



**ESMER IRKI SIĞIRLARD A IGF-II GEN
POLİMORFİZMİ İLE BAZI PERFORMANS
ÖZELLİKLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Esm a YUCA

**Yüksek Lisans Tezi
Zoote kni Anabilim Dalı
Biyometri ve Genetik Bilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Sinan KOPUZLU
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ESMER IRKI SIĞIRLARDA IGF-II GEN POLİMORFİZMİ İLE
BAZI PERFORMANS ÖZELLİKLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Esmâ YUCA

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
Biyometri ve Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**ESMER IRKI SIĞIRLARDA IGF-II GEN POLİMORFİZMİ İLE BAZI PERFORMANS
ÖZELLİKLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER**

Yrd.Doç.Dr. Sinan KOPUZLU danışmanlığında, Esma YUCA tarafından hazırlanan bu çalışma, 29/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Zootekni Anabilim Dalı Biyometri ve Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr.Mehmet TOPAL

İmza :

Üye : Doç.Dr.Memiş ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Yrd.Doç.Dr. Sinan KOPUZLU (Danışman)

İmza :

Yukarıdaki sonuç:

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **06.07/2017** tarih ve **27/34** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ESMER IRKI SIĞIRLARDA IGF-II GEN POLİMORFİZMİ VE SÜT VERİM ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİLER

Esmâ YUCA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı
Biyometri ve Genetik Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Sinan KOPUZLU

Bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi İşletmesi ve Erzurum ili Ilıca bölgesinde özel bir işletmede yetiştirilen Esmer sığırlarında yürütülmüştür. Araştırmada, IGF-II gen lokusu bakımından genotipik yapılar incelenmiş ve ilgili genler bakımından sığırlara ait genotip ve allel frekanslarının dağılımı belirlenmiştir. Belirlenen IGF-II genotipleri gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt verimi gibi verim özellikleriyle ilişkilendirilmiştir. IGF-II gen lokusu bakımından genotipik yapıların incelenmesi için her iki işletmede yetiştirilen 114 baş Esmer sığırlardan kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri PCR-RFLP yöntemi kullanılarak IGF-II genotipleri belirlenmiştir. IGF-II genotipleri ile süt verimlerinin ilişkilendirilmesindeyse Erzurum ili Ilıca bölgesinde bulunan özel bir işletmeden alınmış siğir ırkının süt verim kayıtları kullanılmıştır.

Araştırma da incelenen siğir popülasyonunun Hardy-Weinberg genetik denge testine göre genotip frekansları dağılımının dengede olduğu ($P>0.05$) gözlenmiştir. Popülasyonda bulunan IGF-II genine ait CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla 41(%34), 65(%54) ve 14(%12) olup, C allelinin frekansı 0,61 ve T allelinin frekansı 0,39 olarak bulunmuştur.

Gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt veriminin genel ortalamaları sırasıyla 4317 ± 272.9 kg, 5277 ± 240.7 kg, 238 ± 15.5 gün ve 18 ± 09 kg iken, CC, CT ve TT genotiplerinin gerçek süt verimine ait ortalamaları sırasıyla, 4168 ± 515.8 , 3756 ± 321.7 ve 5382 ± 600.3 kg; 305 günlük süt verimi ortalamaları 5420 ± 454.9 , 4898 ± 283.6 ve 5632 ± 529.3 kg; laktasyon süreleri 221 ± 29.2 , 225 ± 18.2 ve 281 ± 34.0 gün ve günlük süt verimi ortalamaları 19 ± 1.7 , 17 ± 1.1 ve 19 ± 2.0 kg olarak bulunmuştur.

Yapılan istatistik analizlere göre gerçek süt verimine, 305 günlük süt verimine, laktasyon süresine ve günlük süt verimine genotipin, genotip X laktasyon sırası ve genotip X buzağılama mevsimi etkisi önemsiz; 305 günlük süt verimine ve günlük süt verimine genotip X yaş etkisi önemli ($P<0.05$); genotip X yaş etkisi önemli ($P<0.01$) olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, Esmer sığırlardan alınan kan örneklerinden PCR-RFLP yöntemi kullanılarak IGF-II genotipleri tespit edilmiştir. IGF-II gen polimorfizmi bakımından tespit edilen genotip ve allel frekansları ırkın genotip çeşitliliğini ortaya koymada yeterli sayılabilir. Yapılan ilişkilendirme analizinde, IGF-II genotipleri ile incelenen performans özellikleri arasındaki ilişkiler anlamlı bulunamamıştır.

2017, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: IGF-II, polimorfizm, Esmer İsviçre, performans, süt verimi

ABSTRACT

Master Thesis

RELATIONSIP BETWEEN IGF II GENE POLYMORPHISM AND SOME PERFORMANCE TRAITS IN BROWN SWISS

Esma YUCA

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of of Animal

Department of Biometry and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Sinan KOPUZLU

This study was carried out in Brown Swiss cattle reared in the Experimental Station of Agriculture Faculty in Ataturk Universty and in a private enterprise found in region Ilca of Erzurum city. In the study, genotypic structures were examined in terms of IGF-II gene locus, and the distribution of genotypes and allele frequencies of the cattle in relation to the genes were determined. The identified IGF II genotypes were associated with milk yield traits such as actual milk yield, 305 day milk yield, lactation period and daily milk yield. The blood samples were taken from 114 Brown Swiss cattle raised on both farms for the examination of genotypic structures for IGF-II gene locus. IGF-II genotypes were determined by using PCR-RFLP method. When IGF-II genotypes were associated with milk yields, only milk yield records in in a private enterprise found in region Ilca of Erzurum city. were used.

In the study, it was observed that the distribution of genotype frequencies was stable ($P > 0.05$) according to the Hardy-Weinberg genetic equilibrium test of bovine population examined. The CC, CT and TT genotype frequencies of the IGF-II gene found in the population were 41 (34%), 65 (54%) and 14 (12%) respectively and the frequency of the C allele was found to be 0.61 and the frequency of the T allele was found to be 0.39.

The general averages of actual true milk yield, 305 day milk yield, lactation time and daily milk yield were 4317 ± 272.9 kg, 5277 ± 240.7 kg, 238 ± 15.5 days and 18 ± 09 kg, respectively, while CC, CT and TT genotypes 4168 ± 515.8 , 3756 ± 321.7 and 5382 ± 600.3 kg, respectively; the 305-day milk yield averages 5420 ± 454.9 , 4898 ± 283.6 and 5632 ± 529.3 kg; lactation periods were 221 ± 29.2 , 225 ± 18.2 and 281 ± 34.0 days, respectively, and mean daily milk yields were found as 19 ± 1.7 , 17 ± 1.1 and 19 ± 2.0 kg respectively.

According to the statistical analysis, the effect of genotype, genotype x lactation order and genotype x season of calving interaction were nonsignificant for averages of actual milk yield, milk yield adjustment to 305 day, lactation period and day milk yield. The effect of genotype x age interaction were significant ($P < 0.05$) for average milk yield adjustment to 305 day and day milk yield. The effect of genotype x age interaction on the actual milk yield was found to be highly significant ($P < 0.01$).

As a result, correctly identified IGF-II genotypes were detected by using the PCR-RFLP method in the blood samples obtained from Brown Swiss cattle. Genotype and allele frequencies determined for IGF-II gene polymorphism can be considered sufficient to demonstrate the genotype diversity of the race. In the analysis of the association, relationships between IGF-II genotypes and performance characteristics examined were not significant

2017, 55 pages

Keywords: IGF-II, polimorfizm, Brown Swiss, performance, milk yield

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2016-2017 Eğitim-Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Yüksek Lisans Tez Çalışması olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmada danışmanlığımızı üstlenen, tezin her aşamasında yardımını, desteğini ve fikirlerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Sinan KOPUZLU sonsuz teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Eğitimim süresince yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR'e ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer Cevdet BİLGİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarının çeşitli aşamalarında sürekli yardımını gördüğüm zootekni bölümü doktora öğrencisi Zeynep SÖNMEZ'e, hayvanlardan kan numunelerinin alınmasında yardımcı olan Veteriner Hekim Akif AYDIN'a, ayrıca verim kayıtlarının ve kan numunelerin alınmasına imkân sağlayan başta Erdoğan Entegre Tarım ve Hayvancılık İşletmesi sahibi Turgay Erdoğan ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm hayatımız boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen aileme, teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Esma YUCA

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF)	5
1.2.1. Tarihçesi	5
1.2.2. IGF.....	6
1.2.3. IGF-II.....	7
1.2.3.a. IGF-II'nin süt performansına etkisi	9
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	18
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Hayvanlardan kan alımı.....	18
3.2.2. Kullanılan çözeltiler	19
3.2.3. Genomik DNA izolasyonu	19
3.2.4. DNA'nın kalitatif tayini	20
3.2.5. DNA'nın kantitatif tayini	21
3.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi	21
3.2.6.a. PCR prensipleri.....	21
3.2.7. PCR gerekli maddeler	23
3.2.8. PCR amplifikasyonu.....	26
3.2.9. PCR ürünlerinin gözlenmesi	26
3.2.10. Restriksiyon enzimleriyle DNA'ların kesimi.....	27
3.2.11. Örneklerin yüklenmesi ve yürütme işlemi	27

3.2.12. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	28
3.2.13. Süt verimlerinin tespiti ve hesaplanması.....	28
3.2.14. İstatistiksel analizler	29
3.2.14.a. Süt verim özelliklerinin analizleri	29
3.2.14.b. Genotip frekanslarının hesaplanması.....	30
3.2.14.c. Populasyonların Hardy-Weinberg prensibine göre genetik denge analizi ..	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	34
4.1. DNA'nın kantitatif tayini	34
4.2. PCR sonuçlarının gözlenmesi	34
4.3. PCR-RFLP sonuçları.....	35
4.4. Genotip ve allel frekanslarının dağılımı	35
4.5. Hardy-Weinberg Genetik Denge Testi.....	36
4.6. IGF-II genotipleri ile bazı performans özellikleri arasındaki ilişkisi	37
4.6.1. Gerçek süt verimi	38
4.6.2. 305 günlük süt verimi.....	40
4.6.3. Laktasyon süresi	42
4.6.4. Günlük süt verimi	45
5. SONUÇ	47
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
cDNA	Complementary DNA(Komplementer DNA)
CpG	Central pattern generator(Merkezi desen üretici)
CYP21	Steroid-21-Hidroksilaz
dak	Dakika
ddH ₂ O	Double-distilled water
DMRs	Farklılaşan metillenmiş bölgeler
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonukleosit Trifosfat
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (Etilendiamin Tetra Asetik Asit)
EtBr	Ethydium Bromide (Etidyum Bromid)
g	Gram
G	Guanin bazı
GH	Büyüme hormonu
Hap	Haplotip
He	Expected Heterozygosity(Beklenen Heterozigotluk)
H-E	Hardy-WeinbergEquilibrium(Hardy-Weinberg Dengesi)
Ho	Observed Heterozygosity (Gözlenen Heterozigotluk)
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörleri
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörleri I
IGF-II	İnsülin benzeri büyüme faktörleri II
IU	International Unit (Uluslararası Birim)
Kb	Kilo baz
KCl	Potasyum klorür
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
LD	Bağlantı dengesizliği(linkage disequilibrium)
LSM	En küçük kareler ortalaması

m	Metre
M	Molar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Messenger RNA (Mesajcı Ribo Nükleik asit)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NaCl	Sodyum Klorür
nDNA	Nuclear deoxyribonucleic acid (Nükleer deoksiribonükleik asit)
ng	Nanogram
NSILA	Non-suppressible insulin like activity (Bastırılmayan insülin benzeri aktivite)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
QTL	Quantitative trait locus (Kantitatif karakter lokusu)
QTN	Quantitative trait nucleotides (Niceliksel nitelik nükleotidleri)
RBC	Red Blood Cell
RE	Restriction Endonuclease (Restriksiyon Endonükleaz)
RFLP	Restriction fragment lenght polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm)
rpm	Rotor Per Minute (Bir Dakikadaki Rotor Devir Sayısı)
SNP	Single Nucleotid Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
TBE	Tris Borik asit EDTA
Tm	Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)
UV	Ultra violet (Ultra Viyole)
V	Volt
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İsviçre Esmer sığır ırkı inek ve boğası	2
Şekil 1.2. İnsülin benzeri büyüme faktörleri sistemi	7
Şekil 1.3. H19 ve IGF-II genlerinde karşılıklı çapraz baskılanma	8
Şekil 3.1. PCR aşamaları	23
Şekil 4.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Görünütüsü	35
Şekil 4.2. IGF-II genine ait PCR-RFLP kesim bölgeleri: CC;32-185, CT;32-67-118- 185, TT;118-67-32 bp.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. IGF-II geninin primer dizilimi.....	24
Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve IGF-II geninin PCR döngü koşulları	26
Çizelge 3.3. Restriksiyon enzimi, tanıma bölgeleri ve beklenen bant uzunluğu	27
Çizelge 4.1. NanoDrop’da okunan DNA’ların kantitatif sonuçları	34
Çizelge 4.2. Esmer Populasyonuna ait genotip ve allel frekansları ile standart hatası...36	
Çizelge 4.3. IGF-II genotip frekansları, hardy weinberg genetik denge testi ve X^2 bağımsızlık testi ve sonuçları.....	36
Çizelge 4.4. IGF-II genotip bakımından bazı performans özelliklerine ait varyans analiz sonuçları	37
Çizelge 4.5. Gerçek süt verimi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (kg)	39
Çizelge 4.6. 305 günlük süt verimi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (kg)....	41
Çizelge 4.7. Laktasyon süresi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (gün)	44
Çizelge 4.8. Günlük süt verimi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (kg)	46

1. GİRİŞ

Günümüzde dünyanın karşı karşıya kaldığı küresel ısınma, iklim değişiklikleri, doğal alanların tahrip edilmesi, artan sanayileşmeyle birlikte sanayi artıklarının artması, dünya nüfusundaki artışa bağlı olarak miktar ve kalite yönünden besin maddelerine olan ihtiyacın giderek artış göstermesi, yeterli ve dengeli beslenmenin sağlanmasında çiftlik hayvanlarının önemini her geçen gün artırmaktadır (Mercan ve Okumuş 2004; Özdemir 2006; Sönmez 2013).

Dünya nüfus artış hızı yaklaşık olarak gelişmiş ülkelerde %0,5-1,0 gelişmekte olan ülkelerde %2-3 (Çamurcu 2005) ve ülkemizde ise %1,35 (Anonim^a 2016) oranlarında seyretmesi, beraberinde beslenme ihtiyacının özellikle hayvansal protein ihtiyacının giderilmesini gerektirmektedir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de bu ihtiyacın giderilmesinde sığır varlığının ve verim potansiyelinin büyük önemi vardır.

Dünyada hayvan yetiştiriciliği açısından özellikle ikinci dünya savaşından sonra yoğunlaşma üretim üzerine olmuş ve ırkların verimleri açısından özelleşmesi ile dünyada birkaç ırk yetiştiriciliğinin yaygınlaşmasına sebep olmuştur (Devrim ve Kaya 2004).

İleri tarım tekniği ve hayvancılık sektörü gelişmiş ülkelerde, hayvancılığın temelini ve merkezini hayvan başına et ve süt verimi daha fazla olan sığır yetiştiriciliği oluşturmaktadır. Hayvancılık sektörü içerisinde süt sığırcılığı ayrı ve önemli bir yere sahiptir. Ülkelerin gelişmişlik düzeyine bağlı olarak çeşitlilik gösterse de dünyada süt üretiminin yaklaşık %93'ü sığırlardan elde edilen sütlerden elde edilmektedir (Hodoğlugil 1996; Kopuzlu 2003).

Günümüzde, dünyada süt verim yönlü verim kapasitesi oldukça yüksek olan ve yaygın bir şekilde yetiştiriciliği yapılan süt sığırı ırkları mevcuttur. Değişik ekolojik şartlarda

farklı ülkelerde yürütülen ıslah çalışmaları sonunda Siyah Alaca, İsviçre Esmeri, Jersey, Guernsey ve Ayrshire gibi en önemli süt ırkları geliştirilmiştir (Özhan vd 2012).

Değişik çevre şartlarına karşı uyum kabiliyeti iyi olan İsviçre Esmeri 1925 yılında Avustralya'dan Karacabey Harasına getirilmiş olup hem saf olarak yetiştirilmiş ve hem de halk elinde yerli sığırların ıslahında kullanılmıştır (Erdem 1997).

İsviçre'nin kuzey doğusunda yer alan Schwyz bölgesinde geliştirilen İsviçre Esmeri, çeşitli engebeli meralarda otlama kabiliyeti iyi olan sağlam yapılı, farklı bakım, beslenme ve iklim şartlarına uymada yüksek kabiliyetli, süt ırkları arasında geç gelişen, kombine verimli iri bir ırktır. İsviçre Esmeri kombine verimin başında süt verimi gelmektedir (Akman 1998; Özhan vd 2012). Ülkemizde çeşitli yer ve yıllarda İsviçre Esmeri ırkı ile yapılan süt verimi ile ilgili çalışmalarda 305 günlük süt verimi, yaklaşık 2500 kg dan 6000 kg'a kadar bir süt verimine sahip olduğu bildirilmiştir (Tüzemen vd 1998; Çakıllı ve Güneş 2007).

