T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA KEÇİLERİNİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE DNA PARMAK İZLERİNİN BELİRLENMESİ

SEÇİL CAMBAZOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
Konya, 2008

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA KEÇİLERİNİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE DNA PARMAK İZLERİNİN BELİRLENMESİ

SEÇİL CAMBAZOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

2008

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANKARA KEÇİLERİNİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE DNA PARMAK İZLERİNİN BELİRLENMESİ

Seçil CAMBAZOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14.07.2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Saim BOZTEPE
(Danışman)

Prof.Dr.Ayhan ÖZTÜRK
(Üye)

Öğr.Gör.Dr.Fulya ÖZDİL

(Üye)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA KEÇİLERİNİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE DNA PARMAK İZLERİNİN BELİRLENMESİ

SEÇİL CAMBAZOĞLU
Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Saim BOZTEPE
2008, 58 sayfa

Jüri: Prof. Dr. Saim BOZTEPE
Prof. Dr. Ayhan ÖZTÜRK
Öğr. Gör. Dr. Fulya ÖZDİL

Bu çalışmada amaç, RAPD-PCR yöntemini kullanarak Ankara keçilerinde genetik polimorfizmi belirlemektir. Bireysel genotiplerin analizi genetik benzerlik, polimorfizm ve heterozigotluk gibi populasyon içi genetik parametrelerin anlaşılması için bilgi sağlamıştır.

RAPD-PCR yöntemi, 50 baş Ankara keçisi için toplam 8 farklı primer kullanılarak çalıştırılmıştır. Tüm primerlerin kullanılmasıyla toplam 1847 bant değerlendirilmiştir. Bütün RAPD bantları 200-3000 bç aralığında tespit edilmiştir. RAPD-PCR kullanarak Opm10 primeri ile toplam 345 DNA fragmenti elde edilirken, Ra59 primeri ile 113 DNA bandı elde edilmiştir. Toplam 62 fragmanın 57'si polimorfik, 5'i ise monomorfik bulunmuştur. Ortalama heterezigotluk oranı 0.3038 ± 0.1582 olarak tahmin edilmiştir.
Anahtar Kelimeler: Ankara keçisi, polimorfizm, RAPD-PCR

ABSTRACT

Master Thesis

THE DETERMINATION OF DNA FINGERPRINTING OF ANKARA GOATS BY RAPD-PCR METHOD

SEÇİL CAMBAZOĞLU

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Departmant of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Saim BOZTEPE

2008, 58 page

Jury: Prof. Dr. Saim BOZTEPE

Prof. Dr. Ayhan ÖZTÜRK

Dr. Fulya ÖZDİL

The objective of this research was to determine the genetic polymorphism within Ankara Goat by using the Ramdomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method. Analysis of individual genotypes provided information for understanding within population genetic parameters such as genetic similarity, polymorphism and heterozygosity.

RAPD-PCR was employed by using a total of 8 different primers for 50 goats. A total of 1847 DNA bands were evaluated. All the RAPD bands were determined to be between 200-3000 bp in size. The RAPD-PCR using primer Opm10 resulted 345 DNA fragments. On the other hand, the RAPD-PCR using primer Ra59 resulted 113 DNA fragments. From 62 fragments 57 were polymorphic and 5 fragments were monomorphic. The avarage expected heterozygosity was estimated as 0.3038± 0.1582.

Key Words: Ankara goat, polymorphism, RAPD-PCR

TEŞEKKÜR

Bu projenin planlanmasında ve yürütülmesinde öncülük eden, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Saim BOZTEPE'ye teşekkür ederim.

Sunduğu laboratuvar imkânlarıyla birlikte desteğini ve bilgisini esirgemeyen, istatistiksel analizlerin yapılmasında katkısı olan Sayın Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ'a, Arş. Gör. Hasan MEYDAN'a, Yüksek lisans öğrencisi Ozan TAŞKESEN'e teşekkür ederim.

Kan örneklerinin alınması için gerekli izni veren TİGEM yöneticilerine, yardım ve misafirperverlik örneği gösteren Anadolu Tarım İşletmesi Müdürlüğü yönetici ve personeline teşekkür ederim.

Hayvanlardan kan örneklerinin alınması sırasında yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Uğur ZÜLKADİR, tezimi gerçekleştirmemde büyük katkısı olduğuna inandığım Arş. Gör. İbrahim AYTEKİN'e ve Uzman Özcan ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Beni yetiştiren ve bügüne getiren, bu çalışmamda ve hayatımdaki her durumda maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen aileme, arkadaşım Derya YÖNDEN'e ve bana her konuda yardımcı olmaya çalışan, bende özel bir yeri olan arkadaşım Mehmet AĞAR'a ayrıca her zaman bana duyduğu güvenini hiç esirgemeyen Ekin TÜRKMEN'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Seçil CAMBAZOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜRLER iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. DNA Belirleyicileri (Markerleri) 5
2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 7
2.1.1.1. RAPD 9
3. MATERYAL VE METOT 17
3.1. Materyal 17
3.1.1. Araç ve Gereçler 17
3.1.2. Tampon Çözeltiler 19
3.2 . Metot 20
3.2.1. Kan örneklerinin alınması 20
3.2.2. Genomik DNA izolasyonu 20
3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması 22
3.2.4. Kullanılan primerlerin seçimi 22
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu 24
3.2.6. Elektroforez çözeltisi 26
3.2.7. Jelin hazırlanması ve dökülmesi 26
3.2.8. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi 27
3.2.9. Jele yüklenen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi 28
3.2.10. RAPD bantlarının görüntülenmesi 29
3.2.11. RAPD bantlarının değerlendirilmesi ve genetik analizler 29

