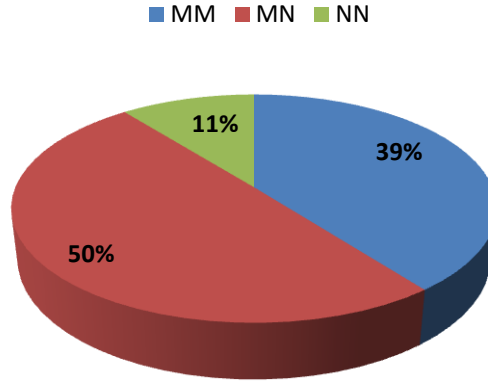
Çizelge 12. Calpastatin gen dizilimindeki tek nokta mutasyonu (üstte) ve normal dizilim (altta)

1	cttgtcatcagacttcacctgcagttcccctacagctgatgcaaagaaaactgagaaaga
61	ggtattgtttttaatgcactcagggaaacttgtagaaactacctccactttaagacaa
121	caacttttttttaaaacttgatttttgacttcgctgggtcttcattgctgtgttcaggctt
181	tctctagttggggcaagcgagggctattctctagttgcatgtgcagccttctgcaggtg
241	gcttctcttgttgcagagccagggtctctgggtgcacaggcttcagttggtgtggcttgag
301	agctctagagcacaggctcagtggtcatggcgacaggcttactccatggcatgtgggat
361	cttccctggccagggagcgaacccgtgtcccctgcggttgcaaggcggcctcttaaccgct
421	ggccaccaggggaagccccaagatgccaaggctttttacttctggttcttaccgtctggtt
481	aatacatttccctcatctgctagtcaaacccttcttttgtatttcatttttcagaaatcta
541	cagaagaggctttaaaagctcagtcagctggggtgatcagaagtgtgctccacccaaag
601	agaaaagaaga
1	cttgtcatcagacttcacctgcagttcccctacagctgatgcaaagaaaactgagaaaga
61	ggtattgtttttaatgcactcagggaaacttgtagaaactacctccactttaagacaa
121	caacttttttttaaaactttatttttgacttcgctgggtcttcattgctgtgttcaggctt
181	tctctagttggggcaagcgagggctattctctagttgcatgtgcagccttctgcaggtg
241	gcttctcttgttgcagagccggggctctctgggtgcacaggcttcagttggtgtggcttgag
301	agctctagagcacaggctcagtggtcgctggcgacaggcttactccacggcatgtgggat
361	cttccctggccagggagcgaacccgtgtcccctgcggttgcaaggcggcctcttaaccact
421	ggccaccaggggaagccccaagatgccaaggctttttacttctggttcttaccgtctggtt
481	aatacatttccctcatctgccagtcгааacccttcttttgtatttcatttttcagaaatcta
541	cagaagaggctttaaaagctcagtcagctggggtgatcagaagtgtgctccacccaaag
601	agaaaagaaga

Birçok sürüden alınan hayvanlar ile Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi’nde oluşturulan Çine Çaparı koruma sürüsü ile Karya koyunu Üst Sürüsü yanında Aydın ve Denizli’de bulunan Karya sürülerinde ve MV isimli yetiştiricinin Çine Çaparı sürüsündeki koyunlarda her üç genotipe (MM, MN ve NN) rastlanırken, EA isimli yetiştiricinin sürüsünde NN genotipine rastlanamamıştır.

4.2. Calpastatin Geni Bakımından Gen ve Genotip Frekansları

Toplam 187 baş koyunun oluşturduğu iki farklı genotipe ait popülasyonda Calpastatin genotiplerinin dağılımı Şekil 10’ da verilmiştir. Genel popülasyonda MM, MN ve NN genotiplerinin görünme sıklıkları sırası ile %39, %50 ve %11 olarak bulunmuştur.



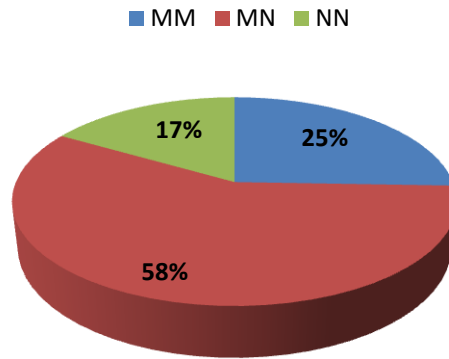
Şekil 10. Karya ve Çine Çaparı koyunlara ait genel popülasyonunda CAST genotiplerinin oransal dağılımı

Calpastatin geni bakımından Karya ve Çine Çaparı koyunlarda genotiplerin sayısal dağılımları ve gözlenen frekansları Çizelge 12’de verilmiştir. Hem Çine Çaparı hem de Karya koyunlarda her üç genotip gözlemlenmiştir. Her iki koyun genotipinde de NN genotipinin görülme sıklığı düşük çıkmış, bu durum toplam 187 baş hayvanda birlikte analiz edildiğinde genotiplerin görülme frekanslarına da yansımıştır.

Çizelge 13. Çine Çaparı ve Karya koyunlarda CAST geni bakımından genotiplerin sayısal dağılımı ve gözlenen genotip frekansları

İrk/Genotip	n	CAST Genotiplerinin Sayısal Dağılımı			CAST Genotiplerinin Gözlenen Frekansları		
		MM	MN	NN	MM	MN	NN
Çine Çaparı	97	51	41	5	0,53	0,42	0,05
Karya	90	23	52	15	0,26	0,58	0,16
Genel	187	74	93	20	0,39	0,50	0,11

Farklı yerlerden kan örnekleri toplanan Karya koyun ırkına ait popülasyonda Calpastatin genotiplerinin dağılımı Şekil 11’de verilmiştir. En yüksek görülme sıklığı MN genotipine (%58) ait olurken MM genotipli bireylerin oranı %25, NN genotipli bireylerin oranı ise %17 olarak tespit edilmiştir.



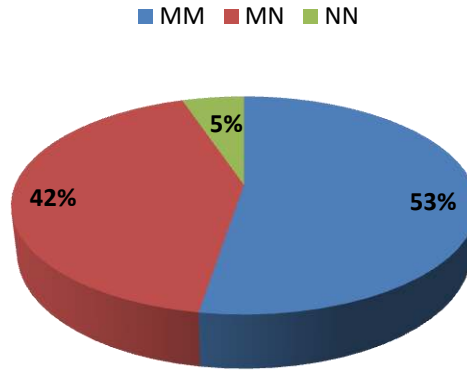
Şekil 11. Karya koyunu popülasyonunda CAST genotiplerinin oransal dağılımı

Karya koyunu ırkı için, toplanan kan örneklerinin alındığı bölgelere göre ayırdığımızda ortaya çıkan genotiplerin sayısal ve oransal dağılımları Çizelge 13’de verilmiştir. Genotiplerin gözlenen frekansları MM, MN ve NN için sırası ile; Adnan Menderes Üniversitesinde bulunan ADÜ-GKYP Karya sürüsünden toplanan 24 örnekte, 0.33, 0.50 ve 0.17 olarak, TAGEM’in yürüttüğü “Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı” projesine kayıtlı Aydın’da bulunan yetiştiricilerden toplanan 22 örnekte, 0.41, 0.27 ve 0.32 olarak, Denizli’de bulunan Karya yetiştirici sürülerinden toplanan 44 örnekte, 0.14, 0.77 ve 0.09 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 14. Farklı yerlerden kan örnekleri toplanan Karya Koyunlarında CAST geni bakımından genotiplerin dağılımı ve gözlenen genotip frekansları.