Son istatistiklere göre Türkiye'de kültür hayvanı sayısını yaklaşık olarak 6.6 milyon olup Esmer İsviçre her yaştan 2.7 milyon melez ve saf ırkı bulunmaktadır (Anonim^b 2016).



Esmer İneği



Esmer Boğası

Şekil 1.1. İsviçre Esmer sığır ırkı inek ve boğası (Anonim 2012)

Erzurum Atatürk Üniversitesi Tarım İşletmesi'nde sığır yetiştiriciliği 1961 yılında başlamıştır. İşletmenin sığır varlığı, bölgenin ekolojik ve mevcut yerli ırkları dikkate alınarak İsviçre Esmeri ırkıyla oluşturulmuştur (Akbulut 1990). İşletmede, başlangıçta sürü kayıt sistemi kurularak sığırlarda adaptasyon çalışmalarına başlanmış olup zamanla bölgedeki farklı işletme şartları için yetiştirme yöntemleri geliştirilerek günümüzde bölge yetiştiricilerine hem teknik ve hem de damızlık hayvan temini için yardımcı olunmaktadır. Erzurum ilinde, özel sektör tarafından kurulan çok sayıdaki sığircılık işletmelerinde sığır ırkı olarak Esmer İsviçre ırkı hem süt sığircılığı ve hem de et sığircılığı için yoğun olarak tercih edilmektedir. Nitekim 2016 verilerine göre Erzurum'da toplam sığır varlığının %12,39'unu Esmer İsviçre ve %60'ını ise Esmer İsviçre melezi sığırlar oluşturmaktadır (Anonim^c 2016)

Ülkemiz sığır yetiştiriciliğinde ulaşılan verim artışı nedenleri arasında, bakım-besleme, alt yapı gibi pek çok diğer çevre şartlarının iyileştirilmesi, hayvan ithali ve melezleme çalışmaları sonucunda sığır popülasyonunun genetik yapısında meydana gelen değişiklikler olarak belirtilmiştir (Hodoğlugil 1996; Erdem 1997).

Hayvanlardan elde edilen verim yani fenotip, çevre ve genotipin ortak etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Hem çevreyi ve hem de genotipi iyileştirmek veya ıslah etmek verimin artmasına sebep olmaktadır. Verimi esas alan ıslah çalışmalarında üzerinde durulan ilk konu, hayvanın genotipinde mevcut olan verim potansiyelini ortaya koyacak uygun çevre şartlarının sağlanmasıdır. Günümüzde, hayvanlardan maksimum verim alınabilmesi için çevre etkisini olumlu yönde düzenlenmesi ve hayvanın içinde bulunduğu ortamın optimize edilmesi entansif hayvancılıkla mümkün olmaktadır. Verim artışında genotipi iyileştirme çabaları daha etkili, rantable ve sürekli olmasına rağmen uygulanması daha güç, spesifik ve zaman alıcı olmaktadır. Nitekim hayvanlarda üstün fenotipi oluşturmak, karakteri etkileyen iyi ve verimli genleri tespit edip genotipte istenen genleri bir araya getirerek ve genler arası etkileşimden faydalanmakla mümkündür. Çiftlik hayvanlarından elde edilen verilere ait karakterler hem çok sayıda genin kontrolü altında hem de çevre faktörleri tarafından büyük ölçüde etkilenmektedirler. Bundan dolayı bu karakterlerde fenotipik değer çoğu zaman

genotipik değeri yansıtamadığından fenotipe dayalı seleksiyon da verimlilikte azalmalar gözlenmektedir. Bu nedenle fenotip, çoğu zaman genotipin iyi bir göstergesi olamadığından ele alınan karakterin genotipik değerinin tahmin edilmesi oldukça önem arz etmektedir. Günümüzde genotipi iyileştirme çalışmaları, laboratuvar metod ve tekniklerinin gelişmesi ve teknolojik şartların ilerlemesiyle melezleme ve seleksiyon gibi klasik ıslah metotlarından daha ileri boyutlara çekilmiştir (Özdemir 2001).

Düzgüneş (1976), hayvanların hayatsal sıvı veya belirli vücut sıvılarında biyokimyasal unsurların kalitatif yönlerinin iyi bir göstergesi olduğunu ve Soysal (1983) ise polimorfik özelliğe sahip bu karakterlerin bir gen yerinde lokalize olmuş bir dizi eşgenlerin kombinasyonu ile oluşan homozigot veya heterozigot tiplerden oluştuğunu, eşgenler ise aralarında kodominantlık göstermekte ve bundan dolayı ele alınan karakterlerde fenotipik değer genotipik değeri verdiğini bildirmişlerdir.

Son yıllarda, kan parametrelerinin bazı polimorfik özellikleri ile kantitatif karakterler arasındaki ilişkinin varlığını belirlemesine ve bundan seleksiyonda faydalanmak için bir çok çalışma yürütülmektedir. Bu tip çalışmaların temelinde polimorfik karakterlerinde genotipin fenotipe eşdeğerde olduğunun bilinmesi, otozomal bir kalıtım yolunun izlemesi, genetik mekanizmanın basitliği ve genetik yapının kolayca belirlenmesi gibi faktörler yatmaktadır. Böylelikle polimorfik özellikler ile kantitatif karakterler arasında bir ilişkinin varlığının belirlenmesiyle erken yaşta kan karakterleri tespit edildiğinde dolaylı seleksiyonu mümkün kılmakta, generasyon arası süre kısaltılmakta, yetiştirme sistemleri yönlendirilebilmekte, popülasyonun genetik yapısı analiz edilebilmekte ve süreç içerisinde gen frekanslarında görülen değişimlerde gözlenebilmektedir (Ülker vd 1999).

İrkin tanımlanmasında kullanılan morfolojik özellikler, kan grupları ve biyokimyasal polimorfizm gibi kıyasların yanında, genomu doğrudan inceleyen yöntemlerle, birbirine yakın ırkların yanı sıra, aynı ırka ait ailelerin ya da bireylerin tanımlanmasındaki başarı şansı artmaktadır. Tüm dünyada moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar baş döndürücü bir hızla devam etmektedir. Bundan yararlanılarak popülasyondaki genetik

varyasyon, bireylerin Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'larından hareketle moleküler düzeyde ortaya konabilmektedir (Özdemir 2006).

Son yıllarda geliştirilen DNA'ya dayalı olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP) analizi moleküler teknikler, cinsiyet gözetmeksizin çok erken yaşlarda genotipleri tanımlama imkanı sağlamaktadır. Bu sayede yapılan çoğu çalışma ile yüksek verimli hayvanların erkenden tanımlanması ve genotiplerin verim özellikleriyle büyüme performansı için damızlık değerlerinin tespitinde bir süreç olarak kullanılmaktadır (Özdemir 2001).

Çalışmamızın amacı, Atatürk Üniversitesi Ziraat İşletmesi ve Erzurum ili Ilıca bölgesinde özel bir işletmede yetiştirilen Esmer ırkı süt sığırlarında insülin benzeri büyüme faktörleri-II (IGF-II) gen lokusu bakımından genotipik yapılarını incelenmek, ilgili gen bakımından sığırlara ait genotip ve allel frekanslarının dağılımını ortaya koymak ve verim ile ilişkilendirmektir.

1.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF)

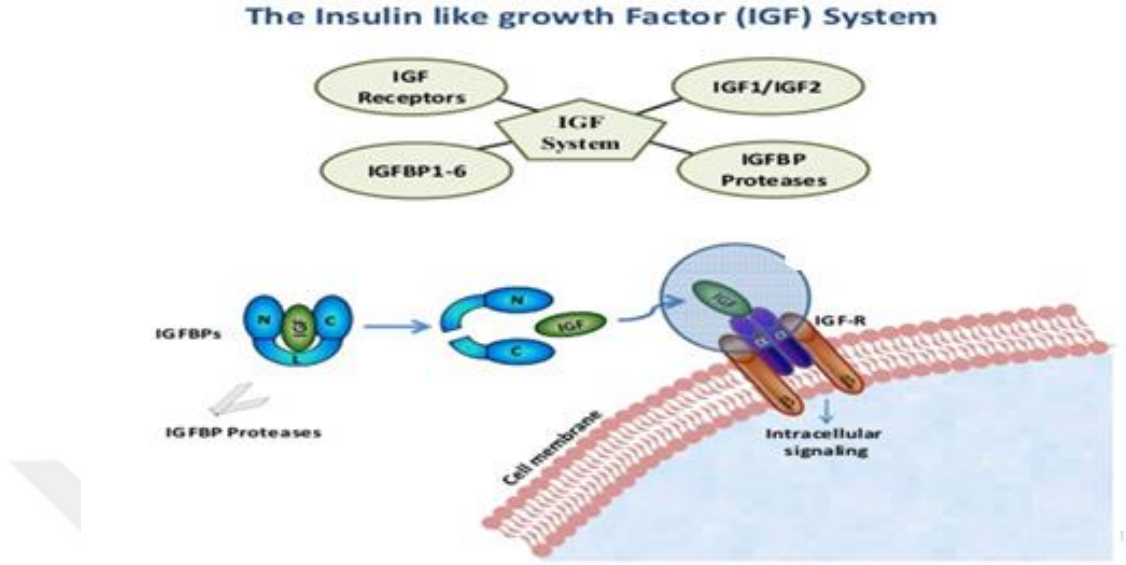
1.2.1. Tarihçesi

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), serum düzeyleri Büyüme Hormonu (Growth Hormone; GH) tarafından kontrol edilen bazı yönden GH'a bağımlı ve GH'nun mitojenik ve anabolik etkilerinden birçoğuna aracılık eden peptid grubunun bir üyesidir. Salmon ve Daughaday'nun (1957) yaptıkları çalışmada, kıkırdak dokuda GH'ın fonksiyonlarını incelemiş olup GH'nın in vivo şartlarda kartilaj hücrelerine sülfat bağlanmasını aktive ettiğini, fakat in vitro şartlarda bu özelliklerini gösteremediğini, in vitro koşullarda GH'nın tesiri altında olan ve sülfat bağlanmayı aktive eden "sülfatlanmayan faktör" denilen bir faktörün var olduğunu ve GH tedavisi ile sülfat alımının arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda GH'ın bu artışa doğrudan etkisinin olmadığını, bu etkilere aracılık eden "sülfatlayıcı faktör" adını verdikleri bir maddenin varlığını ortaya koymuşlardır.

Daha sonraki çalışmalarda anti-insülin antikoru ilave edilmesiyle bu etkinin ortadan kaybolduğu tespit edilmiş buna karşın aktivitenin etkilenmeyen kısmına da non-suppressible insulin like activity (NSILA) adı verilmiştir. Daha sonraları ise NSILA'nın insülin ile aynı etkiyi gösterdiği gibi yapısal olarak aynı madde olduğu belirlenmiş ve insan serumundan elde edilmiş iki protein, purifiye edilerek aminoasit dizilimleri ortaya konmuştur. 1972 yılında yapılan bu konudaki çalışmada ise bu maddenin iskelet dokusunda ve diğer dokularda büyümeyi uyarıcı etkileri belirlenmiş ve "somatomedin" adını almıştır (Yaylalı 2009; Arıkan 2013). Bu maddeye Rinderknecht ve Humbel tarafından 1978 yılında IGF-I ve IGF-II isimleri verilmiştir

1.2.2. IGF

IGF sisteminde IGF-I ve IGF-II, IGF bağlayıcı proteinlerden (IGFBP-1-6) ve IGF reseptörlerinden (insülin reseptörü, tip I IGF ve tip II IGF) oluşmaktadır (Keleş ve Türkeli 2005; Bakır ve Kocamış 2011). IGF ve spesifik hücrelerde büyümeyi uyarıcı, proinsüline benzeyen hücresel büyüme ve farklılaşma ile anti-apoptozis de önemli role sahip mitojenik özellikteki proinsülin gibi üç disülfid bağı içeren tek zincirli polipeptid hormon olup genellikle lokal olarak etki gösterir. IGF'ler etkilerini zardaki kendilerine özgü reseptörlerine bağlanarak gösterirler. Çünkü protein yapıları sebebiyle hücre zarlarını geçemezler. IGF'ler hemen hemen tüm organların fonksiyonlarında etkiliyken, insülin ise kas, yağ ve karaciğer dokusunda etkilidirler (Yaylalı 2009; Arıkan 2013; Akkaya 2014). IGF-I 70 aminoasit dizisi, IGF-II ise 62 aminoasit dizisi içerir ve birbirlerine benzerlik oranı %62'dir. IGF-I ve IGF-II proinsülin arasında aminoasit dizisi benzerlik oranları sırasıyla 26(%43) ve 25(%41)'dir (Keleş ve Türkeli 2005; Harbili 2008; Yaylalı 2009).



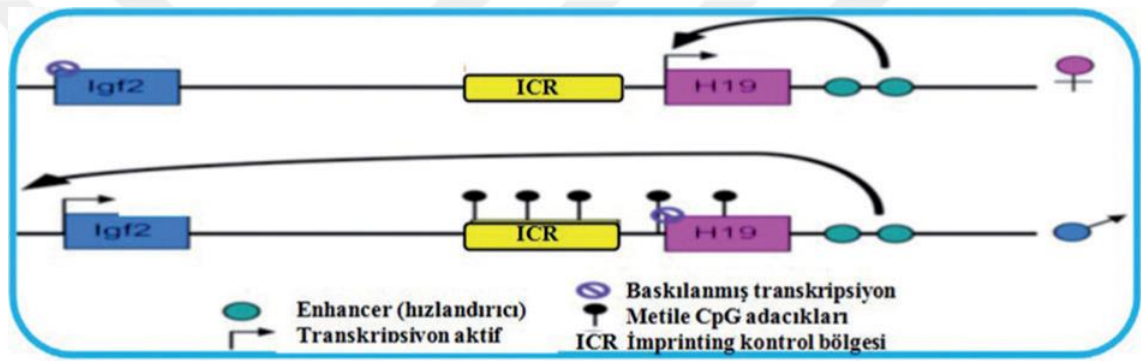
Şekil 1.2. İnsülin benzeri büyüme faktörleri sistemi (Anonim 2014)

1.2.3. IGF-II

En yoğun çalışılan baskılı memeli gen IGF-II (insülin-benzeri büyüme faktörü II) olup yapısal olarak insülin ilişkin fetal mitojenik proteindir (Zeric 2012). Çeşitli araştırmacılar ortak sonuç olarak IGF-II'nin fare, insan, sıçan, koyun, sığır ve domuzlarda baskılanmış olduğunu tespit etmişlerdir (Stinckens 2010; Zeric 2012; Güngör 2015; Smith *et al.* 2015). Bu gen farklı türlerde farklı kromozomda bulunur. Örneğin domuzlarda 2., farelerde 7., insanlarda 11., atlarda 12., koyunlarda 21. ve sığırlarda 29. kromozom üzerinde bulunmaktadır (Goodall and Schmutz 2003; Güngör 2015).

IGF-II embriyonik gelişimde önemli bir etkiye sahip olup yaşa bağlı olarak da daha az değişim gösteren ve IGF-I reseptöründen farklı yapıda bir reseptöre bağlanarak intrauterin yaşamda büyümeden sorumludur (Yaylalı 2009; Arıkan 2013). Embriyonik dokuların çoğunun IGF-II geninin maternal kopyasının aktif olmadığı paternal kökenli allelin ise uygun olduğu yani aktif olduğu görülmüştür (Zeric 2012; Güngör 2015).

IGF-II, H19 ile bir gen kümesi oluşturur (Zeric 2012). IGF-II, H19'un bulunmaması halinde kendini daha fazla göstererek fetüsün anormal olarak hızla büyümesine yolaçar. Bu iki gen baskılanmış bir gen kümesi oluşturmakta ve birlikte kontrol edilmektedirler. IGF-II ve H19 genleri paternal metilasyon göstermektedir (Şekil 1.1). Paternal allelede H19 ile IGF-II'yi kontrol eden imprinting kontrol bölgesi metilasyona uğrayınca, IGF-II geni aktif hale geçerken H19 geninin etkisi baskılanmaktadır. Maternal allelede ise bu kontrol merkezinde metilasyon olmadığı için IGF-II geni inaktif, H19 geni ise aktif durumdadır (Kaffer 2000; Güngör 2015).



Şekil 1.3. H19 ve IGF-II genlerinde karşılıklı çapraz baskılanma (Harbili 2008)

Yapılan birçok çalışmada, kemiricilerde ve birçok türde IGF-II'nin fetal gelişiminde önemli etkilerinin olduğu doğumdan sonraki dönemde de birçok dokuda büyümeyi, diferansiyasyonu arttırdığı ve çeşitli karkas özellikleri arasında ilişki bulunduğu belirtilmiştir (Harbili 2008; Yaylalı 2009; Arıkan 2013; Güngör 2015). Ayrıca IGF-II'nin temel fonksiyonu fetal büyümenin kontrolünde yer alsa da, Zhang ve Li (2008) bu konuda yaptıkları bir çalışmada, IGF-II'nin yetişkin büyümesi üzerinde de etkili olduğunu bildirmiştir. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada ise IGF-II geninin yok edilmesi durumunda intrauterin ve perinatal büyümeyi geciktirdiği, postnatal hipofizektomi yapılan sıçanlarda ise IGF-II infüzyonunun büyümeyi uyarmadığı bildirilmiştir (Harbili 2008).