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 32
4.1. RAPD-PCR Bantlarının Analizi 32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 51
6. KAYNAKLAR 53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Lenght Polymorphism – (Çoğaltılmış Uzunluk Parça Polimorfizmi)
bç (bp)	Baz çifti
bd	Bidestile su
C	Sitozin
d	Döngü
DİE	Devlet İstatistik Enstitüsü
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleiksit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA	Ethylendinitrilotetraaceticacid
G	Guanin
h	Heterezigotluk
I	Lokusların bilgi içeriği
kg	Kilogram
l	Litre
M	Molar
µg	Mikrogram
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
na	Allel sayısı
ne	Etkili allel sayısı
ng	Nanogram
nm	Nonometre
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System – (Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi)

OD	Optic Density
PCO	Principal Component Analysis – (Temel Bileşen Analizi)
PCR	Polymerase Chain Reaction – (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
QTL	Quantitative Trait Loci – (Kantitatif Özellik Lokusları)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA – (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfizmik DNA)
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism – (Restriksiyon Uzunluk Parça Polimorfizmi)
rpm	Rotation per minute - Dakikada döngü sayısı
s	Saniye
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region – (Sekans Özgü Çoğaltılmış Bölge)
SSR	Simple Sequence Repeat – (Basit Tekrar Dizileri)
T	Timin
Taq	Termus Aquaticus
TE	Tris-EDTA
Tm	Melting Temperature-Bağlanma Sıcaklığı
U	Ünite
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats - (Değişken Sayılı Ardarda Tekrarlar)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonun (PCR) Şematik Gösterimi 8
Şekil 2.2. PCR Ürünlerinin Jelde Yürütülmesi ve Bantların Elde Edilmesi 12
Şekil 3.1. Biorad Thermal Cycler 96 Örneklik PCR Cihazı 25
Şekil 3.2. PCR Ürünlerinin Jel Kuyularına Yüklenmesi 27
Şekil 3.3. PCR Ürünlerinin Jel Kuyularına Yüklenmiş Hali 28
Şekil 3.4. Yatay Elektroforez Cihazı 28
Şekil 3.5. Jel Görüntüleme Analiz Sistemi 29
Şekil 3.6. Üç Bireye ait RAPD Bantları 30
Şekil 4.1. Op08 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 34
Şekil 4.2. Opm10 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 35
Şekil 4.3. Opp08 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 36
Şekil 4.4. Opp11 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 37
Şekil 4.5. Opp15 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 38
Şekil 4.6. Opq06 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 39
Şekil 4.7. Ra35 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 40
Şekil 4.8. Ra59 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü 41
Şekil 4.9. 50 Ankara Keçisinin 8 RAPD Markörü Bakımından UPGMA Dendogramı 49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Yaygın Olarak Kullanılan DNA Marker Tekniklerinin Karşılaştırılması 6
Çizelge 2.2. DNA Marker Tekniklerinin Uygulama Aşamaları 9
Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereç Listesi 18
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Molaritesi / Miktarı ve İçerikleri 19
Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan RAPD Primerleri ve Bazı Özellikleri..... 23
Çizelge 3.4. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Miktarları 24
Çizelge 3.5. PCR Programı 25
Çizelge 4.1. 50 Ankara Keçilesinden, 8 Adet Primer ile Elde Edilen Bant Sayısı ve Aralıkları 33
Çizelge 4.2. Kullanılan Primerlere Ait Her Bir Lokus İçin Gen Frekansları..... 42
Çizelge 4.3. Kullanılan Primerlere Ait Her Bir Lokus İçin Heterozigotluk Oranları..... 43
Çizelge 4.4. 50 Ankara Keçisinin 8 Adet RAPD Markörü Bakımından Genetik Uzaklık Değerleri..... 44
Çizelge 4.5. Kullanılan Primerlere Ait Her Bir Lokus İçin Genetik Varyasyon Ölçütleri 47

1. GİRİŞ

Populasyonların genetik özelliklerinin belirlenmesinde yakın zamanlara kadar polimorfik biyokimyasal sistemler kullanılmaktaydı. Daha sonra, DNA düzeyinde genetik varyasyonu saptamaya yönelik tekniklerin geliştirilmesiyle bireylerin genotiplerini doğrudan belirleme imkânı elde edilmiştir. Günümüzde DNA düzeyinde saptanan genetik varyasyon; çiftlik hayvanlarında genetik farklılığın tanımlanmasında, farklı ırk ve ekotipler arasındaki genetik ilişkilerin tahmin edilmesinde ve pedigri tayini gibi çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Cerit, 2003). Son yıllarda canlıların genetik yapılarının araştırılmasında DNA parmak izi yöntemlerinin yaygın bir şekilde kullanılmasına karşın, bu tür çalışmaların ülkemizde kullanılması oldukça yenidir. Doğrudan nükleik asit sıralanışındaki varyasyonu belirlemeye yönelik yöntemlerin çoğu tek nükleotid bazındaki değişimi belirleyebilecek kapasitededir. Bu nedenle her birey için özgün bir parmak izi modelinin saptanması mümkündür. Genetik varyasyonun bu yöntemlerle duyarlı bir şekilde ölçülebilmesi, araştırıcıları DNA markerleri ile çalışmaya yönlendiren önemli sebeptir.

Günümüze kadar, DNA markerlerinin kullanımı ile genetik varyasyonun saptanması amacıyla çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bunların başlıcaları; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), Mikrosatelit (Microsatellite), SNP (Single nucleotide polymorphism; Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA; Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)' dir. Bu tekniklerin hemen hepsi PCR (Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelinde çalışmaktadır. Çeşitli yöntemler kullanılarak nükleik asit düzeyinde saptanan polimorfizmin Mendel kalıtımı göstermesi, bunların genetik marker olarak kullanımını olanaklı hale getirmektedir (Bardakçı ve Skibinski, 1994). Bugüne kadar DNA seviyesindeki bu tip çalışmalara; koyun (Crawford ve ark. 1994, Cushwa ve ark. 1996, Aytekin 2006), keçi (Yongjun ve ark. 1998, Saitbekova ve ark. 1999, Ajmone-Marsan ve ark. 2001, Li ve ark. 2002, Şahin 2005), sığır (Ajmone-Marsan

ve ark. 1997, Güneren 1999, Horng ve Huang 2000), muhtelif kanatlı türleri (Dunnington ve ark. 1990, Plotsky ve ark. 1995, Burt ve ark. 1995, Smith ve ark. 1996, Wei ve ark. 1997, Sharma ve ark. 2001a) ve domuz (Yen ve ark. 2001) gibi birçok çiftlik hayvanı türünde rastlanmıştır.