Bölgeler	n	CAST Genotiplerinin Sayısal Dağılımı			CAST Genotiplerinin Gözlenen Frekansları		
		MM	MN	NN	MM	MN	NN
Aydın	22	9	6	7	0,41	0,27	0,32
Denizli	44	6	34	4	0,14	0,77	0,09
ADÜ-GKYP	24	8	12	4	0,33	0,50	0,17
Genel	90	23	52	15	0,25	0,58	0,17

Üç sürüden oluşan Çine Çaparı koyun ırkına ait popülasyonda Calpastatin genotiplerinin dağılımı Şekil 12’de verilmiştir. MM genotipli bireylerin popülasyonda görülme oranı en yüksek iken (%53), MN genotipli bireyler %42 ve NN genotipli bireyler ise %5 oranında gözlenmiştir.



Şekil 12. Çine Çaparı popülasyonunda CAST genotiplerinin oransal dağılımı

ADÜ-ÇÇKP kapsamındaki koruma sürüsü ile iki yetiştirici sürüsü kapsamında koruma altında olan Çine Çaparı koyunlarında genotiplerin dağılım ve gözlenen frekansları Çizelge 14’de özetlenmiştir. MV ve ADÜ-ÇÇKP sürülerinde her üç genotip gözlenirken, EA sürüsünde NN genotipine rastlanamamıştır. Genotiplerin gözlenen frekansları MM, MN ve NN için sırası ile; Adnan Menderes Üniversitesinde bulunan ADÜ-ÇÇKP Çine Çaparı koruma sürüsünden toplanan 70 örnekte, 0.40, 0.54 ve 0.06 olarak, yetiştirici elinde korunan EA sürüsünden toplanan 20 örnekte, 0.95, 0.05 ve 0 olarak, MV sürüsünden toplanan 7 örnekte, 0.57, 0.29 ve 0.14 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 15. Yetiştirici elinde ve ADÜ-ÇÇKP kapsamında korunmakta olan Çine Çaparı Koyunlarında CAST geni bakımından genotiplerin dağılımı ve gözlenen genotip frekansları.

Sürüler	n	CAST Genotiplerinin Sayısal Dağılımı			CAST Genotiplerinin Gözlenen Frekansları		
		MM	MN	NN	MM	MN	NN
MV	7	4	2	1	0,57	0,29	0,14
EA	20	19	1	0	0,95	0,05	0
ADÜ-ÇÇKP	70	28	38	4	0,40	0,54	0,06
Toplam	97	51	41	5	0,53	0,42	0,05

CAST lokusunda yer alan M ve N allelleri bakımından gen frekansları Karya koyunu için sırası ile 0.5444 ve 0.4556 olarak bulunmuştur (Çizelge 15). Frekanslar Aydın ve Denizli’de bulunan yetiştirici işletmeleri ile ADÜ-GKYP Üst

Sürüsünden elde edilen örneklerde biri birine yakın değerler sergilemiştir. Gözlenen genotip frekansları ise: MM, MN ve NN için sırası ile, Adnan Menderes Üniversitesinde bulunan ADÜ-GKYP Karya sürüsü için, 0.340, 0.486 ve 0.174 olarak, TAGEM'in yürüttüğü "Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı" projesine kayıtlı Aydın'da bulunan yetiştiricilerden toplanan 22 örnekte, 0.297, 0.496 ve 0.207 olarak, Denizli'de bulunan Karya yetiştirici sürülerinden toplanan 44 örnekte, 0.273, 0.499 ve %0.228 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 16. Karya koyununda CAST geni bakımından gen ve beklenen genotip frekansları

Bölgeler	n	Gen Frekansları		Karya Koyununda CAST Genotiplerinin Frekansları		
		CAST M	CAST N	MM	MN	NN
Aydın	22	0,545	0,455	0,297	0,496	0,207
Denizli	44	0,523	0,477	0,273	0,499	0,228
ADÜ-GKYP	24	0,583	0,417	0,340	0,486	0,174
Genel	90	0,544	0,456	0,296	0,496	0,208

Rastgele toplanan Çine Çaparı kanları ile yapılan genotipleme çalışmasında çıkan gen frekansları Çizelge 16'da verilmiştir. Çalışma sonucunda başta EA ait sürü olmak üzere tüm sürülerde M allelinin N alleleline göre çok daha yüksek bir frekansta var olduğu belirlenmiştir. EA ait sürüde M allelinin frekansı neredeyse sabitlenmiştir. Örneklenen tüm hayvanlara ait genotipler toplu olarak genel bir değerlendirmeye tabi tutulduğunda M ve N allellerine ait frekanslar sırası ile 0.737 ve 0.263 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 17. Çine Çaparı ırkına yönelik CAST bakımından gen ve beklenen genotip frekansları

Sürüler	n	Gen Frekansları		Çine Çaparı Irkında CAST Genotip Frekansları		
		CAST M	CAST N	MM	MN	NN
MV	7	0,714	0,286	0,5102	0,4082	0,0816
EA	20	0,975	0,025	0,9506	0,0488	0,0006
ADÜ-ÇÇKP	70	0,671	0,329	0,4508	0,4412	0,1080
Genel	97	0,737	0,263	0,543	0,388	0,069

Karya ve Çine Çaparı koyunlarına ait genel gen frekansları karşılaştırma yapmak amacıyla Çizelge 17’de verilmiştir. Karya koyunu için M ve N allellerinin gözlenme frekansları sırasıyla 0.544 ve 0.456 iken Çine Çaparı ırkında anılan allellerin frekansları sırasıyla 0.737 ve 0.263 olarak elde edilmiştir. Karya ve Çine Çaparı koyununu kapsayan toplam 187 baş hayvanda yapılan genel değerlendirme sonucunda M ve N allellerinin bulunma frekansları sırası ile 0.644 ve 0.356 olarak belirlenmiştir. Genel olarak bu anılan allellerin bulunma sıklıklarına göre beklenen genotip frekansları Çizelge 17’de özetlenmiştir. Karya koyunlarda en yüksek frekans değeri 0.543 ile MM genotipine ait olurken Çine Çaparı koyunlarda heterozigot bireyler olan NN genotipinde bulunmuştur. Toplam 187 baş hayvan örneklemede ki allellerin bulunma frekanslarına göre beklenen genotipik frekanslara bakıldığında şimdiye kadar yapılan literatür bildirileri ile paralellik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 18. Karya ve Çine Çaparı koyunlarında genotipteki bütün bireyler dahil edildiğinde CAST geni bakımından gen ve beklenen genotip frekansları

İrk/Genotip	n	Gen Frekansları		CAST Genotip Frekansları		
		CAST M	CAST N	MM	MN	NN
Karya	90	0,544	0,456	0,543	0,388	0,069
Çine Çaparı	97	0,737	0,263	0,296	0,496	0,208
Genel	187	0,644	0,356	0,415	0,458	0,127