IGF-II'nin aşırı ekspresyonu aşırı büyüme, büyüme bozukluğu ve artan neoplazi frekanslarına yol açan Wiedemann-Beckwith sendromu gibi genetik sendromları

uyarabilir. IGF-II'nin fazla ekspresyonu olan transgenik fareler organ aşırı gelişimini ve tümör oluşumunu göstermektedir (Zhang and Li 2008).

Yapılan bir çalışmada IGF-II ile ilişkili bir bölgede (IGF-II-intron3-3072) SNP (Single Nucleotid Polymorphism, Tek Nükleotid Polimorfizmi) (A>G) domuzlarda tespit edilmiş, bu polimorfizmin kalp büyüklüğüne ve kas büyümesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Güngör 2015).

IGF-II'nin domuzlarda fertilite ve yaşama gücü özellikleri, canlı ağırlık, et verimi, karkas özellikleri ve siyah renk üzerine etkisi olduğu, memelilerin kas büyümesinde önemli bir rolü olan IGF-II'nin et sığırlarında et özellikleri, kalitesini ve vücut ağırlığı ile ilişkilendirilirken, sütçü sığırlarda ise süt verimini etkilediği belirtilmektedir (Stinckens 2010; Güngör 2015; Smith *et al.* 2015).

IGF-II geninin domuzlardaki etkisine benzer bir çalışma sığırlar üzerinde de yapılmış sığırlarda bu gen için saptanılan SNP'lerin çeşitli özelliklere etkisinin tartışmalı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca embriyonik dönemden ergin döneme kadar meme bezlerinin gelişmesinde IGF-II'nin etkili olabileceği (Güngör 2015) ve buna ek olarak sığırlarda IGF-II'nin sığır göz bölgesi üzerindeki etkisi de bildirilmiştir (Zhang and Li 2008).

Koyunlarla ilgili yapılan çalışmalarda maternal alleldeki IGF-II'nin baskılandığı ve bu sebeple H19 transkripsiyonunun maternal allelden olduğu belirtilmiştir (Güngör 2015).

1.2.3.a. IGF-II'nin süt performansına etkisi

Meme bezi gelişimi hayvanın yaşamı boyunca geniş bir periyoda yayılır. Meme bezlerinin morfolojik gelişimi embriyonik gelişim sırasında başlar ergenlik, hamilelik, laktasyon ve involüsyon yoluyla postnatal dönemlerde gen ekspresyon modellerine bağlı olarak hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptoz dönemlerine kapsar (O'Doherty *et al.* 2015). Epigenetiğin, meme bezi gelişiminde rol oynadığı

düşünülmektedir ve bu konuda yapılan çalışmalar IGF-II'nin bu sürece dahil olabileceğini göstermiştir. Lokal IGF-II infüzyonunun keçilerde süt üretimini arttırdığını, farelerde, meme bezlerinde prolaktin etkisini kolaylaştırmıştır. Laktasyondaki keçilerde lokal infüzyon IGF-II'nin süt sentezini arttırmıştır. Protein verimi ve süt verimi için tahmini üreme değeri C/C ve C/- hayvanlara kıyasla C nükleotidi (- / - genotipi) olmayan hayvanlarda daha yüksek çıkmıştır (Bagnicka *et al.* 2009; O'Doherty *et al.* 2015).

Fareler meme bezi gen ekspresyonu ve karşılaştırmalı haritalama kombinasyonunu kullanarak elde edilen sonuçlar, IGF-II'nin sığırlarda süt üretim özelliklerini etkileyen bir QTL için aday bir gen olduğunu keşfetmişlerdir (Ron *et al.* 2007; Bagnicka *et al.* 2009; O'Doherty *et al.* 2015). Başka bir çalışmada ise Holstein-Friesian boğalarda süt verim oranları, süt yağı verimi ve süt protein verimliliği için IGF-II ve tahmini üreme değerleri arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Zeric 2012). Bazı araştırmacılar süt verimleriyle olan IGF-II ilişkilerinin, laktasyonun düzenlenmesine katkıda bulunan proksimal INS (insülin) genindeki komşu varyantlarla bağlantı dengesizliğinde (LD) bulunan SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Tek Nükleotid Polimorfizmi) allellerine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (O'Doherty *et al.* 2015).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çin’de yetiştirilen 270 baş sığır ırkı üzerinde IGF-II gen dizisini belirlemek, 3. ve 10. Ekson bölgelerinde bulunan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tanımlamak amacıyla Curchoe *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada fetal, yeni doğan buzağılarda ve ergin bireylerde IGF-II geninin ekspresyonunun yaş, doku, promotör bölgeleri ve allel bölgelerinin farklılıkları ile özel promotör bölgelerine göre seçilmiş farklı doku ve organlardan izole edilen IGF-II Komplementer DNA (cDNA) örneklerine göre ölçülmesini ve gen sekans analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada sığırlarda IGF-II geninin çoklu promotör bölgeleri, poliadenilasyon, alternatif splising bölümleri ve genetik baskılama miktarlarının ölçülmesi sonucu kapsamlı transkripsiyon regülasyon oranlarına tabi tutularak insan ve farelerde benzerlik gösterdiğini bulmuşlardır. Ancak incelenmiş örneklerin hemen hemen tümünde IGF-II geninin yaş, doku, promotor ve özel allel bölgelerinde ekspresyonlarında temel farklılıklarının olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca incelenmiş tüm doku ve organlarda ve sığırlara yakın, koyun ve domuz ırklarında IGF-II geninin özel promotor bölgelerinin genetik imprinting sonucu yok olduğu sonucuna varmışlardır. Araştırmacılar sonuç olarak türlere özgü spesifik genetik imprinting tanımlanmasının hayvan klonlanmasında ve embriyo biyoteknolojilerinde kullanılabilirliğini ortaya koymuşlardır.

Gebert *et al.* (2006), kısmi sekans bilgisi sadece sığır IGF-II geni için mevcut olduğunu ve farklılaşan metillenmiş bölgeler (DMRs) için henüz tespit edilmemiş olduğundan preimplantasyon gelişimi sırasında gene özel metilasyon kalıpları üzerinde ileri çalışmalar için bir ön koşul olarak IGF-II geni içinde bir DMRs belirleyi amaçlamışlardır. Bu nedenle sığır IGF-II geninin 4., 5., 10. ekson ve 4. ve 5. intron için daha önce bilinmeyen bir DMRs tanımlanmasını kapsayan 5 çevrilmemiş bölge bir Central pattern generator (CpG) zengin DNA fragmanının dizi analizi belirlemişlerdir. Belirlenen dizi analizi için yapılan bisülfıt analizinde bu DMRs’lerin olgun oosit ve spermin farklı olarak metile olduğunu bildirmişlerdir. Sığır IGF-II geni gibi gelişimsel olarak önemli bir gen içerisindeki bir intragenik DMR’nin tanımlanması in vivo ve in

vitro elde edilen embriyoların metilasyon kalıplarını değerlendirilmesi için yararlı bir araç sağladığını öngörmüşlerdir.

Güney Kore’de yetiştirilen Berkshire domuzları üzerinde yapılan çalışmada, farklı metilasyon etkilerini domuz preimplantasyon embriyo gelişimi sırasında belirleyerek ispat etmeyi amaçlamışlardır. IGF-II/H19 geninde DMRs metilasyonunu sperm ve MI oositlerde analiz etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda spermin tamamının metile olduğu fakat MI oositleri metilenmemiş olarak kaldığını tespit etmişlerdir. Pronükleer aşamada metilasyon desenini belirlemek amacıyla, dolaylı olarak in vitro fertilizasyon, parthenogenesis ve androgenesis ile elde ettiği her zigot bölgesindeki IGF-II/H19 DMR3 metilasyon profilini karşılaştırmışlardır. Bu bölgenin farklı ebeveyn kökenlerine göre metillenmiş olduğu saptanmıştır DMR3 (farklılaşan metillenmiş 3.bölge) tam partenogenetik zigotların metile in vitro döllenmiş zigotlar içinde hemimethylated ve androgenetik zigotların demetile edilmesini sağlamışlardır. Bu sonuçlar, paternal alellerin kolaylıkla demetilasyonla aktive edildiği ve maternal allellerden birisinin de novo metilleştiğine işaret ettiğini ortaya koymuş ve daha erken embriyonik gelişim sırasında IGF-II/H19 DMR3 metilasyon etkilerini incelemişlerdir. İn vitro döllenmiş zigotlarda görüldüğü üzere, hemimethylated desen 4 hücreli embriyo aşamasına kadar gözlenmiştir. Ancak, bu işareti sadece 8-hücreli aşamada demethylize etmişler ve daha sonra morula aşamasında onarabilmişlerdir. Sonuç olarak metilasyon etkileri domuz embriyolarının erken embriyonik gelişimi sırasında dinamik değişiklikler yoluyla belirlenebileceğini ifade etmişlerdir (Park *et al.* 2008).

IGF-II geninin 2.ekzon bölgesinde BsrI/RFLP polimorfizmini belirlemek ve verimle ilişkilendirmek amacıyla Zhang *et al.* (2008) tarafından 126 baş Nanyang sığır ırkı ile çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda IGF-II allel frekanslarının C alleli için 0,69 ve T alleli için 0,31 olduğunu bulmuşlardır. TT genotipli bireylerde 6, 12 ve 24 aylık yaşta ki vücut ağırlıkları, vücut uzunluğu ve kalp çevresi ve 12, 18 ve 24 aylık yaşta ise kalça genişliği ölçülerinin diğer genotipli bireylere oranla daha yüksek olduğunu, ele alınan özelliklerin tamamında TT genotipli bireyler CC genotipli olanlara göre ortalamalarının

daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, genetik etki analizi IGF-II geninin biyolojik fonksiyon özelliklerine de ilave etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Bagnicka *et al.* (2009), 238 baş Holstein-Friesian süt sığır ırkında IGF-II genine ait daha önce tanımlanmış 2. Ekzon bölgesinde g.8656 C>T transisyon (RFLP-BsrI) nükleotidi ve ayrıca 6 baş hayvan DNA'sında 237 bp lik DNA dizisinin sekanslaması sonucu 10. Ekzon bölgesinde g.24507G>T transversiyon (RFLP-HaeIII) nükleotidini tanımlanıp PCR-RFLP tekniği ile tek nükleotid polimorfizmlerini belirlemişlerdir. Daha sonra genotiplerle hayvanlara ait süt verimlerinin ilişkilendirildiği çalışmada, CT/GT haplotipinin süt verim özellikleri ile doğrudan ilişkili olduğu ($P \leq 0.001$) ve en sık görülen CT/GG haplotipinin günlük süt verimlerinde diğer tanımlanmış haplotiplere oranla sütün protein ve yağ içeriği üzerine etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Curchoe *et al.* (2009), sığırlarda karaciğer, beyin, akciğer, böbrek ve kontrol buzağının plasentasında IGF-II/H19 arasında bir CpG zengin intergenik bölge 44 CpG bölgelerinin metilasyon durumunun sıralanmasında bisülfıt kullanılarak IGF-II/H19 allelik ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli olduğu düşünmüşlerdir. Bunun için Holstein sığırlarda 16. CpG ihtiva eden kısmındaki diferansiyel bölgeyi metile etmişlerdir. Buzağı döneminde klonlanmış dokularda DMR doğumdan hemen sonra ölen ya da komplikasyonlar nedeniyle kesilenler kısa bir süre içinde incelenip kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, klonlanmış hayvanların bazılarında DMR metilasyonunda önemli farklılıkların var olduğunu bulmuşlardır. Gözlenen varyasyonların çoğu hipometilasyona yakın eğiliminde olduğunu belirlemişler, klonların karaciğer ve plasentada DMR'nin hipometilasyonu, önceki gözlemlerin anormal olduğunu ve bu klonlarda IGF-II alel ekspresyonu ile H19 allelin biallelik ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Gebert *et al.* (2009), IGF-II genindeki son ekson için intrajenik DMR'de son tanımlamalar, embriyo gelişimi sırasında aktif olan sığır imprinting ve düzenleyici mekanizmaların derinlemesine soruşturulması için bir tanı aracı olarak, in vivo fertilizasyon ve kültür, SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer (Somatik hücre nükleer

transferi)), androgenesis veya partenogenezle invitro olarak üretilen sığır blastosisti bu DMR içinde cinsiyete özgü DNA metilasyonu kalıplarını karşılaştırmak amacıyla bisülfid analizini kullanmışlardır. İn vivo şartlarda oluşan DNA metilasyon embriyoları döllenmeden sonra, bu genlerin arasındaki DMR çıkarılmış durumda kısmen embriyonun blastosit aşamasına ulaştığı zaman bu farklılıklarda değişimler görülmüştür. İn vivo şartlarda gelişen embriyolar arasında, DNA metilasyon düzeyi erkek blastosisti, dişilere göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu cinsiyet farklılıklarını partenogenetik ve androgenetik embriyolar arasında tespit etmişler ve SCNT türetilmiş blastosit cinsel hücre dönürleri izlenerek SCNT embriyolar doğru metilasyon yeniden programlaması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Fagundes *et al.* (2010) Nellore (*B. taurus indicus*) ineklerden aldıkları yumurtalıkları kullanarak farklı bir çizgide gelişen gerekli özelliklere sahip olgunlaşmamış ve olgun sığır oositlerinde IGF-II son ekzonunun DMR üzerinde metilasyon numuneler kullanmışlardır. Geniş foliküller olgun oosit (%28,93), geniş foliküller gelen olgunlaşmamış oositlerin (%77,38 $P=0,002$) daha az metillenmiş ve aynı zamanda küçük foliküller olgun oosit (%52,58 $P=0,07$) geniş foliküller olgun oosit (%28,93) ile karşılaştırıldığında düşük metilasyon yönünde bir eğilim olduğu; küçük ve büyük foliküller olgun oosit sırasıyla %61,11(11/18) ve %40 (4/10) hipermetile dizilimi gösterirken, küçük ve büyük foliküller gelen olgunlaşmamış oositler, sırasıyla, %53,85 (13/07) ve %91,66 (11/12) hipermetile dizilimi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Zwierzchowski *et al* (2010) 11 ve 15 aylık 291 baş Polonya Siyah Alaca sığır karkaslarıyla. yem alımı ve dönüştürülmesi, büyüme oranları ve et verim özellikleri 2. ekzonda 292. baz çiftinin sitozin timin dönüşümü RFLP-Bsrl tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada; 11 aylık yaşta sığırlarda, yüksek derece soğuk karkas ağırlığı ve değerli et miktarına CC genotipinin ve 15 aylık yaşta sığırlarda değerli etteki yağ miktarına CT genotipinin etkili olduğunu belirlemişlerdir. TT genotipli genç boğalar, CC genotipli olanlarla bakım, et üretimi ve yem tüketimi bakımından karşılaştırıldığında daha çok yem (kuru madde ve protein) tükettiklerini belirlemişlerdir. IGF-II geninin etki durumu, cDNA dizi ve RFLP-Bsrl analizi kullanılarak

incelendiğinde 15 aylık hayvanlarda ve iki aydan büyük olan fetüste IGF-II alleli incelenmiş olup paternal ve maternal olarak karaciğerde aynı oranda aktive olduğu ayrıca 2 aylık erkek fetüslerde IGF-II mRNA maternal allelin etkili olduğu ölçülmüştür.