DNA düzeyinde polimorfizm belirleme yöntemlerinden birisi olan rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR; RAPD-PCR) yöntemi, rasgele primerler kullanılarak, PCR' da özgün DNA fragmentlerinin çoğaltılması temeline dayanır. Diğer polimorfizm yöntemlerine göre daha basit, göreceli olarak daha ucuz ve daha az iş gücü gerektirdiğinden yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye yerli hayvan gen kaynaklarından olan Ankara keçisinin DNA düzeyinde genetik varyasyonunu tespit etmek, RAPD-PCR yönteminin kullanılabilirliğini ortaya koymak ve bu populasyona ait DNA parmak izlerini çıkarmak amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Polimorfizm, populasyonlardaki genetik dengenin bir ürünü olup, bir populasyonda herhangi bir özelliğin iki ya da daha fazla formunun aynı anda ve sadece tekrarlanan mutasyonlarla açıklanamayan oranlarda bulunmasını ifade eder (Ashton 1958). Diğer bir ifadeyle polimorfizm, bir lokusta birden fazla allelin varlığı şeklindeki nükleotid değişimlerine denir. Populasyon boyutunda düşünülürse, bir populasyonda iki ya da daha fazla alternatif fenotipin varlığı olarak tanımlanabilir (Anonim 2006).

Son zamanlarda, genetik yapının belirlenmesinde moleküler genetik tekniklerinden yaygın olarak yararlanılmaktadır. Yetiştirme programlarında ekonomik önemi olan karakterlerin ölçümlerinin yanında, gelişmiş moleküler tekniklerin uygulanmasıyla, bu özellikleri belirleyen genlerin kromozom üzerindeki yerlerinin tespiti de yapılabilmektedir. Moleküler biyoloji tekniklerinin ilerlemesi ile DNA düzeyinde farklı polimorfizm belirleme yöntemleri geliştirilmiştir (Şahin 2005).

Beuzen ve ark. (2000)'na göre, hayvan yetiştiriciliğinde genetiğin etkisini tanımlamak için genellikle fenotipik analizler ile işe başlanır. Buna karşın moleküler genetikte, bilinen allel veya DNA dizileri ile başlanmakta ve daha sonra bunların fenotipe etkileri değerlendirilmektedir. Ökaryotik genomlar yüksek bir oranda DNA dizi varyasyonları (polimorfizm) göstermektedir. Populasyonlarda veya bireylerde bu varyasyonları tespit amacıyla son yıllarda DNA düzeyinde moleküler genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarına ağırlık verilmiştir (Aytekin 2006).

Yaygın kullanılan moleküler biyoloji tekniklerinden birisi olan DNA Parmak izi analizleri (DNA Fingerprinting) ilk kez Jeffreys ve ark. (1985) tarafından Leicester Üniversitesi'nde insanlar üzerinde yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır. Daha sonra diğer canlılarda uygulanmasına yoğun bir şekilde başlanmıştır. Kedi ve köpekler (Jeffreys ve Morton 1987), atlar, koyunlar ve domuzlar (Morton ve ark.

1987) üzerinde yapılan çalışmalardan başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu teknikle her bireye özgü DNA bantları elde edilebilmektedir. Elektroforez sonunda oluşturulan bireye özgü bu DNA bant modelleri DNA parmak izi (DNA fingerprint) olarak tanımlanmaktadır.

DNA parmak izi aslında minisatellit denen DNA tekrar dizilerinin sayısındaki farklılıktan doğmaktadır. Minisatellit DNA, belirli bir türün DNA'sının nükleotid bileşiminin (% G-C oranı) santrifüjlenmesiyle saptanabilen yoğunluğunu yansıtır. Ökaryotik DNA bu yolla incelendiğinde, DNA'nın büyük bir kısmı hemen hemen homojen yoğunluktaki tek bir bant şeklinde gözlenir. Bir veya daha fazla yoğunluktaki bantlar farklı yoğunluktaki DNA'yı temsil etmektedir. Bu bileşen, uydu DNA olarak adlandırılır ve türe göre toplam DNA'ya oranı farklılık gösterir. Bu minisatellit dizileri 2 ile 100 nükleotid uzunluğundaki DNA bölgeleridir (Anonim 2005).

DNA parmak izi bireylerin DNA karakteristiklerinin tespitinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bireylere ait elde edilen DNA bant modelleri tıpkı parmak izi gibi kişiye özgü olduğundan, DNA parmak izi teknikleri günümüzde canlıların genetik özelliklerini saptamak için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bireyin özgünlüğü ve tüm dokularda aynı DNA'ya sahip olması DNA analizlerinin temel ilkeleridir.

Günümüzde DNA parmak izi analizinde kullanılan belli başlı DNA markerleri mikrosatellitler, CR-1 (chicken repeat) genler, ev (endogenöz virüs) genleri, sentetik oligonükleotid primerleri ve benzerleridir. Bu markerler iki temel analiz metodu olan RFLP ve RAPD-PCR teknikleri ve bunların kombinasyonlarıyla incelenebilir (Anonim 2007).

DNA parmak izi analizinde elektroforez sonucunda meydana gelen DNA bantları bireye özgü olmakta ve Mendel kalıtım yolunu izlemektedir. Bu metotlar günümüzde en çok adli tıpta, tıpta teşhis koyucu tanıda, ebeveyn belirlemede, bitki ve hayvan popülasyonlarında genetik çeşitlilik ve akrabalığın belirlenmesinde,

yabani formların araştırılmasında, evrim çalışmalarında ve gen haritalarının oluşturulması gibi çeşitli alanlarda sıkça kullanılmaktadır.