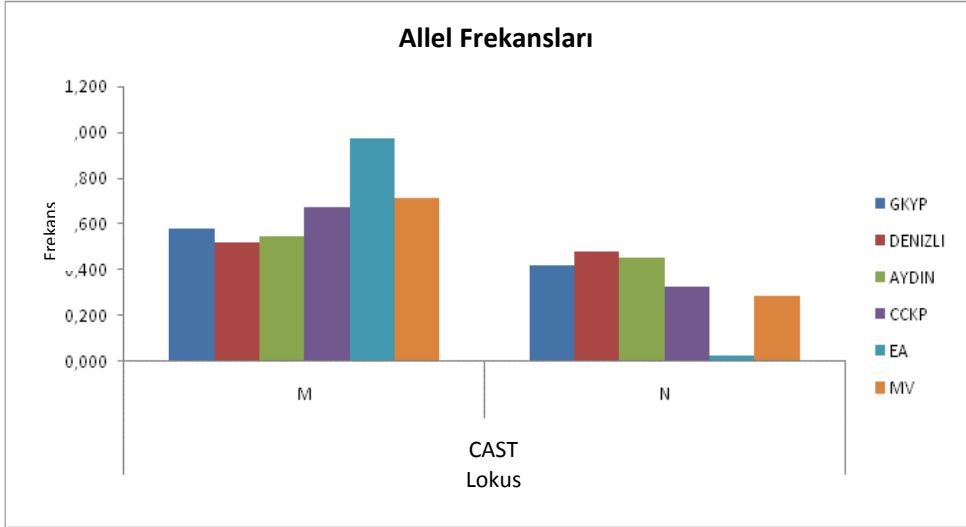
Toplam 187 baş hayvana ait DNA örneklerini oluşturan Karya (90 baş, 3 örneklenen yer) ve Çine Çaparı (97 baş, 3 sürü) koyunlarından oluşan denemenin sürülere ve örneklenen yerlere göre CAST geninin bulunma frekansları Çizelge 18’de verilmiştir.

Çizelge 19.Çine Çaparı ve Karya koyunu için örnekleme yapılan sürü veya lokasyonlar bakımından yapılan değerlendirme ile elde edilen allel frekansları

Lokus	Allel	ADÜ-GKYP	DENİZLİ	AYDIN	ADÜ-ÇÇKP	EA	MV
CAST	M	0,583	0,523	0,545	0,671	0,975	0,714
	N	0,417	0,477	0,455	0,329	0,025	0,286

M alleli bakımından en yüksek frekans EA ait sürüde gözlenmiştir. Yetiştirici sürüsünden örneklenen 20 baş koyundan 19 başında MM, geriye kalan 1 baş koyunda ise MN genotipi gözlenmiştir. NN genotipine ise rastlanmamıştır. M alleli bakımından en düşük frekans ise toplam 44 baş DNA örneğinin değerlendirildiği Denizli yöresindeki Karya koyunlarda gözlenmiştir. Denizli ilindeki yetiştirici sürülerinden örneklenen hayvanlardan 6 başı MM, 34 başı MN ve 4 başı NN genotipine sahip olmuştur. MN genotipine sahip heterozigot bireylerin oranının homozigot genotiplere oranla daha yüksek sayıda olduğu dikkati çekmektedir.

En yüksek N alleli yine Denizli’de bulunan Karya koyunu yetiştiricilerinde bulunurken, en düşük N alleli, sadece 1 baş heterozigot MN hayvanı bulunan, Çine Çaparı yetiştiricisi EA sürüsünde tespit edilmiştir. M ve N allellerinin bulunma frekanslarına göre çizilmiş grafik Şekil 13’de verilmiştir.



Şekil 13. Çine Çaparı ve Karya koyunu için farklı sürü veya illerden alınan örnekler bakımından gözlenen allel frekanslarının dağılımı

Gözlenen ve beklenen genotip sayıları ile Hardy-Weinberg dengesine yönelik ki-kare (χ^2) analiz sonuçları Çizelge 19’da verilmiştir. Yapılan ki-kare analiz sonucunda Çine Çaparı (97 baş) ve Karya (90 baş) olmak üzere her iki genotipinde Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca her iki genotipi de içeren bütün popülasyona ait verileri kapsayan analiz sonucunda da popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşılmıştır. Hayvanların yetiştirildikleri lokasyona göre yapılan değerlendirme de ise Denizli ilinde örneklenen Karya koyunlara ait 44 baş hayvandan oluşan örneklemin Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 20. CAST geni bakımından koyun genotiplere ait gözlenen ve beklenen sayılar ile ki-kare (χ^2) analiz sonuçları.

Örneklenen Yerler	n	Gözlenen Sayılar			Beklenen Sayılar			2sd=1	P
		MM	MN	NN	MM	MN	NN		
Aydın	22	9	6	7	6,547	10,909	4,545	4,934	0,263
Denizli	44	6	34	4	12,021	21,955	10,024	12,699	0,000*
ADÜ-GKYP	24	8	12	4	8,166	11,667	4,167	0,001	0,971
Karya Toplam	90	23	52	15	26,673	44,645	18,681	2,281	0,131
MV	7	4	2	1	3,572	2,857	0,571	1,089	0,297
EA	20	19	1	0	19,013	0,975	0,013	0,000	1,000
ADÜ-ÇÇKP	70	28	38	4	31,554	30,887	7,558	3,499	0,061
Çine Çaparı Toplam	97	51	41	5	52,702	37,594	6,704	0,713	0,399
Genel Toplam	187	74	93	20	77,661	85,702	23,656	1,273	0,259

Yapılan ki-kare (χ^2) analizlerinde genel olarak her iki genotip (Çine Çaparı ve Karya) dengede bulunmuştur. Alt popülasyonlar olarak incelendiğinde Denizli ilindeki yetiştiricilere ait Karya koyunu örnekleminin Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum örneklemin 44 başla sınırlı kalması ve popülasyonda sürdürülen seleksiyon çalışmalarına bağlı şekillenebilir. Denizli’de bulunan çalışma için örneklenen Karya koyunları (44 baş) TAGEM tarafından koordine edilen “Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı” projesinde bulunmaktadır. Sözü geçen proje kapsamında sahadan toplanan performans verilerine dayalı olarak kuzularda gelişme ve koyunlarda döl verim özelliklerine yönelik seleksiyona dayalı ıslah çalışması yürütülmektedir. Khan vd. (2012) yaptıkları çalışmada, Balkhi ve Kajli koyunlarında genotiplerde günlük canlı ağırlık artışındaki değişimlere göre Balkhi koyunlarında 0-8 ay arası Kajli koyunlarında ise 0-4 ay arasında istatistiki olarak önemli farklılıkların olduğu belirlenmiştir. “Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı” projesinde sürülerden 3 aylık ve 6 aylık dönemlerde canlı ağırlık denetimleri yapıp koyunlar damızlığa ayrılmaktadır. Bu bahsi geçen süreler literatür çalışması ile uyum gösterdiğinden yapılan seleksiyon ile allel frekanslarında bir değişimin yaşanmış olma olasılığı da göz ardı edilmemelidir. Popülasyonun dengede olabilmesi için popülasyonda erkek-dişi oranının eşit olması ve her bir bireye eşit çiftleşme şansı verilmesi gerekir. Örneklenen popülasyonda seleksiyon yapıldığından dolayı seçilmiş az sayıda erkek bireye çiftleşme şansı tanınması doğal olarak Hardy-Weinberg dengesinden sapmaya yol açmış olabilir. Çine Çaparı ırkı alt

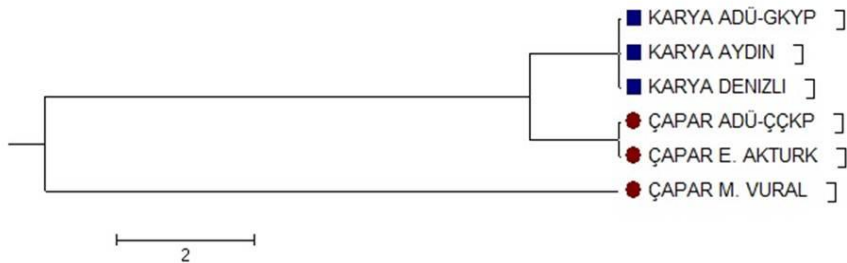
popülasyonlarında ise EA ait olan toplam 20 baş hayvanda yapılan çalışmada NN genotipine rastlanamamış serbestlik derecesi 1 olan ki-kare (χ^2) testinin sonucu 0 olarak bulunurken, önem değeri 1 olarak bulunmuştur.