Silva *et al.* (2011) tarafından, Brezilya'da yetiştirilen 147 baş Nellore ırkı sığırlarda yürüttükleri çalışmada IGF-II ve CYP21 genlerinin iki SNP analiz ederek bu hayvanlarda hem IGF-II geni (RFLP/MboII) ekson 6 ve hem de CYP21 (steroid 21-hidroksilaz) geni (RFLP/HpaII) promoter bölgesinde belirlenmiştir. Araştırmada, CT IGF-II RFLP/MboII polimorfizmi CC ve TT'ye göre önemli ölçüde daha fazla (homozigot genotipleri (CC-TT) %25, heterizigot genotipleri (CT)%50) iken CYP21 RFLP/HpaII polimorfizmi T allel C alleli çok daha fazla (C için 0,0442 ve T için 0,9557) olduğunu ve bu populasyonun Hardy-Weinberg'e göre dengede olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar üreme ve verimle ilgili özelliklerin (120, 240, 365,450 ve 550 günlük yaşlarda olanların canlılık ağırlıkları, ilk doğumdaki yaşları, 365, 455 ve 550 günlüklerin skrotal çevresi) beklenen döl farklılıkların polimorfizmini tümünde araştırmışlar ancak yalnızca bunlardan DP550 (IGF-II-RFLP/MboII 365 gün beklenen yavru ağırlığı farkları) ve DP450 (CYP21-RFLP/HpaII 450 gün de beklenen yavru ağırlık farkları) için önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Franco *et al.* (2013) çalışmalarında, 1-3 mm ve $\geq 8,0$ mm kökleri itibariyle kümülüs hücreleri IGF-II geninin CpG adasından metilasyon desenini karakterize etmek ve bu desenin in vitro olgunlaşma etkilerinin değerlendirilmesinde genomik DNA, önce sodyum bisülfite ile daha sonra bisülfitle muamele ederek sonunda iç içe PCR edilerek DNA metilasyonu karakterize etmişlerdir. Gruplar arasında metilasyon motifinde fark olmadığını gözlemişlerdir. Küçük folikülleri ön IVM (yumurta hücrelerinin olgunlaştırılması) ve son IVM hücreleri metilasyon oransal düzeyleri sırasıyla $78,17 \pm 14,11$ ve $82,93 \pm 5,86$ olarak belirlemişlerdir. Büyük gelen foliküllerin metilasyon oransal seviyeleri sırasıyla $81,81 \pm 10,40$ ve $79,64 \pm 13,04$ olarak tespit etmişlerdir. İn vitro olgunlaşmada sadece etkisini değerlendiren ön IVM ve son IVM kök hücrelerinde metilasyon oransal seviyeleri $80,17 \pm 12,01$ ve $81,19 \pm 10,15$ olarak bildirmişlerdir. Sonuç olarak, bütün grupların kümülüs hücrelerinin metilasyon düzeyi somatik hücre

imprinting desenin beklenenden daha yüksek olduğunu, ön IVM foliküllerden kümülüs hücreleri herhangi bir in vitro manipülasyona maruz kalmadan ve hipermetile desen hücrelerde bu özel lokusu için gerçek fizyolojik metilasyon desen olabilirliğini gözlemişlerdir.

Pekin’de rastgele seçilen, ortalama canlı ağırlıkları 414 kg ve 14 aylık olan 118 baş Simmental sığırlarda, yem tüketimi artışı (RFI), yemden yararlanma oranı (FCR) ve günlük ortalama canlı ağırlık artışı (ADG) ve yemden yararlanma(FCE) gibi özellikleri ele alan Du *et al.* (2013), sığır MC4R ve IGF-II geninde varyantlarının etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu amaç için DNA havuz dizilimi, bu iki genin SNP elemişler ve Matris Destekli Lazer Çıkarma/İyonlaşma Zaman Kapalı Işık Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS) analizi ile genotiplendirmiş ve devamında MC4-R ve IGF-II araştırılması amacıyla dört SNP (C2209T, G18587C, A22950T ve G26920T) arasında C1069G lokusu popülasyonunu tespit etmişlerdir. İstatistik analizinde sadece MC4-R-C1069G, IGF-II-C2209T ve IGF-II-G18587C lokuslarının Hardy-Weinberg kuralına uygun olduğunu belirlemişlerdir ($P>0,05$). Genotipler arasındaki farkları analiz etmek için genel lineer model (GLM) kullanılmış olup analiz sonucunda sadece IGF-II-G18587C lokusunun ADG ($P < 0,05$) üzerine önemli bir etkiye sahip olduğunu ancak RFI veya FCR üzerine önemli bir etkiye sahip olmadığı, CC ve GG genotipleri baskın genotipler olduğunu ve CC veya GG genotipi ile bireysel GC’nin daha büyük bir ADG’nin ($P < 0,05$) var olduğunu tespit edilmiştir.

Çin Qinchuan (723 baş) ve Çin Holstein (94 baş) sığırlarında büyüme özellikleri ile IGF-II mutasyonlarının etkilerini değerlendirmek için Huang *et al.*(2013), IGF-II’ye ait dört SNP DNA havuzu dizilişini saptamışlardır. Araştırmacılar, üzerinde durulan toplam 817 baş iki farklı ırktaki hayvanlarda dört SNP için haplotip yapı ve bağlantı dengesizliği (LD) katsayıları incelemişler ve haplotip analizi sonucunda 8 farklı haplotip ve 27 bileşik genotip görüldüğünü bildirmişlerdir. İstatistiksel analizler sonucu Qinchuan sığır popülasyonunda; dört SNP, bileşik genotip ve haplotipi ile 1.SNP’de cidago yüksekliği ve göğüs genişliği arasındaki ilişki önemli ($P<0,05$) iken vücut uzunluğu arasındaki ilişki çok önemli ($P<0,001$); 4.SNP’de ise göğüs derinliği ve vücut

ağırlığı arasındaki ilişki önemli ($P<0,05$); kalça çapraz yükseklik, kalp çevresi, makat uzunluğu kalça kemik genişliği, kalça genişliği arasındaki ilişki önemsiz bulunmuştur. Mutant tipi varyantların ve mutant haplotiplerin (Hap 8: ATGG; yararlı QTN alel olması muhtemel) büyüme özellikleri için üstün olduğunu; heterozigot diplotip'in yabani tip homozigota göre daha yüksek büyüme özellikleri ile ilişkili olduğu araştırmacılar tarafından elde edilmiştir. Çalışma sonunda; IGF-II genindeki polimorfizmin büyüme özellikleri ile ilişkili olduğu ve sığır yetiştiriciliği programlarında hayvan seçimi konusunda kullanılabileceği bildirilmiştir.

Olbromski *et al.* (2012), sığırlarda karaciğer, böbrek ve hipofizde IGF-II, LEP ve CCL2 genlerinin allelik gen dengesizliği çalışmaları için yerel enstitü çiftliklerinde yetiştirilen 40 akraba olmayan Polonya Holstein boğa kullanmışlardır. Araştırmada, Pyrosequencing yöntem kullanılarak tercihli allelik ekspresyonuna sahip olanları bulmak için 29 sığra ait bir gen dizisi analizi yapmışlar ve incelenen 3 gen grubu LEP (leptin), IGF-II (insülin-benzeri büyüme faktörü II) ve CCL2 (kemokin C-C motifi ligandı 2) allelik ekspresyonunda dengesizliğin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Dias *et al.* (2016) farklı genetik grupların sığır karkas kompozisyonu ve et kalitesi ile ilgili polimorfizmleri ve özellikleri arasındaki ilişkileri değerlendirmek, IGF-II geninin IGF-II/MboII (G>T), Pro-melanin konsantre edici hormon (PMCH) geninin DQ499531.1: g.134A>T, ve RAR ilgili orphan reseptör C(RORC) geninin DQ667048.1: g.3290G>T polimorfizmlerinin alel frekanslarını tahmin etmek için 499 sığra (313 Nellore saf ve 186 Nellore melez) ait karkas ve et kalitesine ilişkin veriler kullanılmıştır. Çalışma ile Nellore saf ve Nellore melezlerinde IGF-II/MboII polimorfizmi; G alleli frekansları, sırasıyla 0,231 ve 0,631; DQ499531.1:g.134A>T polimorfizmi; A allelik frekansları sırasıyla 0,850 ve 0,905; DQ667048.1:g.3290G>T polimorfizmi, G alleli frekansları sırasıyla 0,797 ve 0,460 olarak bulunmuştur. Çalışma sonunda, incelenen sığır popülasyonunda değerlendirilen SNP, seleksiyon belirteçleri olarak IGF-II, PMHC ve RORC gen polimorfizmleri karkas ve et özellikleri (rib göz alanı, geri yağ kalınlığı, kesme kuvveti, toplam lipidlerin ve miyofibriler parçalanma indeksi) arasında önemli bir ilişkinin olmadığı tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmanın hayvan materyalini Atatürk Üniversitesi Ziraat İşletmesi'ndeki (60 baş) ve Erzurum ilinde bulunan ve Erzurum ili Ilıca bölgesinde özel bir işletmesi'ndeki (54 baş) toplam 114 baş 3, 4 ve 5 yaşlı Esmer İsviçre ırkı inekler oluşturmaktadır. Çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmada Buzdolabı (Arçelik), Hassas Terazı (Shimadzu), Vorteks (Yellow Line)Elektroforez Sistemi (Biogen, Apelex, France, SN 280800), çeşitli amaçlar kullanılan muhtelif cam malzemeler, Mikrodalga Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad), Otomatik Termocycle Sistem (Bioner), NanoDrop (Thermo scientific),Santrifüj (Kubota), Spektrofotometre (Shimadzu), Saf Su Cihazı (Ateks) ve Fırın (Blueline) gibi alet ve cihazlar kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvanlardan kan alımı

Atatürk Üniversitesi Ziraat İşletmesi'nde ve Erzurum ili Ilıca bölgesinde özel bir işletmede yetiştirilen Esmer İsviçre sığınaına ait kan örnekleri işletmelerden toplanıp 10 ml'lik K3 EDTA (Etilen DiaminTetra-Asetik Asit)'lı vakumlu tüpler ile alınarak Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvar'a getirilene kadar +4°C buz kalıplarının bulunduğu numune taşıma çantaları ile taşınmıştır. Alınan her bir kan numunesi tüpü üstündeki etikete silinmez bir

kalemle, numunenin hangi hayvana ait olduğunu belirtmek için ilgili hayvanın kulak numarası yazılmıştır.

3.2.2. Kullanılan çözeltiler

1. Liziz Çözeltisi
2. 5xRetik Salin Çözeltisi
3. Fenol/Kloroform
4. Proteinaz K
5. TE Çözeltisi
6. Fenol
7. STE Çözeltisi
8. Amonyum asetat
9. RNaz
10. Etanol
11. İzopropanol

3.2.3. Genomik DNA izolasyonu

Esmerlerden elden edilen kan örneklerinden DNA izolasyonu Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda Purgene DNA kiti (Gentra Sistemleri, Minnesota, USA) kullanılarak Sönmez (2013), esas alınarak yapılmıştır.

- 1- Tüpler numaralandırılarak her numune için 2 set tüp hazırlandı.
- 2- 800 µl RBC (red blood cell) solüsyonu eklenen tüplerin üzerine 400 µl kan eklenerek karışması için alt- üst edildi.
- 3- 3 dakika 12.000 g de santrifüj edilip süpernatant bir pipet ile tüp dibinde 8-10 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Süpernatantın homojenizasyonu sağlamak için vortekslendi.

- 4- Homojenat üzerine 200 µl Cell lysis ve 95 µl Protein Precipitation ilave edilip vortekslendi ve daha sonra 3 dak. 12.000 rpm de santrifüj edildi.
- 5- 2.tüp hazırlanarak üzerlerine 200 µl izopropanol eklendi. 1.tüpteki süpernatant 2.tüpe eklenip alt üst edilerek izopropanol ile karışması sağlandı.
- 6- DNA olan tüpler 12 000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıp ve süpernatant atıldı.
- 7- Dipte kalan DNA'nın üzerine 250 µl 1,5 M NaCl çözeltisi ilave edildi ve vortekslendi.
- 8- Ardından 800µl %83'lük etanol eklendi ve 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 9- Daha sonrası süpernatant atıldı ve üzerine 900 µl %72'lik etanol eklendi.
- 10- 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- 11- Tüplerde kalan alkol, 150°C'de steril edilmiş pamuklu eküvyon uçları emdirilerek uzaklaştırıldı.
- 12- Alkolden arındırılan DNA tüplerinein içine 400-6000 µl ddH₂O ile TE ilave edildi ve DNA'nın çözünmesi sağlanan örnekler spektrofotometrik ölçüm anına kadar -18°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. DNA'nın kalitatif tayini

1,2 g agaroz, 80 ml 1XTBE tamponu içerisine konularak mikrodalga fırın içerisinde 600 Watt'da 3 dakika tutularak eritilerek elde edilen %1,5'lik agaroz jel eriyik içerisine 4,5 µl EtBr ilave edilerek taraklı jel kabinine hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü. Polimerizasyon için oda sıcaklığında 30-35 dakika bekletilmeye alındı.

Daha sonra genomik DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA'lar 4 µl jel yükleme buffer ile 7 µl DNA karışımı otomatik pipetler aracılığı ile %1,5'luk agaroz jelde yüklenerek 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. 90 volt'ta 25 dakika süreyle yürütüldü. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların ultraviyole (UV) ışığı altında görüntülenmesi sağlandı (Sönmez 2013).

3.2.5. DNA'nın kantitatif tayini

Ekstrakte edilmiş DNA'ların derişimleri ve saflıkları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) spektrofotometrede okuma yapılarak belirlenmiş ve DNA derişimi düşük bulunan örnekler istenilen derişim elde edilene kadar kan örneklerinden DNA izolasyon işlemleri tekrarlanmıştır.

3.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi

PCR canlı organizma kullanmadan enzimatik olarak DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA kısmının enzimatik olarak çoğaltıldığı in vitro bir teknik olup başlangıçta belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde ediliyorken günümüzde DNA polimeraz enzimi PCR ile birlikte kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen milyonlarca kopyalanarak çoğaltılabilmektedir (Üstünbaş 2008; Somma and Querci 2010).

3.2.6.a. PCR prensipleri

PCR işleminde hedef, DNA'nın çoğaltılmasında 20-40 döngü arasında hücre içi (in vivo) çift zincirli DNA (dsDNA) tek zincirli DNA (ssDNA) biçiminde çözülmesi, kopyalanarak çoğaltılması ve tekrar bağlanmasıdır (Okutucu ve Pehlivan 2003; Somma ve Querci; 2010). PCR reaksiyonu üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla;

1. Denatürasyon (Denaturation)

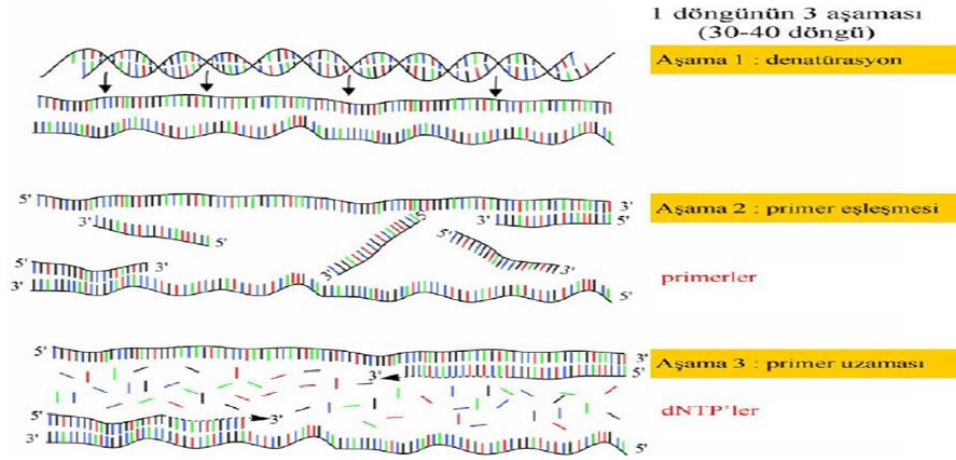
PCR işleminde ilk aşama olarak amplifiye edilecek çift zincirli DNA başlangıçta 95-100°C'ye kadar ısıtılır ve çift iplikçikli DNA iki tek ipliğe ayrılır. İşleminde sıcaklık dereceleri ve süreleri çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Eğer guanin (G) ve sitozin (C) bakımından zengin hedef DNA mevcut ise bu durumda durumlarda 95°C'den daha yüksek bir sıcaklık uygulanabilir (Somma and Querci 2010).

2. Bağlanma (Annealing)

DNA'nın denatüre (ift zincirli DNA sarmalının birbirinden ayrılması) edilmesiyle sıcaklık 50°C'ye düşürölür. Bu yolla primerler tek iplikçik halindeki kalıp DNA'ya spesifik olarak bağlanırlar. Primerler 15-30 bazlık oligonükleotidler olup primerlerden biri kendine ait 5'-ucu hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de ikinci tek iplikçik DNA'nın, anti paralel olarak diğer ucundaki 3'-ucuna bağlanarak DNA polimeraz'ın çalışma yönüne esas olarak (5'-3') bağlanırlar. Bağlanma yani hibridizasyon sıcaklığı çoğunlukla primerlerin erime sıcaklığının 5°C altında olup 55-65°C sıcaklıklar arasında en iyi sonuç elde edilir. Hibridizasyon sıcaklığı eğer düşük tutulursa spesifik olmayan küçük DNA fragmentlerinin oluşmasını ve yüksek sıcaklıklarda ise yanlış nükleotidlerin primerlerin 3' ucuna bağlanmasını önlediği gözlenmiştir (G/C oranı yüksek olan bölgelerde bağlanma ısısı 68°C'ye kadar arttırılabilir) (Somma and Querci 2010).

3. Uzama (Extension)

Annealing aşamasının sonuna doğru 72°C'de, primerlerle sınırlandırılmış bölgenin tağ polimeraz enzimi, ortamdaki dNTP'leri kullanarak zinciri uzatır. Tek iplikli DNA ift iplikli DNA haline dönüşür. şekil 3.1'de gösterildiği gibi burada her bir döngüden sonra meydana gelen zincirler yeni döngünün hedef zinciri olarak görev alırlar (Okutucu ve Pehlivan 2003; akır ve akmakı 2005; Somma and Querci 2010).