2.1. DNA Belirleyicileri (DNA Markerleri)

Genetik çeşitliliği tanımlamanın en sağlıklı yolu DNA düzeyinde yapılan tanımlamadır. Canlılardaki genetik polimorfizmi saptamak için çok sayıda DNA markerleri geliştirilmiştir. Çiftlik hayvanlarında da genetik yapının tanımlanması amacıyla son dönemlerde moleküler genetik tanımlama tekniklerinden yoğun bir şekilde faydalanılmaktadır. PCR ile DNA çoğaltımına dayalı olan DNA analiz tekniklerinin en önemlileri arasında RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), STS (Sequence Tagged Site; Dizisi Etiketlenmiş Alanlar), STR (Short Tandem Repeats; Basit Dizi Tekrarları), mikrosatellit analizi ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Tek Nükleotid Polimorfizmi) olarak sıralanabilir (Binbaş 2006).

Budak ve ark., (2004), yaygın olarak kullanılan moleküler marker tekniklerinin avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırmalı olarak özetlemiştir. (Çizelge 2.1)

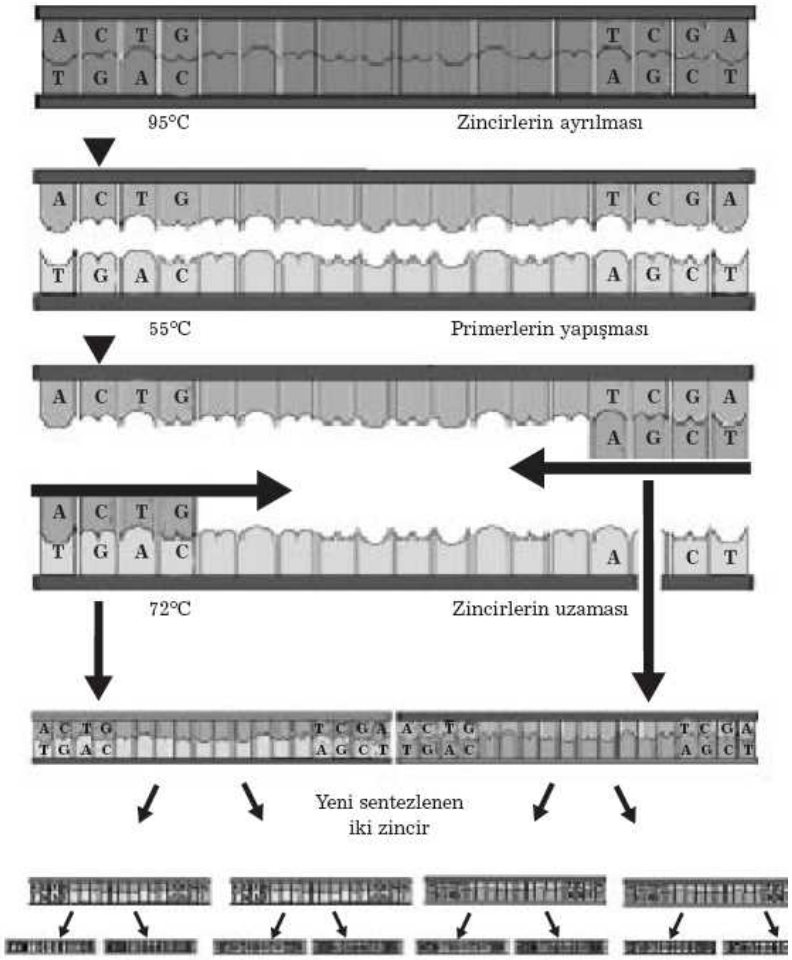
Çizelge 2.1. Yaygın Olarak Kullanılan DNA Marker Tekniklerinin Karşılaştırılması (Budak ve ark. 2004)

MARKER ADI	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	1. Yüksek genetik bilgi verir. 2. Ko-dominant marker 3. Yüksek tekrarlanabilirlik 4. Filtreler çok kez kullanılabilir 5. Genomu iyi ifade eder 6. Bütün türlerde uygulanabilir 7. DNA dizi bilgisi gerektirmez 8. Güvenli 9. Harita tabanlı klonlama için gerekli	1. Yüksek kalite ve miktarda DNA gerektirir 2. RAPD'de göre zor 3. Otomasyonu zor 4. Radyoaktif etiketleme gerektirir. 5. Probların klonlanması ve tanımlanması gerekir
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	1. Yüksek genetik bilgi verir 2. Genomu iyi ifade eder 3. DNA dizi bilgisi gerektirmez 4. Otomasyon için uygun 5. Az miktar ve orta kalitede DNA gerektirir. 6. Radyoaktif işaretleme gerektirmez 7. Göreceli olarak kolay	1. Dominant marker 2. Düşük tekrarlanabilirlik 3. Bütün türlerde uygulanamaz
Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	1. Yüksek genetik bilgi verir 2. Yüksek polimorfizm 3. DNA dizi bilgisi gerektirmez 4. Bütün türlerde uygulanabilir 5. Küçük RFLP parçacıkları ile çalışabilir 6. Kontig haritaları hazırlamaya uygun	1. Çok hassas olması, bant desenlerini etkileyebilir. 2. Kararlı haritalar oluşturmaz 3. İyi seçilmiş primerler gerektirir.
İzo Enzimler	1. Evrim çalışmaları için uygun 2. İzolasyonu, DNA izolasyonundan kolay 3. Bütün türlerde uygulanabilir 4. Radyoaktif işaretleme gerektirmez 5. DNA dizi bilgisi gerektirmez	1. Tekniğin uygulaması zor 2. Polimorfizm sınırlı 3. Dokunun lokasyonu bilinmeli 4. Otomasyonu kolay değil

2.1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu bir çeşit invitro klonlamadır. Her PCR işlemi, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Bir PCR döngüsü sırasıyla, deoksiribonükleikasidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (Denaturation), sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (Annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (Extension) aşamalarından meydana gelir. Bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir (sırasıyla 94°C - 98°C; 37°C-65°C; 72°C). PCR tekniği, tek ve çift sarmallı DNA ya da RNA için kullanılabilir (Anonim 2008).

PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür. Reaksiyon başlatılmadan önce istenen sayıda döngünün tekrarlanması sağlanabilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan altı ana madde vardır: DNA örneği, genelde genomik DNA; çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP); yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı ve $MgCl_2$'dir (Anonim 2008). Şekil 2.1'de Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) şematize olarak verilmiştir.



Şekil 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) şematik gösterimi (Birden 2006)

PCR yöntemi kolay uygulanabilir olması ve hızlı sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle, tıpta, moleküler biyoloji ve genetik alanında kullanılabilmektedir (Anonim 2008).

PCR'ın kullanıma geçmesiyle laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış, birçok durumda radyoaktivite kullanımı gereksiz hale gelmiştir (Anonim 2008).

2.1.1.1. RAPD

Polimeraz zincir reaksiyonu teknolojisinin geliştirilmesi (Saiki ve ark. 1988), moleküler tanımlamada kullanılabilecek birçok yeni tekniğin ortaya çıkışına sebep olmuştur. Bunlar içerisinde en fazla kullanılan teknik, RAPD ve bunun benzerleri olan tekniklerdir (Williams ve ark 1990). RAPD tekniği, çoğunlukla 10 veya 20 baz uzunluğuna sahip tek ve rasgele seçilmiş bir primerle, rasgele genomik DNA sıralarının binlerce kez kopyalanması esasına dayanmaktadır. Üretilen parçacıklar, DNA'nın karşılıklı eksenleri üzerindeki, kopyalanabilecek kadar birbirine yeterli uzaklıkta ve primerle uyumlu olan kısa genom bölgelerinden kaynaklanmaktadır. RAPD çalışması için fazladan hibridizasyona veya DNA sırasının bilinmesine ihtiyaç bulunmamaktadır. Bunun yanında RAPD tekniğinin, dezavantajı tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve dominant markerler vermesidir. Çizelge 2.2'de DNA marker tekniklerinin uygulama aşamaları görülmektedir.

Çizelge 2.2. DNA Marker Tekniklerinin Uygulama Aşamaları (Çalışkan 2005)

RFLP	**RAPD**	**AFLP**
Prob tanımlama ↓ Enzimle kesim ↓ Southern blotting ↓ Probla işaretleme ↓ Hibridizasyon ↓ Marker taraması	PCR çoğaltması ↓ Elektroforez ↓ Marker taraması	Çift enzimle kesim ↓ Adaptör bağlanması ↓ İki seçici primer ↓ PCR çoğaltması ↓ Uygun primerlerin tasarımı

Adından da anlaşılacağı gibi bu metot bilinmeyen DNA parçalarının PCR amplifikasyonu ile alakalıdır. Ayrıca AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) ve DAF (DNA Amplification Fingerprinting) gibi iki metot daha bulunmaktadır. Gerçekte bu üç metot çalışma prensibi olarak aynı ve birbirlerinin varyasyonlarıdır. Bu metotların üçünde de temel prensip PCR'ın tek primerle kullanımına dayanır. RAPD ve AP-PCR arasındaki temel fark PCR amplifikasyonunda kullanılan primerin nükleotit uzunluğudur. AP-PCR tekniğinde 15-25 bç'lik primer kullanılırken RAPD de 10-12 bç'lik primerler kullanılır. Ayrıca DAF tekniğinde ise 5-10 bç'lik primer kullanılır ve diğerlerine göre daha fazla DNA parçasının amplifikasyonu sağlanır. AP-PCR ayrıca PCR kondisyonu bakımından da diğerlerinden farklılık gösterir (Çiftçi 2003) .

Kullanılan bu teknikler basit ve ucuz oldukları için çok tercih edilmektedirler ve çoğunlukla taksonominin belirlenmesinde, gen akışının analizinde, hibrit çalışmalarında ve karışık genom örneklerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Çiftçi 2003).

RFLP ve RAPD-PCR yöntemlerinin kullanıldığı alanlar (Anonim 2005):

- Genom haritaları
- Bireysel genotipin tanımlanması
- DNA polimorfizminin saptanması
- Kantitatif özellik lokuslarının saptanması
- Ebeveyn ve akrabaların tespiti
- Hastalık ve genetik hastalıkların teşhisi
- Adli tıp

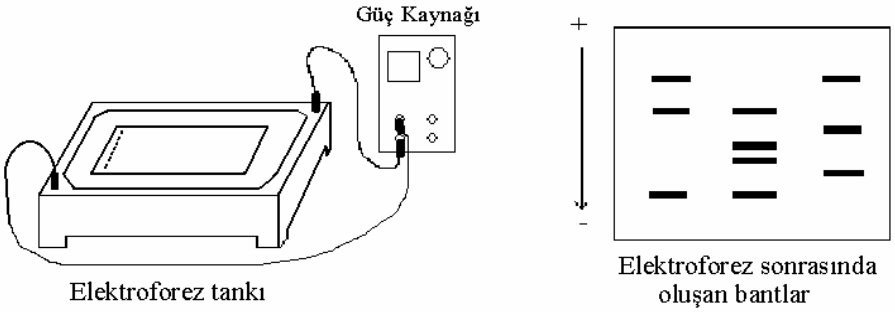
Kısa primerlerin ve düşük annealing sıcaklıklarının kullanımı genom içine tesadüfi dağılmış çeşitli kısımların fazla miktarda amplifikasyonunu sağlar. Fertler arasındaki nukleotit dizilimi farkından oluşan polimorfizm RAPD bantlarının olup olmayışlarına göre belirlenir. RAPD dominant genetik marker olarak kabul edilir ve

gen haritası çıkarılması çalışmalarında bu hesaba katılır. Bu üç teknik için asıl sorun, oluşan bant yapısının kullanılan DNA'nın kalitesine, PCR sıcaklık profiline ve reaksiyon koşuluna bağlı olarak hassasiyet göstermesidir. Hatta bazı araştırmacılara göre RAPD parmak izi modelinin, kullanılan polymerase enziminin tipine göre de farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Çiftçi 2003).