CAST M ve N allellerinin frekanslarına göre tüm sürüleri kapsayan analizde elde edilen genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri Çizelge 20’de verilmiştir. Bir lokus bakımından hesaplanan genetik yakınlık ve genetik uzaklık değerleri ile çok sağlıklı bir değerlendirme yapabilmek olanaklı olmamasına karşın ek bir bilgi kaynağı olarak dikkate alınmıştır. Sürüler arasındaki genetik benzerlik değerleri 0.997 ile 0.740 arasında sıralanmıştır. Sürüler arasındaki genetik uzaklıklar ise 0.003 ile 0.300 arasında sıralanmıştır.

Çizelge 21.Sürüler arası genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri

	Karya			Çine Çaparı		
	ADÜ-GKYP	DENİZLİ	AYDIN	ADÜ-ÇÇKP	EA	MV
ADÜ-GKYP	****	0,982	0,997	0,996	0,855	0,982
DENİZLİ	0,018	***	0,994	0,961	0,740	0,928
AYDIN	0,003	0,006	***	0,986	0,811	0,964
ADÜ-CCKP	0,004	0,040	0,014	***	0,898	0,995
EA	0,157	0,300	0,209	0,107	***	0,938
MV	0,018	0,075	0,037	0,005	0,064	***

Belirlenen genetik uzaklıklara göre çizilen dendogram Şekil 14’de verilmiştir. Çizdirilen dendograma göre ADÜ-GKYP Üst Sürüsü ile Aydın ve Denizli’de bulunan Karya sürüleri arasında ve ADÜ-ÇÇKP ve EA sürüleri arasında benzerliğin daha fazla olduğu bulunmuştur. MV ait sürü bütün sürülere benzerlik bakımından en uzak sürü olarak gözlemlenmektedir.



Şekil 14.Sürüler arasındaki genetik uzaklığa göre çizilmiş dendogram

Bu anılan durum daha önce Binbaş ve Cemal (2006) tarafından yapılan çalışma ile de paralel bir durum sergilemektedir. Ancak, sadece 1 lokusa dayalı hesaplanan genetik uzaklıklara ait dendogram çizildiğinden çok sağlıklı bir değerlendirme yapmak zordur. Etkin bir değerlendirme yapabilmek için çok sayıda lokusa ait genotip bilgilerinin dikkate alınması gerekir.

Çizelge 22. Bazı koyun popülasyonlarında CAST genine ait allel frekansları

Irklar	Kaynak	n	CAST	
			M	N
Karakul	Shahrudi vd., 2006	100	0,79	0,21
Arabic	Mohammadi vd., 2008	111	0,85	0,15
Tsigai	Gábor vd., 2009	58	0,91	0,09
Valachian	Gábor vd., 2009	19	0,97	0,03
Lacaune	Gábor vd., 2009	11	1,00	0,00
Doğu Friz	Gábor vd., 2009	2	1,00	0,00
Tsigai x Lacane	Gábor vd., 2009	5	0,90	0,10
Dalagh	Khederzadeh, 2011	120	0,80	0,20
Atabi	Nanekarani vd., 2011a	120	0,81	0,19
Lori	Nanekarani vd., 2011b	100	0,64	0,36
Balkhi	Khan vd., 2012	300	0,88	0,12
Kajli	Khan vd., 2012	300	0,86	0,14
Thalli	Suleman vd., 2012	100	0,90	0,10
Lohi	Suleman vd., 2012	100	0,87	0,13
Kajli	Suleman vd., 2012	100	0,81	0,19
Zel	Gharahveysi vd., 2012	100	0,75	0,25
Polish Merino	Szkudlarek-Kowalczyk vd., 2011	82	0,76	0,24
Berrichon du Cher	Szkudlarek-Kowalczyk vd., 2011	41	0,93	0,07
Mutton	Szkudlarek-Kowalczyk vd., 2011	59	0,81	0,19
Ile de France	Szkudlarek-Kowalczyk vd., 2011	30	0,95	0,05

Yapılan literatür taraması sonucu bazı koyun popülasyonlarında CAST geninin M ve N allelleri için belirlenen allel frekansları Çizelge 21’de özetlenmiştir. İncelenen ırkların tamamında M alleli N allele göre oldukça yüksek frekans sergilemiştir. Hatta kimi ırklarda M alleli bakımından sabitlenme olmuştur. Bu bilgiler ile karşılaştırıldığında Karya ve Çine Çaparı koyunlarda M alleli için belirlenen frekanslar Lori ırkı (Nanekarani vd., 2011b) dışındaki tüm koyun ırklarından daha düşük bulunmuştur. Karya koyununda M alleli için elde edilen

frekans (0,544) literatürdeki tüm koyun ırkları için elde edilen frekanslardan daha düşük gözlenmiştir. Çine çaparı ırkına ait frekanslar Karya koyununa oranla literatürdeki değerlere daha yüksek benzerlik sergilemektedir.

5. SONUÇ

Bu araştırmada, yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan yerli gen kaynağı Çine Çaparı ile Batı Anadolu'daki melezleme etkinlikleri sonucunda şekillenen Karya koyunlarında Calpastatin geni bakımından var olan polimorfizm PCR-RFLP metodu kullanılarak tanımlanmıştır. Ayrıca, sürüler arası genetik benzerlik ve farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma ile elde edilen sonuçları aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür:

Yapılan PCR-RFLP yönteminden sonra ulaşılan sonuçlarda: her iki ırk için frekansı düşük olan NN genotipi, CAST geninin PCR-RFLP metodu ile belirlendiği diğer çalışmalarla paralellik sergilemektedir (Gábor vd., 2009; Gharahveysi vd., 2012; Khan vd., 2012; Khederzadeh, 2011; Mohammadi vd., 2008; Nanekarani vd., 2011a; Nanekarani vd., 2011b; Nassiry vd., 2006; Suleman vd., 2012; Szkudlarek-Kowalczyk vd., 2011).

Calpastatin geni bakımından belirlenen MM, MN ve NN genotipleri için beklenen genotip frekansları Çine Çaparı koyun ırkında sırası ile 0.543, 0.388 ve 0.069, Karya koyununda ise sırasıyla 0.296, 0.496 ve 0.208 bulunmuştur. Çine Çaparı ve Karya koyunlar birlikte değerlendirildiğinde ise bu genotipler için frekanslar sırasıyla 0.415, 0.458 ve 0.127 olarak tespit edilmiştir. MM, MN ve NN genotiplerinin bulunma yüzdelere bakıldığında sırası ile, Çine Çaparı koyun ırkında 0.53, 0.42 ve 0.05, Karya koyununda 0.25, 0.58 ve 0.17, iki genotipin birlikte değerlendirilmesinde ise 0.39, 0.50 ve 0.11 olarak bulunmuştur.