Şekil 3.1. PCR aşamaları (Somma and Querci 2010)

3.2.7. PCR gerekli maddeler

Hedef DNA

PCR amplifikasyonu hedef genin(hedef zincirin uzunluğu <0,1'den birkaç kilobaza kadar değişebilir) en az bir tam kopyası bulunduğu yapıdır. Bu sayının artması başarılı DNA amplifikasyonu olasılığını artırırken hedef DNA yapısında herhangi bir hasarın (örneğin kırılma) oluşması PCR amplifikasyonunu PCR'da durdurur. Kullanılan toplam DNA miktarı hedef DNA'nın tek kopyasının belirlenmesine imkan oluşturduğu için 0,005-1 µg arasında olmalıdır. Burada kullanılan numunenin çok saf olması gerekmez. Fakat amplifikasyon işlemini heparin, heme, formalin, Mg^{+2} çelatlayıcı ve deterjan gibi maddeler engelleyebilir (Somma and Querci 2010).

Primerler

İşlem için kullanılacak primerler, genellikle yüksek bağlanma sıcaklıklarında kullanılabilirliği açısından 16-30 nükleotid uzunlukta olup yaklaşık olarak %50 G+C bileşimine sahip T_m sıcaklıkları birbirine yakın ve yalnızca amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmalıdır. Primerin 3' ucunda çok sayıda G ve C bazlarının bulunması, mümkün uzayacak olan kısmın bağlanmasını artırmaktadır. Burda önemli bir husus

primerler arasındaki uzaklığın 10kb'nin altında olmasıdır. Çoğunlukla primerler arasındaki uzaklık 3kb'den fazla olması durumunda PCR ürünüde önemli ölçüde azalma görülmektedir (Somma and Querci 2010). 0,1-0,5 mM arasında primerin konsantrasyonu değişebilir, bundan daha büyük konsantrasyonlara sahip primerlerin kullanılması hatalı dizilimlere sebep olabilir ve ayrıca bu durum kalıntıyı artırırken; düşük primer konsantrasyonları PCR verimini azaltır (Somma and Querci 2010; Sönmez 2013).

Çizelge 3.1. IGF-II geninin primer dizilimi

F: 5'CCTCAGCCTCATCCCCCTCCTTTGC-3'	(Goodall and Schmutz 2003)
R: 5'-CTGTGCTCTATTTGCTGTGTTGTCT-3'	

Deoksiribonükleosit Trifosfatlar (dNTP)

Serbest deoksiribonükleosit trifosfatlar (dNTP'ler) DNA sentezi için gerekli bileşiklerdir. Stok deoksiribonükleotidler (dNTP= dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) pH'sı 7 değilse nötralize edilmeli ve -20°C'de muhafaza edilmelidir. Optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, primerlerin konsantrasyonuna, reaksiyon şartlarına, çoğaltılacak ürünün boyuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır. PCR işleminde kullanılacak her dNTP için konsantrasyon 20 ile 200 µM arasında olmalı ve yanlış bağlanma hatalarını önlemek için ise 4 dNTP de eşit miktarlarda ve aynı derişimde kullanılmalıdır (Somma and Querci 2010; Sönmez 2013).

Taq DNA Polimeraz

Bu enzim, Amerika'da ulusal bir park olan Yellowstone Parkı'nda yaklaşık 85°C sıcaklıktaki kaynak sularında yaşayan ve ısıya dayanıklı olan *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen bir enzimdir (Somma and Querci 2010; Sönmez 2013). Bu enzimin 5'→3'ekzonükleaz aktivitesine ve en uygun çalışma sıcaklığı olan 70-80°C

arasındaki sıcaklıkta bakteri saniyede 35-100 nükleotid sentezleyebilme hızına sahiptir (Somma and Querci 2010). Taq DNA polimerazlar, büyüyen zincirin başından nükleotidleri ayıran 5' uçtan 3' uca ekzonükleaz aktivitesine sahiptirler ve primerlerin serbest 3' OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etkisiyle fosfodiester bağlarının katalizi gerçekleşir. Böylece DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanarak dolayısıyla PCR sentezinin meydana gelmesini sağlar. Taq DNA polimerazlar 3'→5'ekzonükleaz aktivitesi yoktur. İlgili çalışmalarda önerilen miktar; 100 µl'lik bir hacim için 1-4 ünite olup amplifikasyon bölgesine bağlı olarak bu miktar değişkenlik gösterebilir. Yüksek konsantrasyonda enzim kullanımı spesifik olmayan ürünlerin ve düşük konsantrasyonda ise yetersiz ürün oluşumuna sebep olabilir (Somma and Querci 2010; Sönmez 2013).

Mg⁺² Derişimi

Mg⁺² Derişimi, primer yapışmasını, primer-dimer kalıntılarının oluşumunu, hem kalıp hem de PCR ürününün ayrışma sıcaklıklarını ve enzimin aktivitesini etkiler. Genellikle düşük Mg⁺² konsantrasyonu, düşük miktarda ürün oluşmasına yada hiç oluşmamasına diğer taraftan yüksek miktarlardaki Mg⁺² ise yanlış eşleşmenin artmasına sebep olur. Araştırmacılar, derişimin 0,5-2,5 mM olarak önermişlerdir (Somma and Querci 2010; Sönmez 2013).

Tampon Çözeltileri

Tampon içeriği kullanılan enzimin özellik ve tipine bağlı olmasıyla birlikte yaygın olarak kullanılan tampon 10-50mM Tris ve 8,3-8,8 arasında p olup bu tampona 50mM KCl çözeltisi eklemek suretiyle hedef DNA'ya primer yapışmasını kolaylaştırır. Fakat 50 mM'ın üzerindeki KCl ve NaCl çözeltilerinin eklenmesi Taq DNA Polimeraz aktivitesini düşürmektedir. Ayrıca hedef DNA solüsyonunda yüksek miktarlarda negatif olarak yüklenmiş fosfat gibi iyonik gruplardan veya EDTA gibi çelatlayıcı maddelerden kaçınılması gerekir. Diğer taraftan bovin, serum, Jelatin, albümin (BSA), Tween-20 ve Laureth-12 gibi iyonik olmayan maddelerin enzim kararlılığına etkisi özkonusudur.

Ancak bu maddeleri kullanma zorunluğu yoktur (Somma and Querci 2010; Sönmez 2013).

3.2.8. PCR amplifikasyonu

PCR amplifikasyonları aynı şartlar altında farklı zamanlarda uygulandı. Çizelge 3.2’de PCR bileşenleri ve kullanılan miktarları ve incelenen IGF-II geninin PCR döngü koşulları görölmektedir.

Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve IGF-II geninin PCR döngü koşulları

PCR Bileşeni	Hacim	Aşamalar	PCR koşulları	Döngü sayısı
dNTP	3µl	1	94°C’de 5 dak.	1 döngü
Taq	0.5-1.0 U			
MgCl ₂	1,7 µl	2	94°C’de 50 sn	32 döngü
PCR Tamponu (pH:8.4)	5.0 µl (10X)		61°C’de 50 sn.	
Primer F	10 µl		72°C’de 45 sn.	
Primer R	10 µl	3	72°C’de 5 dak.	1 döngü
Genomik DNA	60-90 ng			
Steril distile su	Toplam hacim 25 µl’ye tamamlanır			

3.2.9. PCR ürünlerinin gözlenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için %2,5’luk agaroz jelde her bir PCR ürünü yürütölmelidir. Bu amaçla 80 ml’lik 1XTBE tamponu içerisinde 2 g agaroz, 3500 Watt’da çalışan mikrodalga fırınında 3 dakika

kadar bekletilerek alınır. İçerisine 5µl EtBr ilave edilerek karışması sağlanılır ve hazırlanan taraklı jel kabinine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülür ve oda sıcaklığında 20-25 dakika polimerize olmaya bırakılır. Tarakları çıkartılarak jel kuyucuklara 10 µl PCR ürünü ve 3 µl jel yükleme tamponu otomatik pipetler aracılığı ile yüklemesi yapılarak 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirilir ve 80 voltta 15 dakika yürümeye bırakılır. Daha sonra jeldeki bantları UV ışığı ile görüntülenir. Amplifikasyonu gerçekleşmiş olanlar -20°C’de muhafaza edilir.

3.2.10. Restriksiyon enzimleriyle DNA’ların kesimi

Amplifikasyonu gerçekleşen her bir örnekten yaklaşık 10 µl’lik alınıp 0,2 ml’lik steril ependorf tüplere konularak, üzerine 3-5 U ilgili bölge için restriksiyon enzimi, 3-5 µl RE tamponu, 6 µl ddH₂O ilave edilir ve sonra üzeri 8-10 µl mineral oil yüzeyi kapatılıp 1 dakika 1300rpm santrifüz yapılır. Daha sonra inkübatöre yerleştirilerek 38°C’de 12-13 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri, tanıma bölgeleri ve beklenen bant uzunluğu tablada verilmiştir.

Çizelge 3.3. Restriksiyon enzimi, tanıma bölgeleri ve beklenen bant uzunluğu

RE	PCR ürünü (bç)	Tanıma Bölgesi (5’-3’)	Genotip ve Bant Büyüklüğü (bç)
BsrI	217	C ^A T	CC:32-185 CT: 32-67-118,185 TT:118,67,32

3.2.11. Örneklerin yüklenmesi ve yürütme işlemi

RE’ler ile DNA’ların kesim işlemleri tamamlandıktan sonra, sonucunu gözlemlemek için; etüvden çıkarılan restriksiyon kesimi uygulanmış örneklerin her birine 3 µl yükleme tamponu ilave edilmiş ve mineral oilden arındırılması için otomatik pipet yardımıyla parafilm üzerinde tüm ürün gezdirilmiştir. Daha önceden hazırlanan %3-3,5’lük agaroz jele tüm ürünlerin sırasıyla ayrı ayrı yüklenerek 1XTBE tamponuyla

doldurulmuş olan elektroforez tankına yerleştirilir. Daha sonra 60 voltta 2,5 saat süreyle elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforez işlemi yapılan jel alınarak UV ışığı altında görüntülenerek incelenmiştir.

3.2.12. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizinde çift iplikli DNA'yı spesifik tanıma bölgelerin restriksiyon endonükleazların çift zincirli DNA moleküllerinin 4 ile 8 baz çifti (bç) arasındaki spesifik bölgelerini tanıyarak kesen enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimler 3000 civarı olduğundan dolayı hangi enzimin kullanılmasını belirlenmesiyle ilgili iyi bir araştırma yapıp uygun enzim seçilmelidir. Bu enzimler RFLP tekniği ve PCR metoduyla birlikte, nDNA veya mtDNA üzerindeki bölgelerde kullanılabilir. PCR ürünü, restriksiyon enzimi, tampon olarak kullanılacak ilgili enzim kataloğunda yer alan konsantrasyon ve miktarlarda karıştırılarak birkaç damla mineral yağ (mineral oil) eklenerek belli bir süre (çoğunlukla 12 saat) etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra %1,5-3'lük agaroz jel yürüterek UV görüntüsü alınmıştır. RFLP sonuçları kontrol edilmiştir (Aksakal ve Erdoğan 2008; Üstünbaş 2008).

Tekniğin en önemli avantajı farklı laboratuvarlarda aynı sonuçlar elde edildiğinden dolayı güvenilirken, genomlarda az kopya olan dizilişler belli noktalarda kümelenedikleri için RFLP belirteçleri genom üzerinde rastgele dağılışı gösterememeleri dezavantajdır (Üstünbaş 2008).

3.2.13. Süt verimlerinin tespiti ve hesaplanması

İşletmede entansif olarak yetiştirilen hayvanlar otomatik sağımlarında her gün sabah ve akşam olmak üzere günde 2 defa sağılmaktadır. Her iki sağımlar günlük süt verimi olarak alınmıştır. Sağılan hayvanların süt verimleri hergün sağımlarına entegre olan bir sistemle 100 g hasasiyetle kayıt altına alınmıştır. Buzağılamanın ertesi gününden 305. güne kadar olan verim standart veya referans laktasyon olarak alınmıştır. Laktasyon süresi belirtilen günün altında veya üstünde olması durumunda laktasyon süt

verimleri 305 güne göre düzeltilmiştir (Aydın vd 1998). Hayvanlarda laktasyon bitimi hayvanların tek sağıma düşmesi veya 2 kg'dan daha az süt vermesi olarak kabul edilmiştir.

3.2.14. İstatistiksel analizler

3.2.14.a. Süt verim özelliklerinin analizleri

İstatistiksel olarak yapılan ilişkilendirme çalışmasında, Atatürk Üniversitesi Ziraat İşletmesinde yetiştirilen Esmer İsviçre sığırlara ait verim kayıtlarına ulaşılamadığından, sadece Erzurum ili Ilıca bölgesinde özel bir işletmede yetiştirilen işletmesine ait verim kayıtları kullanılmıştır. Çalışmada performans özellikleri olarak, gerçek süt verimi, 305 gün süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt verimi gibi süt verim özellikleri incelenmiştir. Elde edilen verilerin analizinde Genel Linear Model (Harvey 1990) esas alınarak SPSS paket programı kullanılmıştır. Analiz sonucu önemli çıkan faktörlere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanarak grupların farklılığı ortaya konulmuştur (Duncan 1955). Ele alınan verim özelliklerinde genotip, laktasyon sayısı, ineğin yaşı ve buzağılama mevsimleri gibi çevre faktörleri üzerinde durulmuştur.

Araştırmadaki verim özelliklerine göre aşağıdaki istatistik model kullanılmıştır.

$$Y_{ijkl} : \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + (ab)_{ij} + (ac)_{ik} + (ad)_{il} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} : Herhangi bir Esmer ineğin ele alınan süt verimi (gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt verimi) özelliklerinin her hangi biri bakımından değeri

μ : populasyon ortalaması

a_i : i. Genotip etkisi (i:3; CC:1, CT:2, TT:3)

b_j : j. Laktasyon sırasının etkisi (j:3; 1. Laktasyon:1, 2. Laktasyon:2, 3. Laktasyon: 3)

c_k : k. Ana yaşının etkisi (l:3; 1:3 yaş, 2:4 yaş ve 3:5 yaş)

d_l : l. Buzağılama mevsiminin etkisi (k:2; 1:kış-ilkbahar, 2:yaz-sonbahar)

(ab)_{ij} : Genotiple laktasyon sayısının interaksyon

(ac)_{ik} : Genotiple ana yaşının interaksyon

(ad)_{il} : Genotiple buzağılama mevsiminin interaksyon

e_{ijkl} : Hata payı

Kullanılan modelde hata haricinde kalan bütün faktörler sabit, hata ise şansa bağlı olarak kabul edilmiştir.

3.2.14.b. Genotip ferankaslarının hesaplanması

Esmer sığır popülasyondaki genotip ve allel sayıları jel görüntülerine bakılarak tespit edilmiştir. Genotip frekansları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$f(CC)=p^2= \Sigma(CC)/N \quad (3.1)$$

$$f(CT)=2pq= \Sigma(CT)/N$$

$$f(TT)=q^2= \Sigma(TT)/N$$

Denklemde;

N: İncelenen toplam birey sayısını göstermektedir.

Popülasyonların genotip frekanslarına göre allel frekansları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$f(C)=p=(2n_{CC}+n_{CT})/2N \quad (3.2)$$

$$f(T)=q=(2n_{TT}+n_{CT})/2N$$

p+q=1 eşitliğine göre

Eşitliklerde;

f (C)=p=C allelinin frekansını,

f (T)=q=T allelinin frekansını

N: İncelenen toplam birey sayısını göstermektedir.

Gen frekanslarının standart hataları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\text{St. hata} = \sqrt{q(1-q)/2 \times N} \quad (3.3)$$

Burada;

q=Verilen bir allel genin frekansını

N= İncelenen toplam birey sayısı

Gözlenen ve beklenen heterozigotluklar karşılaştırılarak bir populasyondaki genetik çeşitlilik ölçülebilmektedir. İncelenen Esmer sığırların genetik çeşitlilik (genetic variability) ortalamasını bulmak için gözlenen ve beklenen heterozigotluk düzeyleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır.

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

Eşitlikteki,

N_{ij} : heterozigot bireylerin sayısı,

N: İncelenen toplam birey sayısı

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

Eşitlikteki;

P_{1i} :allel frekansı,

n: allellerin sayısı(Sönmez 2013).

3.2.14.c. Populasyonların Hardy-Weinberg prensibine göre genetik denge analizi

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

Bütün genotipler eşit hayatta kalma oranına ve üreme başarısına, sahiptir. Mevcut bir allel ya da yeni allel oluşturarak diğerine dönüşürecek mutasyonlar bulunmaz. Popülasyonun içinden dışına veya içine hiçbir göç yoktur. Popülasyon örnekleme hatalarının ve diğer rastgele etkilerin gözardı edilebileceği kadar büyük bir popülasyondur.

Hardy-Weinberg kanununa dikkate alındığında yukarıdaki varsayımlara uygun popülasyon aşağıdaki özelliklere sahiptir.

-Bir Popülasyondaki allel frekansları nesilden nesile değişmez; yani popülasyon evrimleşmez.

-Bir nesil süren rastgele eşleşmenin sonunda genotip frekansları allel frekanslarından tahmin edilebilir.