RAPD yöntemi, tek, kısa ve rasgele oligonükleotid primerler kullanarak DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem duyarlı, hızlı ve çok sayıdaki örneğe uygulanabilen bir tekniktir. Bu primerler genetik işaretleyici olarak ve özgün nükleotid dizi bilgilerine gerek duymadan polimorfizmi belirlemede kullanılabilir (Wough ve Powell 1992). RAPD yönteminin RFLP ve izozimlere göre birçok avantajları vardır. Bu yöntem yoğun laboratuar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmez. Herhangi bir genomik kütüphane oluşturulmasına gerek duymaz. RFLP analizlerinde olduğundan çok daha az miktarda genomik DNA' ya ihtiyaç duyulur. RAPD yöntemi izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda işaretleyici elde edilmesini sağlar. Ayrıca türler arası ve tür içinde, RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm belirlenebilmektedir (Whitkus ve ark. 1994). DNA' ya dayalı işaretleyicilerin gelişmesiyle fitoremediasyon sürecinde de büyük aşamalar kaydedilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde metali tolere edebilen fenotiple ilgili DNA bölgesi tespit edilebilmekte ve kirliliği gidermede kullanılabilecek türler geliştirilebilmektedir (Clemens ve ark. 2002).

RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde, nükleotid sırasında belirli bir ölçü olmadan rasgele hazırlanan primerlerin (yaklaşık 10 bç), düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfî olarak, komplementeri olan hedef bölgelere yapışması ve bu bölgelerin PCR tekniği ile geometrik olarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Bardakçı 2001). PCR tekniğiyle çoğaltılmış bu DNA parçacıkları elektroforez tekniğiyle agaroz jelde birbirinden ayrılırlar. (Şekil 2.2.) Elektriksel ortamda molekül büyüklüklerine göre sıralanan DNA parçacıkları daha sonra ethidyum bromür ya da radyoaktif maddelerle boyanarak ultraviole ışık

altında görünür hale getirilir (Williams ve ark. 1990, Scott ve ark. 1992, Morgan ve ark. 1993, Rothuizen ve Wolferen 1994)



Şekil 2.2. PCR Ürünlerinin Jelde Yürütülmesi ve Bantların Elde Edilmesi

RAPD-PCR yöntemiyle elde edilen ve agaroz jelde elektrik akımı altında tespit edilen bantlara RAPD bantları adı verilmektedir. RAPD metodunda heterozigot genotipler belirlenemediği için bantların varlığı ya da yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir. RAPD tekniği ile DNA üzerinde bazı parçalarını (fragment) çoğaltılması, kullanılan primerlerin uzunluğuna, primerin G-C içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotidin bulunduğu yere göre değişiklik gösterir (Şahin 2005).

Genel olarak RAPD tekniği diğer tekniklerle (RFLP, AFLP ve Mikrosatellitler) karşılaştırıldığında en büyük avantajı; az miktarda ve düşük kalitede DNA'nın yeterli olması ve DNA baz sırasına ilişkin ön bilgiye gereksinim duyulmamasıdır (Williams ve ark. 1990). Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilmekte ve bu oligonükleotidler özgün bölgelere rasgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadırlar. RAPD tekniğinin, diğer yöntemlere göre basit, daha ucuz ve daha az iş gücü gerektirmesi de bu yöntemi avantajlı hale getirmektedir. RAPD ile RFLP yöntemleri aynı oranda güvenli ve etkili iken, RAPD yönteminin uygulamasının daha hızlı ve kolay olduğu, ırklar ya da hatlar arasındaki ilişkilerin aranmasına yönelik çalışmalarda RAPD'in tercih edildiği görülmüştür (Hallden ve ark. 1994). Bununla birlikte, her iki yöntemin toplam maliyeti, kullanılan belirleyicilerin artması ve azalması ile orantılı olarak değişmektedir (Williams ve ark. 1990).

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır (Bowditch ve ark. 1991). Hedef DNA, $MgCl_2$ konsantrasyonu, Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denatürasyonu, primer karışımları RAPD tekniğini etkileyen temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR'da oluşan çelişkili sonuçlar için, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir. RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir.

RAPD tekniğinin en yaygın uygulamalarından birisini, genomda haritalamaya gerek duyulmadan, istenilen bir özellikle (morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal) ilişkili markerlerin tanımlanması oluşturmaktadır. Martin ve ark (1991) domateslerde Pseudomonas'a direçlilik geni için yaptıkları çalışmada, bir özellikle ilişkili olan DNA kısımlarının izolasyonunda kullanılmak üzere RAPD tekniğine dayalı etkili bir metot tanımlamışlardır. Bu metot, istenilen bir özelliği kodlayan genleri taşıyan bir hatla (donör ebeveyn), bu genleri taşımayan aynı hattın kültür formunun (yinelenen ebeveyn), defalarca geriye melezleme yapılarak oluşturulmuş yakın izogenik hatların (Near Isogenic Lines; NILs) analizlerine dayanmaktadır. Analizlerde, donör ebeveyne ait genomun bir parçası, kültür formundan farklı olarak, hedef gene ait bir marker parçacık üretmektedir. Yüksek olasılıkla, bu iki hat arasında polimorfizm gösteren bu genetik markerler, aranılan özelliği kodlayan gen bölgesini taşımaktadır.