Calpastatin geni bakımından CAST M ve CAST N allellerinin bulunma frekansları sırası ile; Karya koyun ırkı yetiştiricilerinden toplanan örnek popülasyonda Aydın'da, 0.5455 ve 0.4545, Denizli'de 0.5227 ve 0.4773, Adnan Menderes Üniversitesi'nde bulunan ADÜ-GKYP Karya koyunu Elit Üst Sürüsünde, 0.5833 ve 0.4167 olarak, Çine Çaparı ırkında, Adnan Menderes Üniversitesi'nde bulunan ADÜ-ÇÇKP sürüsünde, 0.6714 ve 0.3286, EA sürüsünde, 0.9750 ve 0.0250, MV isimli yetiştiricinin sürüsünde 0.6714 ve 0.3286 olarak bulunmuştur. Toplam 90 baş olan Karya koyunu örnekleminde, 0.5444 ve 0.4556, toplam 97 baş olan Çine Çaparı koyunu örnekleminde, 0.7371 ve 0.2629, toplam 187 baş olan Karya ve Çine Çaparı örnekleri birlikte değerlendirildiğinde ise CAST M ve CAST N allellerinin bulunma frekansları 0.6444 ve 0.3556 olarak bulunmuştur. Diğer ırklarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla (Çizelge 18)

karşılaştırıldığında Çine Çaparı koyunlarda da benzer şekilde M allellinin frekansının N allellinden yüksek olduğu hatta M allellinin frekansının N allellinin frekansını ikiye katladığı anlaşılmaktadır. Karya koyunlarda ise literatürdeki çalışma yapılan tüm ırklar ile Çine Çaparından farklı olarak iki allellin frekansları arasında çok bariz farka rastlanmamıştır. Karya koyunlarda M alleli N alleline göre kısmen daha yüksek frekansa sahiptir.

Sürüler arası CAST M ve CAST N allellerinin frekanslarına göre tüm sürüleri kapsayan analizde elde edilen genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerleri 0.997 ile 0.740 arasında sıralanmıştır. Sürüler arasındaki genetik uzaklıklar ise 0.003 ile 0.300 arasında sıralanmıştır. Bu sıralanan genetik uzaklıklara göre, Karya sürüleri genetik olarak birbirine yakın, Çine Çaparı ırkı koyunlarda ise ADÜ-ÇÇKP ile EA sürüleri birbirine daha yakinken, MV ait sürü en uzak sürü olarak belirlenmiştir. Bu sonucun ortaya çıkmasında ADÜ-ÇÇKP sürüsünün Çine ilçesindeki sürülerden alınan hayvanlarla oluşturulması etken olabileceği gibi, koruma sürüsü ile anılan yetiştirici sürüsü arasındaki damızlık hareketlerinin ADÜ-ÇÇKP sürüsü ile Koçarlı ilçesine bağlı Dereköy köyünde bulunan MV sürüsü arasındaki damızlık hareketlerine oranla daha yüksek olmasının rolünün de olabileceği düşünülmektedir.

Türkiye’de ki koyun popülasyonlarında DNA düzeyinde Calpastatin gen polimorfizmine yönelik yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu araştırmada yerli genotiplerimizde Calpastatin bakımından gen polimorfizminin olduğu görülmüştür. Calpastatin lokusunda CAST M ve CAST N olmak üzere 2 allel saptanmış olup, en yaygın olanı M allelidir. Bu çalışma referans bir çalışma olarak kabul edilip kimi yerli ırklar üzerinde başka çalışmalar da yapılabilir.

Araştırmacılar Calpastatin gen polimorfizmi üzerine yoğunlaştıkça, sadece *MspI* enzimi ile değil aynı zamanda *NcoI* ve *Hin6I* enzimleri ile farklı alleller de belirlenmektedir (Gregula-Kania ve Monika, 2011). Bu gen polimorfizmi ortaya konulduktan sonra daha ileriki dönemlerde bu enzimlerle de denemeler yapılabilir.

Günümüzde et verim yönlü hayvanların genotiplerinin tespitinde DNA analizleri daha hızlı sonuç alınması bakımından genotip tayininin büyük oranda yerini almıştır. DNA analizleri ile proteinleri kodlayan genlerin allelleri yüksek bir doğrulukta tespit edilebilmektedir.

Bu çalışma sadece yerli gen kaynağı olup koruma altında olan Çine Çaparı koyunu ile Batı Anadolu'da yetiştiriciliği yaygınlaşan Karya koyunlarında Calpastatin gen polimorfizminin olup olmadığını ortaya koyabilmek için yapılmıştır. Daha ileriki dönemlerde yapılacak çalışmalarda genotip bilgileri ile bireylerin performans özellikleri ilişkilendirilip genotiplerin fenotipe yansımaları ortaya konabilecektir. Bu amaçla, Çine Çaparı ve Karya koyunlarda her üç genotipe ait bireylerin aynı koşullarda gelişme özellikleri ile et verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi anlamlı olacaktır. Fenotipik anlamda üstünlük sağlayan genotiplerin belirlenmesi durumunda bu genotiplere ait bilgiler mevcut ıslah programlarına entegre edilebilecektir.

Calpastatin lokusu için elde edilen genotip bilgileri Çine Çaparı ırkının korunma sürecinde daha ileriki dönemlerde gerçekleştirilecek araştırmalarda referans olarak kullanılabilecektir. Bu bilgiler ileride karşılaştırma yapma ve geçen süreçteki gen ve genotip frekanslarındaki değişimi ortaya koyma ve koruma etkinliklerini buna göre yönlendirme şansı tanıyacaktır.

İrk tescil çalışmalarında üzerinde çalışılan koyunların fizyolojik ve morfolojik özelliklerinin yanında, yapılan bu ve bunun gibi çalışmalarla genetik tanımlamalar kısmındaki gerekli alanlar da doldurabilecektir.

Bu çalışma sonrasında diğer yerli ırklarımızda da Calpastatin genine ait polimorfizmin ortaya konması yanında özellikle gelişme ve et kalite özelliklerinin genotiplere göre değişimin tanımlanmasında yarar vardır. Ayrıca, yapılan bu çalışma ile sadece tek bir nükleotid değişimi saptanabilmektedir. Yerli ırklarımızda bu gene ait bölgede diğer nükleotid farklılıklarına da ulaşmak olasıdır. Bundan dolayı, yerli ırklarımızda gene ait bu bölgenin DNA dizi analizi ile incelenmesi farklı SNP'leri tanımlama şansı tanıyabilecektir. Yerli genotiplerimize özgü yeni SNP'lerin tanımlanması durumunda bu bilgiler ile performans verilerinin ilişkilendirilmesi gerekir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, A.R. 2003. Hayvan Islahı. Ders Notları, Kafkas Üniversitesi:51-60.
- Alarcon-Rojo, A., Dransfield, E. 1989. Effect of calcium ions on texture of beef during conditioning. **Roc. Int. Congr. Meat Sci. Tech. Copenhagen**, 35:1141.
- Anonim 1997a. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2522420>, [Erişim Tarihi: 07.08.2012].
- Anonim 1997b. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2522422>, [Erişim Tarihi: 07.08.2012].
- Anonim 2011. <http://www.tuik.gov.tr>, [Erişim Tarihi: 27.05.2011].
- Anonim 2012a. <http://tr.scribd.com/doc/56171704/et> [Erişim Tarihi: 07.09.2012]
- Anonim 2012b. http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis. [Erişim Tarihi: 15.08.2012].
- Anonim 2012c. <http://www.tdk.gov.tr/> [Erişim tarihi: 11.08.2012].
- Anonim 2012d. <http://www.proaniwal.com/documents/TexelDM.pdf> [Erişim Tarihi: 07.09.2012]
- Averna, M., Tullio, R.D., Passalacqua, M., Salamini, F., Ponteremoli, S., Mellon, E. 2001. Changes in intracellular calpstatin localisation are mediated by reversible phosphorylation. **Biochem. J.**, 354:25-30.
- Banks, R. 1997. The Meat Elite Project: establishment and achievements of an elite meat sheep nucleus. **Adv. Anim. Breed. Genet.** , 12.
- Barb, C.R. 1999. The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. **Journal of Animal Science**, 77:1249-57.
- Barb, C.R., Kraeling, R.R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. **Anim Reprod Sci**, 82-83:155-67.
- Barendse, W., Armitage, S.M., Kossarek, L.M., Shalom, A., Kirkpatrick, B.W., Ryan, A.M., Clayton, D., Li, L., Neibergs, H.L., Zhang, N., Grosse, W.M., Weiss, J., Creighton, P., McCarthy, F., Ron, M., Teale, A.J., Fries, R., McGraw, R.A., Moore, S.S., Georges, M., Soller, M., Womack, J.E., Hetzel, D.J.S. 1994. A Genetic-Linkage Map of the Bovine Genome. **Nature Genetics**, 6:227-235.