Bu denge test edilirken öncelikle genotip frekansları hesaplandıktan sonra genotip frekanslarından allel frekansları hesaplanır. Sonuçta hesaplanan allel frekanslar kullanılarak genotip frekanslar tahmin edilir. Genotip frekanslarının $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ denkleminde uyması Hardy-Weinberg kanununa uyması manasına gelir. Aksi takdirde varsayımlardan biri veya bir kaç bu popülasyon için geçersizdir (Baklacı 2005).

Hardy-Weinberg denge eşitliği için genotiplerin beklenen değerleri eşitlik (6)'da göre hesaplandı.

$$E(CC) = p^2 n \quad (3.6)$$

$$E(CT) = 2pqn$$

$$E(TT) = q^2 n$$

Eşitlikte,

p: C allelinin frekansı

q: T allelinin frekansı

n: popülasyondaki birey sayısı

Genetikte gözlenen sapmaları değerlendirmek önemlidir. Başlangıçta beklenen değerler ile ölçülen değerler arasında gerçek bir fark olmadığı kabul edilerek H_0 hipotezi kurulur. İstatistiksel analizler ile bu hipotez test edilerek sıfır H_0 hipotezi ya reddedilir ya da kabul edilir. Eğer bu hipotez reddedilmişse beklenen orandan sapma sadece şansa bağlanmaz. Dolayısıyla istatistiksel analizler, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Bu teste, uyumun mükemmelliği (Goodness of fit) adı verilir. Sıfır hipotezinin mükemmellik uyumuna karar vermek ve gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için geliştirilen en basit istatistiksel testlerden biri Ki-kare (χ^2) analizi kullanıldı. Ki-kare analizi eşitliği;

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

Eşitlikteki,

G_i : i kategorisi için gözlenen değeri,

B_i : i kategorisi için beklenen değeri (Baklacı 2005; Özdemir 2006; Sönmez 2013).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. DNA'nın kantitatif tayini

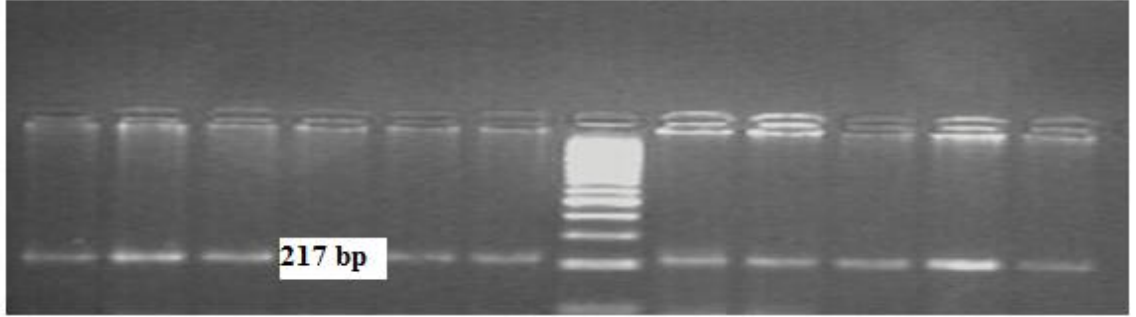
Ekstraksiyonu edilmiş olan DNA'ların derişimleri ve saflıkları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) spektrofotometrede okuma yapılarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. NanoDrop'da okunan DNA'ların kantitatif sonuçları

Tarih	Örnek no	Değer(ng/ul)	Tarih	Örnek no	Değer(ng/ul)
20.9.2016	1	99,33	20.9.2016	12	416,63
20.9.2016	2	145,19	20.9.2016	13	124,23
20.9.2016	3	301,92	20.9.2016	14	320,87
20.9.2016	4	124,90	20.9.2016	15	342,12
20.9.2016	5	145,48	20.9.2016	16	328,46
20.9.2016	6	183,65	20.9.2016	17	172,79
20.9.2016	7	143,08	20.9.2016	18	317,60
20.9.2016	8	438,17	20.9.2016	19	168,17
20.9.2016	9	110,19	20.9.2016	20	104,81
20.9.2016	10	162,40	20.9.2016	21	262,40
20.9.2016	11	150,77			

4.2. PCR sonuçlarının gözlenmesi

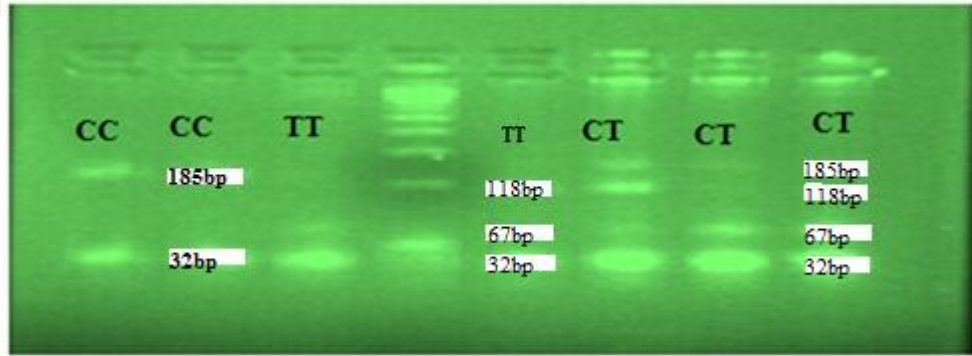
Sığır kandan elde edilen DNA örnekleri PCR yapılarak %2,5'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Görünüşü

4.3. PCR-RFLP sonuçları

Esmer ırkı sığırlardan elde edilen DNA örnekleri PCR cihazında çoğaltılmış ve BsrI Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesilerek IGF-II geni polimorfik bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. IGF-II genine ait PCR-RFLP kesim bölgeleri: CC;32-185, CT;32-67-118-185, TT;118-67-32 bp

4.4. Genotip ve allel frekanslarının dağılımı

Tüm populasyon genelinde monomorfik bulunan IGF-II ait genotip ve allel frekansları verileri aşağıda verilen Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Esmer Populasyonuna ait genotip ve allel frekansları ile standart hatası

Genotip(%)			Allel Frenkansı		
CC	CT	TT	C	T	St. Hata
34	54	12	0,61	0,39	0,059

Popülasyonda bulunan IGF-II ait CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla 41(%34), 65(%54) ve 14(%12) olup, C allelinin frekansı 0,61 ve T allelinin frekansı 0,39 olarak bulunmuştur. Zeric 2012 yaptığı çalışmada C allel frekansı yüksek T allel frekansı düşük oranda olduğu TT genotip daha etkili olduğunu bulunmuş ve bulgularımız ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

4.5. Hardy-Weinberg Genetik Denge Testi

Genotip frekansları, genetik denge testi ve X^2 bağımsızlık testi elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. IGF-II genotip frekansları, hardy weinberg genetik denge testi ve X^2 bağımsızlık testi ve sonuçları

N	Gözlenen			Beklenen			H-W
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	X^2
120	41	65	14	45,02	56,96	18,02	0,1222 ÖS

ÖS:Önemsiz($P>0.05$)

Hardy-Weinberg genetik denge testine göre 120 Esmer inekte genotip frekansları dağılımının dengede ($P>0.05$) olduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmada (Bagnicka *et al.* 2009, Zwierzchowski *et al.* 2010) sonuçlarımızla uyumludur.

4.6. IGF-II genotipleri ile bazı performans özellikleri arasındaki ilişkisi

Çizelge 4.4. IGF-II genotip bakımından bazı performans özelliklerine ait varyans analiz sonuçları

GERÇEK SÜT VERİMİ				
Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Ort.	F	P
IGF-II Genotip	2	584761,1	0,531	ÖS
Laktasyon Sırası	2	19994463	18,155	**
Yaş	2	202938,7	0,184	ÖS
Buzağılama Mevsimi	1	5358022	4,865	*
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	3	1730942	1,572	ÖS
IGF-II Genotip X Yaş	4	5513718	5,006	**
IGF-II Genotip X Buzağılama Mevsimi	2	24761,17	0,022	ÖS
Hata	49	1101335		
305 GÜNLÜK SÜT VERİMİ				
Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Ort.	F	P
IGF-II Genotip	2	903154,2	1,055	ÖS
Laktasyon Sırası	2	1126710	1,316	ÖS
Yaş	2	4769377	5,569	**
Buzağılama Mevsimi	1	1281434	1,496	ÖS
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	3	1294238	1,511	Ö.
IGF-II Genotip X Yaş	4	2876544	3,359	*
IGF-II Genotip X Buzağılama Mevsimi	2	842072,2	0,983	ÖS
Hata	49	856359,6		
LAKTASYON SÜRESİ				
Varyasyon Kaynakları	S.D.	Kareler Ort.	F	P
IGF-II Genotip	2	352,978	0,1	ÖS
Laktasyon Sırası	2	91481,11	25,865	**
Yaş	2	15271,35	4,318	*
Buzağılama Mevsimi	1	6524,795	1,845	ÖS
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	3	679,767	0,192	ÖS
IGF-II Genotip X Yaş	4	7275,32	2,057	ÖS
IGF-II Genotip X Buzağılama Mevsimi	2	4914,615	1,39	ÖS
Hata	49	3536,887		
GÜNLÜK SÜT VERİMİ				
Varyasyon Kaynakları	S. D.	Kareler Ort.	F	P
IGF-II Genotip	2	11,57	0,981	ÖS
Laktasyon Sırası	2	15,607	1,323	ÖS
Yaş	2	87,584	7,422	**
Buzağılama Mevsimi	1	22,354	1,894	ÖS
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	3	12,351	1,047	ÖS
IGF-II Genotip X Yaş	4	31,407	2,662	*
IGF-II Genotip X Buzağılama Mevsimi	2	16,131	1,367	ÖS
IGF-II Hata				

ÖS: Önemsiz, **P<0,01,*P<0,05

4.6.1. Gerçek süt verimi

Esmer İsviçre sığırların gerçek süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.5’de ve varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.4’de verilmiştir. Esmer İsviçre ırkı için gerçek süt verimi genel ortalaması $4317 \pm 272,9$ kg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Değerlendirme sonucunda ele alınan verim bakımından Esmer ırkı için tespit edilen IGF-II genotipler içerisinde en yüksek ortalama TT genotipinde ($5382 \pm 600,3$ kg) ve en düşük ortalama ise CT genotipinde ($3756 \pm 321,7$ kg) tespit edilmiştir. Burada TT genotipli ineklerden elde edilen ortalama gerçek süt verimi, CC ve CT genotipli ineklerden elde edilenerden 1214 ve 1626 kg kadar daha fazla süt verimi elde edilmiştir. Bu özellik bakımından IGF-II’ye ait genotip ortalamaları arasında farklılıklar oluşmuş ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P > 0.05$).

Genotip X yaş interaksiyona ait değerler dikkate alındığında 5 yaşlı ineklerde TT genotipi $6100 \pm 950,0$ kg ile en yüksek değeri alırken aynı yaşta ineklerde CT genoti $2608 \pm 767,7$ kg değer ile en düşük değeri almıştır. Gerçek süt verimi bakımından yaşlar için tespit edilen bütün genotiplerde elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar çok önemli ($P < 0.01$) olarak tespit edilmiştir. Laktasyon sırasına göre belirlenen genotiplerdeki gerçek süt verim ortalamaları birbirinden farklı değerler çıkmış olmasına rağmen bu farklar manalı bulunmamıştır ($P > 0.05$). Genotip X buzağılama mevsimi interaksiyonu ele alındığında, hem kış-ilkbahar ve hemde yaz-sonbahar mevsiminde doğan ineklerden TT genotipli olanlarında gerçek süt verimleri en yüksek değerini almış olup bu değerler sırasıyla $5878 \pm 710,2$ kg ve $4886 \pm 695,7$ kg olarak tespit edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, üzerinde durulan verim özelliğine IGF-II genotip X buzağılama mevsimi interaksiyonunun etkisi önemsiz olarak hesaplanmıştır ($P > 0.05$). Yapılan araştırmalarda IGF-II genotipi ile gerçek süt veriminin ilişkilendirmesi ile ilgili literatürlere rastlanmadığı için bu özellik açısından karşılaştırma yapılamamıştır.

Çizelge 4.5. Gerçek süt verimi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (kg)

GENEL		N	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	Ö.S.	
GERÇEK SÜT VERİMİ		66	4317±272,9		
IGF-II Genotip	CC	11	4168±515,8	ÖS	
	CT	40	3756±321,7		
	TT	15	5382±600,3		
Laktasyon Sırası	1.	7	1998 ^c ±544,9	**	
	2.	24	5864 ^a ±446,0		
	3.	35	4316 ^b ±320,8		
Yaş	3	31	4305±252,4	ÖS	
	4	28	4269±355,4		
	5	7	4377±516,7		
Buzağılama Mevsimi	Kış-İlkbahar	21	4836±443,4	*	
	Yaz-Sonbahar	45	3798±265,2		
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	CC	1.	2	2423±932,4	ÖS
	CT		5	1574±564,2	
	CC	2.	3	5071±632,3	
	CT		20	5576±265,7	
	TT		1	6944±1149,0	
	CC	3.	6	5010±720,7	
	CT		15	4117±499,2	
	TT		13	3820397,0	
IGF-II Genotip X Yaş	CC	3	5	4294±487,5	*
		4	4	3211±752,5	
		5	2	4998±952,8	
	CT	3	20	4500±243,2	
		4	17	4159±338,3	
		5	3	2608±767,7	
	TT	3	4	4028±593,1	
		4	7	6020±699,6	
		5	3	6100±950,0	
Igf-Iı Genotip X Buzağılama Mevsimi	CC	Kış-İlkbahar	2	4647±958,8	ÖS
	CT		15	4330±504,4	
	TT		4	5878±710,2	
	CC	Yaz-Sonbahar	9	3689±449,5	
	CT		25	3181±287,9	
	TT		10	4886±695,7	

a,b,c farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir. ÖS: Önemsiz, *: P<0.05, **: P<0.01

4.6.2. 305 günlük süt verimi

Araştırmada Esmer İsviçre sığırların 305 günlük süt verimi ortalamaları ve ortalamaların standart hataları Çizelge 4.4'de ve varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çalışma materyalini oluşturan 66 baş ineğe ait verim kayıtlarına göre 305 günlük süt verimi genel ortalaması $5277.1 \pm 240,66$ kg olarak tespit edilmiştir. Bu özellik için yapılan önem testine göre IGF-II genotipleri, laktasyon sırası, buzağılama mevsimi, IGF-II genotipi X laktasyon sırası intereksiyonu ve IGF-II genotipi X buzağılama mevsimi interaksiyonunun etkisi önemsiz; IGF-II genotipi X yaş interaksiyonunun etkisi önemli ($P < 0.05$) ve yaşın etkisi ise çok önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur.

IGF-II genotipi X laktasyon sırası intereksiyonu incelendiğinde bu özelliğe ait hesaplanan verimlerden en büyük değeri 1. ve 3. Laktasyonda CC genotipi, 2. Laktasyonda ise TT genotipi almıştır. Genel olarak 3 farklı laktasyondaki IGF-II genotiplerinden elde edilmiş ortalamalar farklı değerler almış fakat bu değerler arasında oluşan farklılıklar istatistik olarak önemsiz olarak belirlenmiştir ($P > 0.05$)(Çizelge 4.6).

Üzerinde durulan özellikler açısından IGF-II genotipler arasında yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen değerler büyükden küçüğe göre sırasıyla TT genotipi $5632 \pm 529,3$ kg, CC genotipi $5420 \pm 454,9$ kg ve CT genotipi $4898 \pm 283,6$ kg olarak belirlenmiştir. Bu özellik için ele alınan interaksiyonlara ait sonuçlar değerlendirildiğinde; IGF-II genotipi X yaş intereksiyonu için CC genotipli 5 yaşlı ineklerde $7184 \pm 840,2$ kg, CT genotipli 4 yaşlı ineklerde $5362 \pm 298,3$ kg ve TT genotipli 5 yaşlı ineklerde $6328 \pm 837,7$ kg ile en yüksek değerler alırken en düşük değerleri CC genotipli 3 yaşlı ineklerde $4199 \pm 429,8$ kg, CT genotipli 5 yaşlı ineklerde $4424 \pm 676,9$ kg ve TT genotipli 3 yaş ineklerde $4497 \pm 523,0$ kg olarak elde edilmiştir. İki farklı buzağılama mevsimi grubuna giren IGF-II genotipleri için belirlenen değerler dikkate alındığında ise en düşük ortalama değer her iki doğum mevsiminde CT genotipinde sırasıyla $4880 \pm 444,8$ ve $4916 \pm 253,9$ kg elde edilirken en büyük ortalama değer kış-ilkbaharda TT genotipinde ($6162 \pm 626,2$ kg) ve yaz-sonbahar genotipinde ise CC genotipinde ($5173 \pm 396,4$ kg) belirlenmiştir. Ancak

yaz-sonbahar doğum mevsiminde TT genotipi değeri CC genotipi değerine göre oldukça yakın değer almıştır.