RAPD tekniği moleküler biyoloji ve diğer bir çok alanda kullanılmak üzere, çiftlik hayvanlarında genetik benzerliğin ve farklılığın tanımlanması, farklı ırk ve ekotipler arasındaki genetik ilişkilerin tahmin edilmesi, yabani türlerin tespit edilmesinde (Lee ve Chang 1994, Koh ve ark. 1998, Stepniak ve ark. 2002), genetik haritalama (Cushwa ve ark. 1996), pedigri tayini (Cerit 2003), embriyoda cinsiyet tayini (Gutiérrea-Adán ve ark. 1997) ve türe özgü marker geliştirme gibi birçok alanda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Gutiérrea-Adán ve ark. (1997), koyunlarda ve keçilerde RAPD-SCAR (Sequence Characterized Amplified Region; Sekansa Özgü Çoğaltılmış Bölge) markeri kullanarak embriyoda cinsiyet tayini yapmışlardır. Çalışmada koyunlarda süper ovulasyon uygulayarak embriyoyu implantasyon öncesinde elde etmişlerdir. Embriyolardan izole ettikleri DNA ile yaptıkları RAPD-PCR deneyinde sadece koyun türüne ve Y kromozomuna özgü olan Ucd043 primerleri ile başarılı bir şekilde cinsiyet tayini yapmışlar ve diğer cinsiyet tayini metotlarına nazaran daha kesin, hassas, ucuz ve kısa sürede bittiğini bildirmişlerdir. Kullanılan primer sadece koyun türüne özgü olduğundan keçi türünde herhangi bir ayrım gözlemlenmemiştir.

Yongjun ve ark. (1998), Tibet Kaşmir keçilerinin, populasyon içi genetik varyasyonunu ve DNA polimorfizmini 28 bireye ait örnekte araştırmışlardır. Çalışmalarında DNA fragmentleri, 37 primerden seçilmiş yüksek polimorfizme sahip 5 primer kombinasyonu ile çoğaltılmıştır. Sonuçta, 61 lokus ve 2926 bant elde edilmiştir. Bu lokusların % 90'ının, bantların ise % 83'ünün polimorfik olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada populasyon içi ortalama benzerlik 0.6734, populasyondaki ortalama genetik uzaklık ise 0.3266 olarak bulmuşlardır.

Li ve ark (2002) üç Shanxi bölgesi yerli keçi populasyonları (Bai, Hei ve Qing) arasındaki genetik ilişkiyi RAPD yöntemi ile belirledikleri çalışmada, 102 bireye ait kan örneklerinden elde ettikleri DNA fragmentlerini, 60 primer ile çoğaltmışlardır. Elde edilen DNA fragmentleri 180 ve 2870 bç aralığında bantlar vermiştir. Kullanılan 8 primer ile toplam 76 fragment elde edilmiş ve bunlardan 44 fragment bu keçi populasyonları için polimorfik bantlar meydana getirmiştir. Polimorfizm oranını 0,5789 olarak, populasyonlar arası genetik uzaklığı ise 0.0810-0.2040 değerleri arasında bulduklarını bildirmişlerdir.

Stepniak ve ark. (2002) tarafından köpekgiller familyasına ait kutup tilkisi (Alopex lagopus), kırmızı tilki (Vulpes vulpes), Çin rakun köpeği (Nyctereutes procyonoides procyonoides) ve evcil köpek türünde evrim ilişkilerini tespit etmek amacıyla 29 adet primer ile RAPD tekniğini çalışmalarında kullanmıştır. Bu

primerlerden türleri birbirinden ayıran 10 adet primer seçerek yürüttükleri çalışma sonucunda kutup tilkisi ile kırmızı tilkinin diğer türlere nazaran genetik yakınlığı en yüksek olan türler olduğunu, Çin rakun köpeğinin ise diğer türlerden genetik bakımdan en uzak tür olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla RAPD tekniğinin türlerin taksonomik sınıflandırmasında başarılı bir şekilde kullanılabilecek bir araç olduğunu ifade etmişlerdir.

Paiva ve ark. (2005) beş Brezilya kıl koyun ırkında (Santa Ines, Rabo Largo, Somali, Morada Nova ve Bergamasca) toplam 140 RAPD primeri denemişler ve polimorfik bant veren 19 adet RAPD primerini çalışmada kullanmışlardır. Kıl koyunları arasında genetik farklılığı 0.0512–0.1492 değerleri arasında, ortalama ırklar arasında genetik varyansı ise 0.1492 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada beş kıl koyun populasyonu içindeki heterozigotluk ve polimorfizm oranlarını da hesaplamışlardır. Snata Inés, Rabo Largo, Somali, Morada Nova ve Bergamasca kıl koyun ırklarında heterozigotluğu ve polimorfizm oranını yüzde olarak sırasıyla 0.3881, 0.3857, 0.4050, 0.3929, 0.3229 ve 100, 98.15, 98.15, 94.44, 90.74 olarak tespit etmişlerdir.

Lee ve Chang (1994) tarafından yapılan çalışmada ise RAPD metodu farklı türlerin tanımlanması amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada, sadece tek bir primer ve bir PCR programı kullanılmıştır. Sonuç olarak, RAPD-PCR tekniğinin insan, sığır, keçi, domuz, köpek, sıçan, tavşan, tavuk ve ördeğe ait parmak izleri karşılaştırılarak, bu türleri tanımlamada kullanılabileceğini göstermişlerdir.

RAPD tekniği ayrıca İlhak ve Arslan (2003) tarafından, et ve et ürünlerinin orijininin tespit edilmesi amacıyla, sığır, koyun, keçi ve yabani domuz etinin ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Kullanılan diğer yöntemlerdeki (anatomik farklılıklar, duyusal analizler, proteine dayalı testler vs.) zorluklar ve bazı dezavantajlar nedeniyle, doğru sonuç veren, basit ve hızlı, özellikle DNA'nın in vitro olarak kısa sürede çoğaltılmasını sağlayan PCR temeline dayanan RAPD yöntemi kullanmışlardır. RAPD yöntemiyle, 10 bazlık bir primer (CGC CCT GGT C)

kullanılarak, et ve et ürünlerinin hangi hayvan türüne ait olduğunun belirlenmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Şahin (2005), RAPD yöntemi ile Antalya yöresi kıl keçilerinde genetik polimorfizmi tespit etmek amacıyla toplam 20 primer kullanarak 152 bant elde etmiş ve bunlardan 142'sinin (%92.8) polimorfik olduğunu bildirmiştir. Kıl keçi populasyonu içinde genetik benzerliği 0.6464, genetik uzaklığı ise 0.3536 olarak tespit ederken, ortalama heterozigotluğu 0.3691 olarak tahmin etmiştir.