Bennet, G.L. 1990. Selection for growth and carcass composition in sheep. Proc. 4th World Cong. on Genet. Appl. Livest. Prod.:15-27.

Binbaş, P., Cemal, İ. 2006. Çine Çaparı Koyunlarda Genetik Çeşitliliğin RAPD Yöntemi ile Belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Bjercke, R.J., Goll, D.E., Robson, R.M. 1984. Development of methods to measure activity of polysomes and cytoplasmic enzymes from bovine skeletal-muscle in in-vitro protein-synthesis assays. **J. Anim. Sci.**, 59:666-683.

Boehm, M.L., Kendall, T.L., Thompson, V.F., Goll, D.E. 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **J. Anim. Sci.**, 76:2415-2434.

Breg, R.T., Butterfield, R.M. 1985. New and improved types of meat animals. In: Development in Meat Science (Lawrie, R. Ed.), Elsevier. pp. 1-23, London and New York

Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P. 1995. Recombinant mouse ob protein - evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, 269:546-549.

Cemal, İ. 1996. Çiftlik Hayvanlarında Major Genler: Bunların Belirlenmesi, Transferi ve Endüstriyel Kullanımı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Y. Lisans Tezi, Van.

Cemal, I., Karaca, O., Davis, G.M., Galloway, S.M., Yılmaz, O. 2009. Molecular genetic testing of kary sheep for booroola and inverdale mutations. international scientific conference (BALNIMALCON- 2009): Challenges of the Balkan Animal Industry and the Role of Science and Cooperation, May 14-16, 2009. Trakia University Stara Zagora – Bulgaria,:108-111.

Cemal, İ., Karaca, O., Yılmaz, O., Binbaş, P. 2009. Yerli gen kaynağı çine çaparı koyunlarda genetik çeşitliliğin mikrosatellit gen belirteçleri ile tanımlanması. Proje Bitirme Raporu Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu (ZRF-07030).

Choi, B.H., Lee, J.S., Jang, G.W., Lee, H.Y., Lee, J.W., Lee, K.T., Chung, H.Y., Park, H.S., Oh, S.J., Sun, S.S., Myung, K.H., Cheong, I.C., Kim, T.H. 2006. Mapping of the porcine calpastatin gene and association study of its variance with economic traits in pigs. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, 19:1085 - 1089.

Cockett, N.E., Jackson, S.P., Shay, T.L., Farnir, F., Berghmans, S., Snowden, G.D., Nielsen, D.M., Georges, M. 1996. Polar overdominance at the ovine callipyge locus. **Science**, 273:236-8.

Cockett, N.E., Jackson, S.P., Shay, T.L., Nielsen, D., Moore, S.S., Steele, M.R., Barendse, W., Green, R.D., Georges, M. 1994. Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (ovis-aries) using bovine DNA markers. **PNAS of the United States of America**, 91:3019-3023.

Cong, M., Thompson, V.F., Goll, D.E., Antin, P.B. 1998. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **J. Biol. Chem.**, 273:660-6.

Cross, H.R., Carpenter, Z.L., Smith, G.C. 1973. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovine muscle tenderness. **J. Food Sci.**, 38:998-1003.

Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K., Suzuki, K. 1987. Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. **PNAS of the United States of America**, 84:3590-3594.

Erdoğan, F., Cemal, İ. 2010. Yerli Gen Kaynağı Çine Çaparı Koyunların Süt Verim Özellikleri ve B-Laktoglobulin Gen Polimorfizmi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.

Erlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain-reaction. **Science**, 252:1643-1651.

Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. 1996 Introduction to Quantitative Genetics Longman Group Ltd, U.K.

Fogarty, N.M. 1995. Genetic parameters for live weight, fat and muscle measurements, wool production and reproduction in sheep: a review. **Anim. Breed. Abs.**, 63:101-143.

Fruhbeck, G., Jebb, S.A., Prentice, A.M. 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. **Clinic. Physiol.**, 18:399-419.

Gábor, M., Trakovická, A., Miluchová, M. 2009. Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. **Zootehnie și Biotehnologii**, 42:470-476.

Geesink, G.H., Koohmaraie, M. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under postmortem conditions. **J. of Anim. Sci.**, 77:2685-92.

Gharahveysi, S., Abbasi, H.A., Irani, M., Abdullahpour R., Mirhabibi, S. 2012. Polymorphism investigation of calpastatin gene in Zel sheep population of Iran by PCR-RFLP method. **Afr. J. Biotechnol.**, 11:3211-3214.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R.G., Ouali, A. 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. **Can. J. Anim. Sci.**, 78:503-512.

Greeff, J.C., Safari, E., Fogarty, N.M., Hopkins, D.L., Brien, F.D., Atkins, K.D., Mortimer, S.I., van der Werf, J.H.J. 2008. Genetic parameters for carcass and meat quality traits and their relationships to liveweight and wool production in hogget Merino rams. **J. Anim. Breed. Genet.**, 125:205-215.

Gregula-Kania, Monika 2011. New allelic variant of the ovine calpastatin gene. **Afr. J. Biotechnol**, 10:13082-13085.

Grobet, L., Martin, L.J.R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., Georges, M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature Genetics**, 17:71-74.

Hanset, R. 1991. The Major gene of muscular hypertrophy in Belgian blue cattle breed in: *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals* (Owen, J. B. and Axford, R. F. E. Eds.), CAB International. pp. 467-478, U.K.

Hashemi, A., Mardani, K., Farhadian, M., Ashrafi I., ve Ranjbari, M., 2011. Allelic polymorphism of Makoei sheep leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. **Afr. J. Biotechnol.** 10 (77): 17903-17906.

Hitomi, K., Murase, M., Kawamura, T., Maki, M. 2000. Constant expression of mouse calpastatin isoforms during differentiation in myoblast cell line, C2C12. **Cytotechnology**, 33:63-70.

Houseknecht, K.L., Portocarrero, C.P. 1998. Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis. **Domest. Anim. Endocrinol.**, 15:457-475.

Huff-Lonergan, E.J., Mitsuhashi, T., Beekman, D.D., Parrish, J., F. C., Olson, D.G., Robson, R.M. 1996. Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **J. Anim. Sci.**, 74:993-1008.

Innis, M.A., Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. In: *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications* (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. Eds.), J. Academic Press. pp. 3-12, San Diego, CA.

Jackson, S.P., Green, R.D., Miller, M.F. 1997. Phenotypic characterization of rambouillet sheep expressing the callipyge gene: I. Inheritance of the condition and production characteristics. **J. Anim. Sci.**, 75:14-8.

Javanmard, A., Panandam, J.M., Sugnaseelan, S., Yusoff, K. 2010. Allele frequencies at six candidate genes associated with growth and carcass quality traits in the Boer goats. **Afr. J. Biotechnol.**, 9:7236-7238.

Juszcuk-Kubiak, E., Rosochacki, S.J., Wicińska, K., Szreder, T., Sakowski, T. 2004. A novel RFLP/AluI polymorphism of the bovine calpastatin (CAST) gene and its association with selected traits of beef. **Anim. Sci. Pap. Rep.**, 22:195-204.