Çizelge 4.6. 305 günlük süt verimi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (kg)

GENEL			N	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Ö.S.
305 SÜT VERİMİ			66	5277±240,7	
IGF-II Genotip		CC	11	5420±454,9	ÖS
		CT	40	4898±283,6	
		TT	15	5632±529,3	
Laktasyon Sırası		1.	7	5282±480,5	ÖS
		2.	24	5641±393,3	
		3.	35	4910±282,9	
Yaş		3	31	4540 ^c ±222,6	**
		4	28	5357 ^b ±313,4	
		5	7	5935 ^a ±455,6	
Buzağılama mevsimi		Kış-İlkbahar	21	5495±390,9	ÖS
		Yaz-Sonbahar	45	5059±233,8	
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	CC	1.	2	5734±822,2	ÖS
	CT		5	4829±497,5	
	CC	2.	3	4978±557,6	
	CT		20	5304±234,3	
	TT	3.	1	6641±1013,2	
	CC		6	5547±635,5	
	CT		15	4561 ±440,2	
	TT		13	4623±350,1	
IGF-II Genotip X Yaş	CC	3	5	4199±429,8	*
		4	4	4876±663,6	
		5	2	7184±840,2	
	CT	3	20	4909±214,5	
		4	17	5362±298,3	
		5	3	4424±676,9	
	TT	3	4	4497±523,0	
		4	7	6071±616,9	
		5	3	6328±837,7	
IGF-II Genotip X Buzağılama mevsimi	CC	Kış-İlkbahar	2	5666±845,4	ÖS
	CT		15	4880±444,8	
	TT		4	6162±626,2	
	CC	Yaz-Sonbahar	9	5173±396,4	
	CT		25	4916±253,9	
	TT		10	5102,4±613,4	

a,b,c farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir. ÖS: önemsiz, *: P<0.05, **: P<0.01

Laktasyon sırası bakımından 2. Laktasyondaki değeri ($5641 \pm 393,3$ kg) en yüksek ve 3. Laktasyondaki değeri ($4910 \pm 282,9$ kg) en düşük değer olarak bulunmuştur. 305 günlük süt verimi genel ortalamasının üzerine, $5357 \pm 313,4$ kg ve $5935 \pm 455,6$ kg ile sırasıyla 4 ve 5 yaşlı ineklerin 305 günlük süt verim ortalamalarıyla çıkmıştır. Diğer taraftan 3 yaşlı ineklerden hesaplanan 305 günlük süt verimi ortalaması ($4540 \pm 222,6$ kg) sürü genel ortalamasının altında kalmıştır. Bu özellik bakımından buzağılama mevsimi kış- ilkbahar ($5495 \pm 390,9$ kg) mevsim aylarında ki ortalama, yaz-sonbahar ($5059 \pm 233,8$ kg) aylarındaki ortalamaya göre 435,9 kg daha fazla süt verimi elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Yapılan araştırmalarda IGF-II genotipi ile 305 günlük süt verim özellikleriyle ilişkilendirme ile ilgili literatürlere rastlanmadığı için bu özellik açısından diğer araştırmalarla karşılaştırma yapılamamıştır.

4.6.3. Laktasyon süresi

Çalışmada kullanılan Esmer İsviçre sığır ırkının laktasyon süresine ait en küçük kareler ortalamaları ve ortalamaların standart hataları ise IGF-II genotip, laktasyon sırası, ineğin yaşı, buzağılama mevsimi, IGF-II genotip X yaş, IGF-II genotip X laktasyon sırası ve IGF- II genotip X buzağılama mevsimine göre Çizelge 4.7 sunulmuştur. Varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 incelendiğinde IGF-II genotipi ve buzağılama mevsimi ile IGF-II genotipi X laktasyon sırası interaksyonu, IGF-II genotipi X yaş ve IGF-II genotipi X buzağılama mevsimi interaksyonunun laktasyon süresine etkisi önemsiz olduğu görülmüştür ($P > 0.05$). Laktasyon süresi için üzerinde durulan varyans unsurlarından yaşın etkisi önemli ($P < 0.05$) ve laktasyon sırasının etkisi çok önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur.

Çalışma materyalini oluşturan ineklere ait laktasyon süresi genel ortalaması $238 \pm 15,5$ gün tespit edilmiştir. IGF-II genotiplerine göre CC genotipi $221 \pm 29,2$, CT genotipi $225 \pm 18,2$ ve TT genotipi $281 \pm 34,0$ gün; 1., 2. ve 3. Laktasyon sırasına göre sırasıyla $75 \pm 30,9$, $317 \pm 25,3$ ve $267 \pm 18,2$ gün; 3, 4 ve 5 yaşlı ineklere göre $289 \pm 14,3$, $228 \pm 20,1$

ve $197 \pm 29,3$ gün; buzağılama mevsimine göre kış-ilkbahar mevsiminde $259 \pm 25,1$ ve yaz-sonbahar mevsiminde $217 \pm 15,0$ gün olarak belirlenmiştir. IGF-II genotipleri içerisinde laktasyon süresi ortalaması en büyük olan TT genotipinde CC genotipine göre 60 gün ve CT genotipine göre ise 56 gün daha uzun belirlenmiştir. Buna bağlı olarak gerçek sür verimi ve 305 günlük süt verimlerinde TT genotipi daha fazla süt veren genotip olmuştur. Bu özellik bakımından söz konusu genotipler arasında oluşan bu farklar istatistiki olarak anlamlı olmamıştır ($P > 0.05$).

İnteraksiyonlar değerlendirildiğinde IGF-II genotip X yaş interaksiyonunda laktasyon süresi ortalamaları CC ve CT genotipli 3 yaşındaki ineklerde sırasıyla $312 \pm 27,6$ ve $276 \pm 13,8$ gün; TT genotipli 4 yaşındaki ineklerde ise $307 \pm 39,6$ gün olarak en yüksek değerler tespit edilmiştir. Laktasyon süresi CC ve CT genotipli ineklerde yaş ilerledikçe düşüş, TT genotipinde 3-4 yaş arasında artış, 4-5 yaş arasında düşüş gerçekleşmiştir. Bu özellik bakımından en yüksek değer 2. Laktasyonda TT genotipinde ($321 \pm 65,1$) ve 3. laktasyonda ise CC genotipinde ($286 \pm 40,8$ gün) hesaplanmıştır. Bu süreler yaş arttıkça 2. Laktasyonda artış ve 3. Laktasyonda ise azalış olarak gözlenmiştir. IGF-II genotip X buzağılam mevsimi interaksiyonu dikkate alındığında ise hem kış-ilkbahar ($277 \pm 40,2$ gün) ve hem de yaz-sonbahar mevsiminde ($286 \pm 39,4$ gün) doğum yapan TT genotipli ineklerde en yüksek ortalama laktasyon süresi değerine ulaşmıştır (Çizelge 4.7).

Bu interaksiyonlarda herbir genotipe ait 3, 4 ve 5 yaştaki, 2. ve 3. laktasyondaki, kış-ilkbahar ve yaz-sonbahar mevsimlerinde doğan inekler arasında laktasyon süresi ortalamaları her ne kadar farklı bulunmuş olsada bu farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunamamıştır ($P > 0.01$) (Çizelge 4.4).

Bu özellik bakımından 66 inekten elde edilen verilere göre etkisi incelenen laktasyon sırasında 2. Laktasyon ($217 \pm 25,3$ gün), inek yaşında 3. yaşta ($289 \pm 14,3$ gün) ve buzağılama mevsiminde kış-ilkbahar doğumlarında ($259 \pm 25,1$ gün) en büyük laktasyon süresi değeri olarak tespit edilmiştir. İneklerin yaşı arttıkça laktasyon süresinde bir azalış kaydedilmiştir. Laktasyon süresine ait genel en küçük kareler ortalaması $238 \pm 15,5$ gün olarak saptanmıştır (Çizelge 4.7.). Yapılan araştırmalarda IGF-II genotipi ile laktasyon

süresinin ilişkilendirme ile ilgili literatürlere rastlanmadığı için karşılaştırma yapılmamıştır.

Çizelge 4.7. Laktasyon süresi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (gün)

GENEL			N	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Ö.S.
LAKTASYON SÜRESİ			66	238±15,5	
IGF-II Genotip	CC	11	221±29,2	ÖS	
	CT	40	225±18,2		
	TT	15	281±34,0		
Laktasyon Sırası	1.	7	75 ^c ±30,9	**	
	2.	24	317 ^a ±25,3		
	3.	35	267 ^b ±18,2		
Yaş	3	31	289 ^a ±14,3	*	
	4	28	228 ^{ab} ±20,1		
	5	7	197 ^b ±29,3		
Buzağılama Mevsimi	Kış-İlkbahar	21	259±25,1	ÖS	
	Yaz-Sonbahar	45	217±15,0		
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	CC	2.	3	311±35,8	ÖS
	CT		20	318±15,1	
	TT		1	321±65,1	
	CC	3.	6	287±40,8	
	CT		15	272±28,3	
	TT		13	242±22,5	
IGF-II Genotip X Yaş	CC	3	5	312±27,6	ÖS
		4	4	179±42,6	
		5	2	173±54,0	
	CT	3	20	276±13,8	
		4	17	223±19,2	
		5	3	177±43,5	
	TT	3	4	273±33,6	
		4	7	307±39,6	
		5	3	265±53,8	
IGF-II Genotip X Buzağılama Mevsimi	CC	Kış-İlkbahar	2	243±54,3	ÖS
	CT		15	262±28,6	
	TT		4	277±40,2	
	CC	Yaz-Sonbahar	9	200±25,5	
	CT		25	188±16,3	
	TT		10	286±39,4	

a,b,c farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir. ÖS: önemsiz, *: P<0.05, **: P<0.01

4.6.4. Günlük süt verimi

IGF-II genotipinin yaş, laktasyon sırası ve buzağılama mevsimi ile yaptığı interaksiyonlar incelendiğinde günlük süt verim ortalamaları farklı değerlere sahip olduğu kaydedilmiştir. Bu farklılıklar varyans analizinde anlaşıldığı gibi IGF-II genotip X yaş interaksiyonunda önemli ($P<0.05$) bulunurken, IGF-II genotip X laktasyon sırası ve IGF-II genotip X buzağılama interaksiyonlarında önemsiz olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Üzerinde çalışılan Esmer İsviçre sürüsünde günlük süt verimine ait genel ortalama değer $18\pm0,9$ kg olup bu değer IGF-II genotiplerinde sırasıyla CC, CT ve TT genotiplerde $19\pm1,7$, $17\pm1,1$ ve $19\pm2,0$ kg olarak saptanmıştır. Belirlenen bu ortalamalar istatistiki olarak önemsiz çıkmıştır. Sürünün günlük süt verim ortalamaları laktasyondan laktasyona değişkenlik göstermekte olup en büyük ortalama 1. Laktasyonda elde edilmiştir. Diğer taraftan ineğin yaşı artıkça elde edilen günlük süt verimi ortalamalarında artış gözlenmektedir. Laktasyonlar arasında belirlenen bu artış istatistik olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Sürüye ait ortalama günlük süt verimi değeri 3. yaşta $19\pm1,2$ kg ile yakalanmış olup bu değer 4. yaşta yaş grupları içerisinde $21\pm1,7$ kg ile maksimum değere ulaşmıştır. Yaşla birlikte ortalama günlük süt veriminde gözlenen artış diğer bir ifade ile yaşı süt verimine etkisi çok önemli ($P<0.01$) seviyede bulunmuştur. Kış-ilkbahar mevsim grubunda doğan ineklerden elde edilen ortalama günlük süt verimi 19 ± 1.5 kg ile yaz-sonbahar mevsim grubunda doğan ineklerden elde edilen ortalama değerden 1.8 kg kadar daha fazla süt alındığı tespi edilmiştir. Hesaplanan bu artış istatistik açıdan önemli bulunamamıştır ($P>0.05$) (Çizelge 4.8). Bagnicka *et al.* (2009) tarafından Holstein-Friesian ırkı sığırlarla yapılan bir çalışmada, IGF-II genotipi ile günlük süt verimini ilişkilendirmişlerdir. Çalışmayla araştırmacıların ortaya koydukları IGF-II genotiplerle süt verimi ilişkisi sonucu bu çalışma sonucuyla uyum içerisinde olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.8. Günlük süt verimi özelliğine ait ortalamalar ve standart hatalar (kg)

GENEL			N	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Ö.S.
GÜNLÜK SÜT VERİMİ			66	18,4±0,9	
IGF-II Genotip	CC		11	19,1±1,7	ÖS
	CT		40	17,2±1,1	
	TT		15	19,2±2,0	
Laktasyon Sırası	1.		7	20,7±1,8	ÖS
	2.		24	19,7±1,5	
	3.		35	17,1±1,1	
Yaş	3		31	15,2 ^b ±0,8	**
	4		28	19,6 ^{ab} ±1,2	
	5		7	21,4 ^a ±1,7	
Buzağılama Mevsimi	Kış-İlkbahar		21	19,3±1,5	ÖS
	Yaz-Sonbahar		45	17,5±0,9	
IGF-II Genotip X Laktasyon Sırası	CC	1.	2	21,2±3,1	ÖS
	CT		5	18,3±1,8	
	CC	2.	3	17,8±2,1	
	CT		20	18,5±0,9	
	TT		1	22,9±3,8	
	CC	3.	6	19,2±2,4	
	CT		15	16,7±1,6	
	TT		13	16,5±1,3	
IGF-II GENOTİP X Yaş	CC	3	5	14,1±1,6	*
		4	4	18,5±2,5	
		5	2	26,7±3,1	
	CT	3	20	17,6±0,8	
		4	17	18,9±1,1	
		5	3	16,0±2,5	
	TT	3	4	14,8±1,9	
		4	7	19,7±2,3	
		5	3	23,0±3,1	
	CC	Kış-İlkbahar	2	20,1±3,1	
IGF-II Genotip X Buzağılama Mevsimi	CT		15	17,1±1,7	ÖS
	TT		4	21,5±2,3	
	CC	Yaz-Sonbahar	9	18,1±1,5	
	CT		25	17,3±0,9	
	TT		10	16,9±2,3	

a,b farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir. ÖS: Önemsiz, *: P<0.05, **: P<0.01

5. SONUÇ

Atatürk Üniversitesi Ziraat İşletmesi'nde 60 baş ve Erdoğan Entegre Tarım ve Hayvancılık Tic. San. A.Ş. İşletmesinde 54 baş olmak üzere toplam 114 baş Esmer İsviçre ırkı ineklerden alınan kan örneklerine PCR-RFLP yöntemi kullanılarak genotipleri tespit edilmiştir. Tespit edilen genotipler ile Esmer sığırlarına ait verimler arasında ilişki incelenmiş, ancak Atatürk Üniversitesi Ziraat İşletmesi'nde hayvanların verim kaydı olmadığından değerlendirmeye alınamamıştır.

Popülasyon genelinde IGF-II RFLP/MboII polimorfizmi CC, TT ve CT sırasıyla %34, %12 ve CT %54 olarak görülmüştür. Popülasyonda bulunan IGF-II ait CC, CT ve TT genotip sayıları sırasıyla 41, 65 ve 14 olarak tespit edilmiştir. C allelinin frekansı 0,61 ve T allelinin frekansı 0,39 olarak hesaplanmıştır. Hardy-Weinberg genetik denge testine göre popülasyonda genotip frekansları dağılımının dengede ($\chi^2:0,1222$) ($P>0.05$) olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada Esmer İsviçre ineklerine ait gerçek süt verimi genel ortalaması $4317 \pm 272,9$ kg olarak saptanmıştır. Bu özellik bakımından IGF-II genotiplerinden elde edilen değerlerden TT genotipi ($5382 \pm 600,3$ kg), CC ve CT genotiplerine göre en yüksek değeri almış olup, bu değer genel ortalama ($4317 \pm 272,9$ kg) değerden 1547 kg kadar daha fazla tespit edilmiştir. Varyans analiz sonucuna göre sadece gerçek süt verimine IGF-II genotiplerin, IGF-II genotipi X laktasyon sırası interaksyonunun ve IGF-II genotipi X buzağılama mevsimi interaksyonunun etkisi önemsiz ($P>0.05$) bulunurken IGF-II genotipi X yaş interaksyonunun etkisi önemli ($P<0.05$) bulunmuştur.

Çalışma materyalini oluşturan ineklere ait 305 gün süt verimi genel ortalaması $5277,1 \pm 240,66$ kg olarak tespit edilmiştir. Genotiplerden elde edilen genel ortalamalar arasında farklar gözlenmiş fakat bu farklar istatistiki olarak önemsiz ($P>0.05$) olduğu belirlenmiştir. Genotipler arasında genel ortalaması en yüksek TT genotipi ($5632 \pm 529,3$ kg), laktasyon sırasında 2. Laktasyon ($5641 \pm 393,3$), buzağılama mevsinde

kış-ilkbahar ($5495 \pm 390,9\text{kg}$), inek yaşında yaşıta 5 yaşlı olanlar ($5935 \pm 455,6\text{kg}$) değeri elde edilmiştir. Yapılan önem testine göre genotipler, IGF II genotipi X laktasyon sayısı intereksiyonu ve IGF II genotipi X buzağılama mevsimi interaksiyonunun etkisi önemsiz ($P > 0.05$); IGF II genotipi X yaş interaksiyonunun etkisi önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur.

Esmer ineklerine ait günlük süt verimi ortalaması $18,4 \pm 0.9$ kg'dır. Çevresel faktörü olarak alınan ortalamalar bakımından en yüksek değer IGF-II genotiplerinde TT ($19 \pm 2.0\text{kg}$) ve CC genotipi ($19 \pm 1.7\text{kg}$), laktasyon sırasında 1. laktasyon (20 ± 1.8), yaşıta 5 yaş ($21 \pm 1.7\text{kg}$) ve buzağılama mevsiminde ise kış-ilkbahar ($19 \pm 1.5\text{kg}$) olarak elde edilmiştir. Varyans analiz testinde IGFII genotipler, laktasyon sırası, buzağılama mevsimi, IGF II genotip X laktasyon sırası ve IGF II genotip X buzağılama mevsimi interaksiyonlarında günlük süt verime etkisi önemsiz ($P > 0.05$); IGF II genotip X yaş interaksiyonunda önemli ($P < 0.05$), yaş etkisinin çok önemli ($P < 0.01$) olarak bulunmuştur.

Laktasyon süresi genel ortalaması Esmerde 238 ± 15.5 gün; CC, CT ve TT IGF-II genotiplerinde sırasıyla $221 \pm 29,2$, $225 \pm 18,2$ ve $281 \pm 34,0$ gün olarak belirlenmiştir. En uzun ortalama laktasyon süresine sahip olan TT genotipi, genel ortalama laktasyon süresinden 43 gün daha fazla değere ulaşmıştır. Esmer sığırlarında laktasyon süresinin genotiplerle ilişkisi incelendiğinde IGF-II genotipi, IGF II genotip X laktasyon sırası, IGF II genotip X yaş ve IGF II genotip X buzağılama mevsimi interaksiyonlarının laktasyon süresine etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Esmer İsviçre sığırlardan alınan kan numunelerinden PCR-RFLP yöntemi kullanılarak her bir bireye ait IGF-II genotipleri tespit edilmiştir. IGF-II gen polimorfizmi bakımından tespit edilen genotip ve allel frekansları ırkın genotip çeşitliliğini ortaya koymada yeterli sayılabilir.

Yapılan istatistik analizlerde, IGF-II genotipleri ile incelenen performans özellikleri (gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, laktasyon süresi ve günlük süt verimi gibi süt verimi özellikleri) arasındaki ilişkiler anlamlı bulunamamıştır. Ancak farklı örneklerle, büyüklükleri farklı ırklar üzerinde ve farklı performans özellikleri ile yapılacak benzer çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- Akbulut, Ö., 1990. Atatürk Üniversitesi Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Esmer, İleri Kan Dereceli Esmer Melezleri İle Siyah Alaca Sığırların Süt Verim Özellikleri ve Laktasyon Eğrisi Parametrelerine Etkili Faktörler. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootehni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Akkaya, Ö.Ö., 2014. Metoxychlor'un Sıçan Ovaryumunda IGF-I Sinyal Yolağı Özellikleri Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı Afyonkarahisar.
- Akman, N., 1998. Pratik Sığır Yetiştiriciliği Türk Ziraat Mühendisleri Birliği Vakfı Yayını.77-80, Ankara.
- Aksakal, E. ve Erdoğan, O. 2008. PCR-RFLP Uygulamalarının Su Ürünlerinde Kullanım Alanları, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü Erzurum.
- Aktaş, T. ve Bakır, G. 2011. Konuklar Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Esmer Sığırların Süt ve Döl Verim Özellikleri, GAP VI. Tarım Kongresi, Şanlıurfa.
- Anonim, 2012. <http://www.torunoglutohum.com/bilgi-bankasi/kombine-verimli-sigir-irklari/montofon-sigir-irki-brown-swiss>
- Anonim a, 2016 'http://www.tuik.gov.tr.
- Anonim b, 2016 <http://veteriner48.tr.gg/MONTOFON.htm>.
- Anonim c, 2016. Erzurum İl Gıda Tarım Ve Hayvancılık Müdürlüğü Verileri
- Anonim, 2014. <http://image.slidesharecdn.com/hanudattas-141126033824-conversiongate02/95/protein-nanotube-based-probes-for-cancer-cell-imaging-15638.jpg?cb=1416973372>
- Arıkan, Ş., 2013. Üniversite Öğrencilerinin Vücut Ağırlığı, Vücut Kitle İndeksi, Plazma Büyüme Hormonu-, Ghrelin-, Leptin Düzeyleri ve Dayanıklılık Antrenmanı Arasındaki İlişkiler. Doktora Tezi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Aydın, R., 1998. Atatürk Üniversitesi Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Esmer ve siyah alaca sığırların süt verimindeki genetik ve fenotip yönelimler ile bazı genetik parametrelerin tahmini. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootehni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Bagnicka, E., Siadkowska, E., Strzalkowska, N., Zelazowska, B., Flisikowski, K., Krzyzewski, J., et. al., 2009. Association Of Polymorphisms In Exons 2 And 10 Of The Insulin-Like Growth Factor 2(IGF2) Gene With Milk Production Traits In Polishholstein-Friesian Cattle. J. Dairy Res. (2010) 77, 37–42.Doi:10.1017/S0022029909990197.
- Bakır, B. ve Kocamış, H., 2011. İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü-1 'In Japon Bildircin Embriolarında Kemik Gelişimi Üzerine Etkileri. Kafkas Univ Vet Fak. Derg. DOI:10.9775/Kvfd.2010.3912.
- Baklacı, C.T., 2005. Türkiye Yerli Sığır Irklarının Büyüme Hormon Geni Polimorfizmi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Zootehni Anabilim Dalı, Adana.
- Berkowicz, E., Magee, D., Sikora, K., Berry, D., Howard. et al., 2011. Single Nucleotide Polymorphisms At The Imprinted Bovine Insulin-Like Growth

- Factor 2 (IGF2) Locus Are Associated With Dairy Performance in Irish Holstein-Friesian Cattle. *Journal Of Dairy Research*, 78(1), 1-8. Doi:10.1017/S0022029910000567
- Curchoe, C. L., Zhang, S., Yang, L., Page, R. and Tian, X. C. 2009. Bypomethylation Trends In The Intergenic Region Of The Imprinted IGF2 And H19 Genes In Cloned Cattle, *Animal Reproduction Science* 116 (2009) 213–225.
- Curchoe, C., Zhang, S., Bin, Y., Zhang, X., Yang, L., Feng, D., O'Neill, M. and Tian, X. C. 2005. Promoter-Specific Expression Of The Imprinted IGF2 Gene In Cattle (*Bos Taurus*), *Biology Of Reproduction* 73, 1275–1281 (2005).
- Çakıllı, F. ve Güneş, H., 2007. Esmer Sığırların Süt Verimi Özellikleri Üzerine Araştırma İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi 33(3)/43-58.
- Çakır İ, M. ve Çakmakçı L., 2005. Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Sayfa: 1-7.
- Çamurcu, H., 2005. Dünya Nüfus Artışı Ve Getirdiği Sorunlar, *Balıkesir Sosyal Bilimler Dergisi*, ss.87-105.
- Devrim A.K. ve Kaya N., 2004. Genetik Polimorfizm ve Mikrosatelitler. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 10(2), s 215-220.
- Dias, V.A.D., Curi, R. A., Pereira, G. L., Malheiros, J. M., Espigolan, R., De Albuquerque, L. G., Chardulo, L. A. L., and De Oliveira H.N. 2016. Frequencies Of Candidate Genes And Associations With Carcass And Meat Traits In Nellore And Crossbred Cattle, DOI: 10.1590/S0100-204X2016000200009.
- Du, X. H., Chen, C., Yuan, Z. R., Zhang, L. M., Chen, X. J. *et al.* 2013. Genetic Polymorphisms of Mc4R and IGF2 Gene Association with Feed Conversion Efficiency Traits in Beef Cattle, ISSN: 0253-8318 (PRINT), 2074-7764 (ONLINE).
- Düzgüneş, O., 1976. Hayvan Islahı. Çukurova Üniv. Zir. Fak. Yayın NO:93
- Erdem, H., 1997. Gökhöyük Tarım İşletmesinde Yetiştirilen Siyah Alaca Sığırların Süt ve Döl Verim Özellikleri ve Bu Özelliklere Ait Bazı Parametrelerin Tahmini Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootečni Anabilim Dalı, Samsun.
- Fagundes, N.S., Michalczechen-Lacerda, V.A., Caixeta, E.S., Machado, G.M., Rodrigues, F.C. *et al.* 2010. Methylation Status In The Intragenic Differentially Methylated Region Of The IGF2 Locus In *Bos Taurus Indicus* Oocytes With Different Developmental Competencies, *Molecular Human Reproduction*, Vol.17, No.2 pp. 85–91, 201.
- Franco, M. M., Fagundes, N. S., Michalczechen-Lacerda, V. A., Caixeta, E. S., de Castro Rodrigues, F., Machado, G. M., Ferreira, A. R., Dode, A. M. N. 2013. Characterisation Of The Methylation Pattern In The Intragenic CpG Island Of The IGF2 Gene In *Bos Taurus Indicus* Cumulus Cells During In Vitro Maturation, *J Assist Reprod Genet* (2014) 31:115–120.
- Gebert, C., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Gröger, D., Reinhardt *et al.*, 2006. The bovine IGF2 Gene Is Differentially Methylated In Oocyte And Sperm DNA, *Genomics* 88 (2006) 222–229.
- Gebert, C., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Gröger, D., Thiel, J. *et al.* 2009. DNA Methylation in the IGF2 Intragenic DMR Is Re-Established in a Sex-Specific

- Manner In Bovine Blastocysts After Somatic Cloning, *Genomics* 94 (2009) 63–69.
- Goodall J.J. ve Schmutz S.M., 2003. Linkage Mapping of IGF2 on Cattle Chromosome 29. *Animal Genetics*, 34: 313.
- Güngör, Ö.F. ve Ünal, N., 2015. Epigenetik ve Genomik Baskılanma, *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 2015, 55 (2) 73-81.
- Harbili, S., 2008. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz Metabolizması ve Kas Dokusu Üzerine Etkileri, Selçuk Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu, Konya.
- Hodoğlugil, S., 1996. Ereğli Koyunculuk Üretim İstasyonunda Yetiştirilen Siyah Alaca ve Esmer İsviçre Sürülerinin Döl Ve Süt Verim Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Konya.
- Huang, Y.Z., Zhan, Z. Y., Li, X. Y., Wu, S.R., Sun, Y.J. *et al.*, 2013. SNP and Haplotype Analysis Reveal IGF2 Variants Associated With Growth Traits in Chinese Qinchuan Cattle, *Mol Biol Rep* (2014) 41:591–598.
- Kaffer, C.R., Srivastava, M., Park, K.Y., Ives, E., Hsieh, S. *et al.*, 2000. A Transcriptional Insulator At The Imprinted H19/Igf2 Locus, *Genes & Development* 14:1908–1919.
- Keleş, M. ve Türkeli, M., 2005. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri Sistemi Ve Kanser, *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2005:3(2):39_43.
- Kopuzlu, S., 2003. Esmer Ve Siyah Alaca Irkı Sığırların Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü İşletmesi Şartlarında Süt Verimi, Döl Verimi, Büyüme Ve Yaşam Gücü. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Mercan, L. ve Okumuş, A., 2004. Hayvanda Genetik Çeşitlilik ve DAD-IS,4. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, ISPARTA.
- O'Doherty, A.M., MacHugh, D.E., Spillane, C. and Magee, D.A., 2015. Genomic Imprinting Effects on Complex Traits in Domesticated Animal Species, *Front Genet.* 2015; 6: 156, doi: 10.3389/fgene.2015.00156.
- Okutucu, B. Ve Pehlivan, S. 2003. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Bornova-İZMİR.
- Olbromski, R., Siadkowska, E., Zelazowska, B., Zwierz chowski, L. 2012. Allelic Gene Expression İmbalance Of Bovine IGF2, LEP and CCL2 Genes In Liver, Kidney And Pituitary, *Mol Biol Rep* (2013) 40:1189–1200.
- Özdemir, M., 2001. Çeşitli Sığır Irklarında Süt Protein Polimorfizmi ve Verim Özellikleri ile İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Özdemir, M., 2006. Türkiye Yerli Sığır Irklarında Mitokondriyal DNA Polimorfik Yapılarının PCR-RFLP ve DNA Dizi Analizi Yöntemleri ile İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Özhan, M., Tüzemen, N. ve Yanar, M., 2012, Büyük Baş Hayvan Yetiştirme, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, yayın no:134, 6. Baskı, Erzurum.
- Park, C.H., Kim, H.S., Lee, S.G., Lee, C.K., 2008. Methylation Status Of Differentially Methylated Regions at Igf2/H19 Locus In Porcine Gametes And Preimplantation Embryos, *Genomics* 93 (2009) 179–186.

- Rinderknecht E, Humbel RE., 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin, J Biol Chem. 1978 Apr 25;253(8):2769-76.
- Robbins, K.M., Chen, Z., Wells, K.D. and Rivera, R.M., 2012. Expression of KCNQ1OT1, CDKN1C, H19, and PLAGL1 and The Methylation Patterns at the KvDMR1 and H19/IGF2 Imprinting Control Regions Is Conserved Between Human and Bovine, Journal of Biomedical Science 2012, 19:95.
- Ron, M., Israeli, G., Seroussi, E., Weller, JI., Gregg, JP. *et al.*, 2007. Combining Mouse Mammary Gland Gene Expression And Comparative Mapping For The Identification Of Candidate Genes For QTL of Milk Production Traits In Cattle. BMC Genomics 8 183 (doi:10.1186/1471-2164-8-183).
- Salmon W.J. and Daughaday W., 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro, J Lab Clin Med. 1957 Jun;49(6):825-36.
- Silva, A.M., Rios, A.F.L., Ramos, E.S., Lôbo, R.B., Oliveira, H.N. and de Freitas¹, M.A.R., 2011. Association between IGF2 and CYP21 Gene Polymorphisms And Characteristics Of Economic Interest In Nelore Cattle , Genetics and Molecular Research 10 (3): 2140-2147 (2011).
- Smith, L.C., Therrien, J., Filion, F., Bressan, F. and Meirelle, F.V., 2015. Epigenetic Consequences of Artificial Reproductive Technologies to the Bovine Imprinted Genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R, doi: 10.3389/fgene.2015.00058.
- Somma, M. ve Querci, M., 2010. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR). ,Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri, Querci, M., Jermini, M., ve den Eede, G.V. Avrupa Birliği Resmi Yayınlar Dairesi, Luksenburk, 9-18. <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/copacitybuilding/documentation.htm>.
- Soysal, İ.M., 1983. Atatürk Üniversitesi Koyun Populasyonunun Bazı Kalıtsal Polimorfik Kan Proteinleri Bakımından Genetik Yapısı Ve Biyokimyasal Karakterler İle Çeşitli Verim Özellikleri Arasında İlişkiler. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Sönmez, Z., 2013. Doğu Anadolu Kırmızısı ve melezi sığırlarda prolaktin geni polimorfizmi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Erzurum.
- Stinckens, A., Mathur, P., Janssens, S., Bruggeman, V.O., Onagbesan, M. *et al.* 2010. Indirect effect of IGF2 Intron3 g.3072G>A Mutation On Prolificacy in Sows, Stichting International Foundation For Animal Genetics, 41, 493–498, doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02040.x.
- Tüzemen, N., 1998 Esmer Sığırlarda Kuruda Kalma Süresinin Süt Verimi Özelliklerine Etkisi Doğu Anadolu Tarım Kong., 14-18 Eylül, 2(3), 779-785.
- Ülker, H., Baş, S., Vanlı, Y., Karaca, O., Aygün, T., 1999. Transferrin Polimorfizmin Karakaş Kuzularının Bazı Verim Özellikleri İle İlişkileri. Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat Fak. Tarım Bilimler Dergisi, 9(1), 23-28
- Üstünbaş, S., 2008. Batı Türkiye’de yayılıs gösteren su sıçanı, *arvicola terrestris* (linnaeus, 1758) (mammalia: rodentia) populasyonlarının rapd-pcr analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

- Yaylalı, G.F., 2009. Obez İnsülin Direnci Olan Hastalarda Igf-1 Gen Polimorfizmi. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, Denizli.
- Zeric, D., 2012. Importance of Epigenetics in Animal Breeding: Genomic Imprinting. Swedish University of Agricultural Sciences Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Animal Breeding and Genetics, Bachelor Thesis – Animal Science, Uppsala 2012.
- Zhang, Z. and LI, Q., 2008. Association of polymorphism of IGF-II Gene With Growth Traits in Nanyang cattle, *Front. Biol. China*, DOI 10.1007/s11515-008-0099-y
- Zwierzchowski, L., Siadkowska, E., Oprządek, J., Flisikowski, K., Dymnicki, E., 2010. An Association of C/T Polymorphism in Exon 2 of the Bovine Insulin-Like Growth Factor 2 Gene With Meat Production Traits in Polish Holstein-Friesian cattle, *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 2010 (6): 227–233.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Erzurum’da okudu. Üniversiteyi Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliğinden 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsün’de yüksek lisansa başladı.