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Res.**, 7:910-6.

Karaca, O., Cemal, İ. 1998. Batı Anadolu koyunculuğunda genetik kaynakların korunma ve kullanımı. Ege Bölgesi 1. Tarım Kongresi, 7-11 Eylül 1998, ADÜ Ziraat Fakültesi, Aydın.

Karaca, O., Cemal, İ. 2005a. Gen kaynağı olarak risk altındaki yerli koyun ırklarımızdan: Çine Çaparı. **HASAD Hayvancılık**, 20:14-20.

Karaca, O., Cemal, İ. 2005b. Koyun genotiplerimizin ıslahı için örnek bir yapılanma Adnan Menderes Üniversitesi-Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP). **HASAD Dergisi**.

Karaca, O., Cemal, İ., Altın, T. 2004. Yerli Çine Çaparı koyun ırkının Genetik kaynak olarak korunması çalışmaları. 4. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, (1-3 Eylül 2004), Cilt 1:33-38.Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Karaca, O., Cemal, İ., Atay, O. 1998. Adnan Menderes Üniversitesi grup koyun yetiştirme programı (ADÜ-GKYP). Ege Bölgesi 1. Tarım Kongresi, 7-11 Eylül 1998 Aydın.

Karaca, O., Cemal, İ., Yılmaz, O., Yılmaz, M. 2009. Karya koyunu. Türkiye Ulusal Koyunculuk Kongresi, 12-13 Şubat, İzmir:225-234.

Karaca, O., Çetiner, Ş., Cemal, İ. 1999. Çine Çaparı koyunların kimi özellikleri ve genetik kaynak olarak korunması olanakları. **Uluslar Arası Hayvancılık' 99 Kongresi**, (21 Eylül 1999): pp. :558-563 Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir.

Karaca, O., Kaymakçı M., Vanlı, Y. 1992. Koyunlarda döl veriminin genetiği ve yeni yaklaşımlar. **Y.Y. Ü. Zir. Fak. Der.**, 2:138-157.

Karaca, O., Yılmaz, O., Cemal, I. 2011. Conservation of native Çine Çaparı sheep breed as genetic resource. 8th (RBI) Global Conference on the Conservation of Domestic Animal Genetic Diversity, (October 4-7, 2011) pp:357-365 Namık Kemal University, Tekirdağ – Turkey.

Khan, S.U.H., Riaz, M.N., Ghaffar, A., Khan, M.F.U. 2012. Calpastatin (CAST) gene polymorphism and its association with average daily weight gain in Balkhi and Kajli sheep and Beetal goat breeds. **Pakistan J. Med. Sci.**, 44:377-382.

Khederzadeh, S. 2011. Polymorphism of calpastatin gene in crossbreed Dalagh sheep using PCR-RFLP. **Afri. J. Biotechnol.**, 10:10839-10841.

Killefer, J., Koohmaraie, M. 1994. Bovine Skeletal-Muscle Calpastatin - Cloning, sequence-analysis, and steady-state messenger-RNA expression. **J. Anim. Sci.**, 72:606-614.

Kinghorn, B.P., van Arendonk, J.A.M., Hetzel, D.J.S. 1994. Detection and use of major genes in animal breeding. **AgBiotech News and Information**, 6:297- 302.

Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, 43:193-201.

Koohmaraie, M., Babiker, A.S., Schroeder, A.L., Merkel, R.A., Dutson, T.R. 1988. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca-2+-dependent proteases. **J. Food Sci.**, 53:1638-1641.

Koohmaraie, M., Crouse, J.D., Mersmann, H.J. 1989. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium-chloride - effect of concentration and ionic-strength. **J. Anim. Sci.**, 67:934-942.

Koohmaraie, M., Shackelford, S.D. 1991. Effect of calcium-chloride infusion on the tenderness of lambs fed a beta-adrenergic agonist. **J. Anim. Sci.**, 69:2463-2471.

Koohmaraie, M., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Lonergan, S.M., Doumit, M.E. 1995. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **J. Anim. Sci.**, 73:3596-3607.

Koohmaraie, M., Whipple, G., Crouse, J.D. 1990. Acceleration of postmortem tenderization in lamb and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium-chloride. **J. Anim. Sci.**, 68:1278-1283.

Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, J.D., Mersmann, H.J. 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. **J. Anim. Sci.**, 69:617-24.

Leifers, S.C., Veerkamp, R.F., Te Pas, M.F.W., Chilliard, Y., Van der Lende, T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. **Domestic Anim. Endocrinol.**:227-238.

Lonergan, S.M., Ernst, C.W., Bishop, M.D., Calkins, C.R., Koohmaraie, M. 1995. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. **J. Anim. Sci.**, 73:3608-12.

Macajova, M., Lamosova, D., Zeman, M. 2004. Role of leptin in farm animals: a review. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, 51:157-66.

May, S.G., Dolezal, H.G., Gill, D.R., Ray, F.K., Buchanan, D.S. 1992. Effect of days fed, carcass grade traits, and subcutaneous fat removal on postmortem muscle characteristics and beef palatability. **J. Anim. Sci.**, 70:444-53.

McEwan, J.C., Broad, T.E., Jopson, N.B., Robertson, T.M., Glass, B.C., Burkin, H.B., Gerard, E.M., Lord, E.A., Greer, G.J., Bain, W.E., Nicoll, G.B. 2000. Ribeye muscling (REM) locus in sheep: phenotypic effects and comparative genome localization Proceedings of the 27th Conference of the International Society of Animal Genetics, 22-26 July 2000, Minneapolis, MN, USA.

McEwan, J.C., Gerard, E.M., Jopson, N.B., Nicoll, G.B., Greer, G.J., Dodds, K.G., Bain, W.E., Burkin, H.R., Lord, E.A., Broad, T.E. 1998. Localization of a QTL for rib-eye muscling on OAR18. **Anim. Genet.**, 29:66-67.

McLaren, R.J., Broad, T.E., McEwan, J.C., Jopson, N.B., Robertson, T.R., Glass, B.C., Gerard, E.M., Greer, G.J., Bain, W.E., Nicoll, G.B. 2001. Identification of positional candidates for the Carwell locus for rib-eye muscling in sheep. Proc. Plant and Animal Genome IX, W46, 13-17 Ocak 2001.:San Diego, CA, USA.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, 387:83-90.

McPherron, A.C., Lee, S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **PNAS of the United States of America**, 94:12457-12461.

Mohammadi, M., Nasiri, M.T.B., Alami-Saeid, K.H., Fayazi, J., Mamoe, M., Sadr, A.S. 2008. Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR-RFLP. **Afri. J. Biotechnol.**, 7:2682-2684.

Morgan, J.B., Miller, R.K., Mendez, F.M., Hale, D.S., Savell, J.W. 1991. Using calcium-chloride injection to improve tenderness of beef from mature cows. **J. Anim. Sci.**, 69:4469-4476.

Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain-reaction. **Scientific American**, 262:56-61.

Murray, N.E. 2000. Type I restriction systems: Sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64:412-434.

Nanekarani, S., Asadi, N., Khederzadeh, S. 2011a. Genotypic frequency of Calpastatin gene in Lori sheep by PCR-RFLP method. **International Conference on Food Engineering and Biotechnology**, 4: 148-150.

Nanekarani, S., Khederzadeh, S., Kaftarkari, A.M. 2011b. Genotypic frequency of Calpastatin gene in Atabi sheep by PBR method. **International Conference on Food Engineering and Biotechnology**, 9:189-192.

Nassiry, M.R., Tahmoorespour, M., Javadmanesh, A., Soltani, M., Far, S.F. 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. **Iranian J. Biotechnol.**, 4:188- 192.

Nicoll, G.B., Burkin, H.R., Broad, T.E., Jopson, N.B., Greer, G.J., Bain, W.E., Wright, C.S., Dodds, K.G., Fennessy, P.F., McEwan, J.C. 1998. Genetic linkage of microsatellite markers to the Carwell locus for rib-eye muscling in sheep. Proc. 6th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., (11-16 January 1998) Vol. 26, pp. 529-532 University of New England, Armidale, NSW, Australia.

Nour, A.Y., Gomide, L.A., Mills, E.W., Lemenager, R.P., Judge, M.D. 1994. Influence of production and postmortem technologies on composition and palatability of USDA select grade beef. **J. Anim. Sci.**, 72:1224-1231.

Ouali, A., Talmant, A. 1990. Calpains and Calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal-muscles. **Meat Science**, 28:331-348.

Özer, O.O. 2011. Koyun eti fiyatının asimetrik fiyat geçirgenliği ile analizi: Türkiye örneği. **Tarım Ekonomisi Dergisi**, 17:55-63.

Page, B.T., Casas, E., Heaton, M.P., Cullen, N.G., Hyndman, D.L., Morris, C.A., Crawford, A.M., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Keele, J.W., Smith, T.P. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **J. Anim. Sci.**, 80:3077-85.

Palmer, B.R., Roberts, N., Hickford, J.G.H., Bickerstaffe, R. 1998. Rapid communication: PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. **J. Anim. Sci.**, 76:1499-1500.

Palmer, B.R., Su, H.Y., Roberts, N., Hickford, J.G.H., Bickerstaffe, R. 2000. Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene. **Anim. Biotechnol.**, 11:63-67.

Pandey, S., Ranjan, R., Mishra, R.M., Seth, T., Saxena, R. 2012. Effect of ANXA2 gene single nucleotide polymorphism (SNP) on the development of osteonecrosis in Indian sickle cell patient: a PCR-RFLP approach. **Indian J. Exp. Biol.**, 50:455-8.

Roberts, R.C., Smith, C. 1982. Genes with large effects-theoretical aspects in livestock breeding. 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 4-8 October, 6:420-438. Madrid.

Sellier, P. 1994. The future role of molecular genetics in the control of meat production and meat quality. **Meat Science**, 36:29-44.

Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Cundiff, L.V., Gregory, K.E., Rohrer, G.A., Savell, J.W. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. **J. Anim. Sci.**, 72:857-63.

Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M. 1995. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J. Anim. Sci.**, 73:3333-40.

Shahroudi, F.E., Nassiry, M.R., Valizadh, R., HeraviMoussavi, A., Pour, M.T., Ghiasi, H. 2006. Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. **Iranian J. Biotechnol.**, 4:117 -122.

Shelley, J.M., Kemp, J.D., Deweese, W., Kratzer, D.D., Ely, D.G. 1970. Effect of castration, slaughter weight and testosterone on lamb carcass composition and palatability. **J. Anim. Sci.**, 31:189 (Abstr.).

Smith, C. 1985. Utilization of major genes. In: Genetics of Reproduction in Sheep (Land, R. B., Robinson, D. W. eds.) pp. 151-158, Butterworth, London.

Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W. 1996. The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. **Mamm. Gen.**, 7:399-400.

Suleman, M., U., Saeed, M., Khan, R., N., Yousaf, M., Shah, A., Ishaq, R., Ghafoor, A. 2012. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds. **Afri. J. Biotechnol.**, 11:10655-10660.

Swanek, S.S., Morgan, J.B., Owens, F.N., Gill, D.R., Strasia, C.A., Dolezal, H.G., Ray, F.K. 1999. Vitamin D3 supplementation of beef steers increases longissimus tenderness. **J. Anim. Sci.**, 77:874-81.

Szkudlarek-Kowalczyk, M., Wiśniewsk, E., Mroczkowsk, S. 2011. Polymorphisms of calpastatin gene in sheep. **J. Cent. Eur. Agr.**, 12:425-432.

Thomas, D.L. 1994. Potential role of gene for extreme muscling in the U.S. sheep industry. **The Shepherd**, 19:12-14.

Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, G., Friedrich, P. 2002. Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. **J. Biol. Chem.**, 277:9022-6.

Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Schellander, K. 2000. Mikrosatellitler ve kullanım alanları. **Hayvansal Üretim**, 41:9-14.

van Mansfeld, A.D., Bos, J.L. 1992. PCR-based approaches for detection of mutated ras genes. **PCR Methods Appl**, 1:211-6.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowskii J., Zoller, M. 1992. The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA. pp. 79-98, New York

Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., Crouse, J.D. 1991. Effects of Calcium-Chloride Injection and Hot Boning on the Tenderness of Round Muscles. **J. Anim. Sci.**, 69:4871-4875.

Whipple, G., Koohmaraie, M. 2010. Freezing and calcium chloride marination effects on beef tenderness and calpastatin. **J. Anim. Sci.**, 70:3081-3085.

Wulf, D.M., Morgan, J.B., Tatum, J.D., Smith, G.C. 1996. Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from limousin steers. **J. Anim. Sci.**, 74:569-576.

Yeh, F.C., Yang, R.-C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.-H., Mao, J.X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. In, University of Alberta, Canada (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/Pop32.exe>)

Yılmaz, O., Karaca, O. 2012. Karya koyunlarda mikrosatellit işaretleyicilerle babalık testi. **Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.**, 18:807-813.

Zhang, Y.Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. **Nature**, 372:425-432.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nezih ATA

Doğum Yeri ve Tarihi : 05/04/1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Yılmaz O. ,Yılmaz M. ,Cemal İ. ,Karaca O. ,Ata N., 2011. Karya Kuzularda Sütten Kesime Kadar Yaşama Gücü,7.Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, POSTER,14.09.2011. ADANA

Ata N., Cemal İ., 2010. Koyunlarda et verim ve kalitesini etkileyen büyük etkili genler, 6. Ulusal Zootečni Öğrenci Kongresi, POSTER, 19-21 Mayıs 2010. KONYA

Cemal, İ., Yılmaz, O., Karaca, O., Binbaş, P., Ata, N. 2012. Analysis of genetic diversity in indigenous Çine Çapari sheep under conservation by microsatellite markers. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Yayına gönderildi)

Katıldığı Projeler:

Karaca. O., Cemal, İ., Yılmaz, O., Ata, N., (2011-2016). Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi “Alt Proje: Aydın İli Karya Koyunu Geliştirme Projesi”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM).

Karaca. O., Cemal, İ., Yılmaz, O., Ata, N., (2011-2016). Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi “Alt Proje: Denizli İli Karya Koyunu Geliştirme Projesi”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM).

Cemal, İ., Karaca. O., Yılmaz, O., Ata, N., (2011-2016). Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi “Alt Proje: Aydın İli Kıl Keçisi Islahı”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM).

Cemal, İ., Karaca. O., Yılmaz, O., Ata, N., (2011-2016). Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi “Alt Proje: Denizli İli Kıl Keçisi Islahı”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM).

Karaca. O., Cemal, İ., Yılmaz, O., Ata, N., (2011-2016). Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi “Alt Proje: Eşme Kıvrıncığı Geliştirme Projesi”, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM).

Yılmaz, O., Karaca, O., Cemal, İ., Ata, N., Karya Koyunlarda Prolaktin Gen Polimorfizmi ile Döl Verim Özellikleri Arası İlişkiler Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu 2010-2011

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :Adnan Menderes Üniversitesi (Araştırma Görevlisi)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : nezihata@adu.edu.tr
nezih_ata@hotmail.com

Tarih :02.10.2012