Li ve ark. (2006), Çin'in Sichuan bölgesinde 9 farklı populasyondaki toplamda 540 baş siyah keçi üzerinde RAPD yöntemi ile yaptıkları çalışmada, 100 adet RAPD primeri kullanmışlar ve 16 adedini polimorfik olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada keçi populasyonları arasındaki genetik uzaklığı 0.1051 ile 0.2978 arasında tespit etmişlerdir. Jintang ile Lezhi keçileri arasında en yüksek genetik benzerliği (0.9002), en düşük genetik benzerlik değerini ise (0.7424) Jiangan ile Huili keçileri arasında tespit etmişlerdir. Genetik benzerlik değerleri ile oluşturulan UPGMA dendogram analizi sonucu Huili ve Baiyu keçi populasyonlarının bir grupta diğer keçi populasyonlarının ise diğer bir grupta toplandığını dolayısıyla bu iki keçi populasyonunun diğer keçi populasyonlarından daha farklı olduğunu ifade etmişlerdir.

RAPD gibi DNA düzeyinde genetik varyasyonu saptamaya yönelik tekniklerin geliştirilmesi, bireylerin genotiplerini daha doğru saptamaya olanak sağlamaktadır. Bu anlamda, DNA düzeyinde tespit edilebilecek varyasyonlar ıslah çalışmalarında önemli kazanımlar sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Gen kaynaklarının muhafazası ve korunması kapsamında TİGEM Eskişehir Anadolu Tarım İşletmesi'nde yetiştirilmekte olan Ankara Keçisi populasyonundan 50 baş keçiden alınan kan örnekleri çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.1. Araç ve Gereçler

Bu araştırmanın yürütülmesinde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Labaratuvarında mevcut bulunan ve Çizelge 3.1'de detayları açıklanan araç ve gereçler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Araç ve Gereç Listesi

Adı /Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Bidestile Saf Su Cihazı/Buchi Fantavapor 285, Ultra Saf Su Cihazı/Sg Ultra Clear Basic	DNA İzolasyonu ve PCR Reaksiyonları İçin Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması
pH metre /Orion 420	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması İçin Gerekli Ph'nın Belirlenmesi
Otoklav /Hyrama	Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu
Nano Drop Spectrofotometre /ND 1000	İzole Edilen DNA Örneklerinin Konsantrasyonları ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi
Çalkalayıcı Sıcak Su Banyosu/Kotterman	DNA İzolasyonu
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı/Janke&Kungel KG	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması
Çalkalayıcı (Vortex)/Julabo Paramix3	Tampon Çözeltilerin Hazırlanması ve DNA İzolasyonu
Santrifüj/NÜVE NF 1215 5000 rpm, Mikro Santrifüj/SİGMA 1-15,14.000 rpm Mikro Santrifüj/HERMLE Z 231 M,15.000 rpm	DNA İzolasyonu ve PCR Aşamalarında Örneklerin Kısa Süreli Santrifüj Edilerek Çöktürülmesi
Soğutmalı Santrifüj/Thermo lec Multi Rf 8467 0260,16.800 rpm ,30.000 g	DNA İzolasyonu Sırasında Örneklerin Bozulmadan Santrifüj Edilmesi
Manuel Hassas Terazi /Sartorius,200 G Dijital Hassas Terazi/ Sartorius,,R 200 D,1000 G	Tampon Çözeltilerin Hazırlanmasında Sarf Malzemelerin Tartılması
Gradient Thermal Cycler 96 Örneklik/Biorad Thermal Cycler 25 Örneklik /Techne TC 312	RAPD-PCR Lokusların Çoğaltılması
Agaroz Jel Elekroforez Takımları /Thermo	DNA İzolasyonu ve PCR Ürünlerinin Tespiti
Güç Kaynakları /HSI 2500 DC,Bimetra P25,BioRad Model 200/2.0	Elektroforez Sistemlerinin Elektrik Ortamlarının Sağlanması
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi/Kodak Gel Logic 200	DNA İzolasyonu, PCR Ürünleri RAPD-PCR Lokusların Ön Denemelerinin Jelde Görüntülenmesi ve Bilgisayar Ortamına Aktarılması
Termal Yazıcı /Sony Dijital Graphic printer Up –D895	DNA İzolasyonu, PCR Ürünleri ile RAPD-PCR Lokusların Arşivlenmesi İçin Baskı Yapılması
Mikro Dalga Fırını (ARÇELİK MD 500)	Agaroz Jellerin Hazırlanması
UV Transilluminatör/Vilber Lourmat UV Lambası ve Gözlükleri /mineralight Lamp UV-254/366 Nm	DNA İzolasyonu, PCR Ürünleri İle RAPD-PCR Lokusların Ön Denemelerinin Agaroz Jel Elektroforez Yapılırken Aynı Anda Fragment Ayrımlarının Kontrollerinin de Yapılması
Derin Dondurucu /Rua Instruments,-80 ºC Derin Dondurucu Buzdolabı/Arçelik,25,+4	Örnek ve Çeşitli Saf Malzemelerin Saklanması
Steril DNA İzolasyon Kabini/Metisafe Class ll	DNA İzolasyonu ve PCR İşlemlerinin Steril Ortamda Yapılması
Çeker Ocak /Metisafe Class ll	Çeşitli Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.2. Tampon çözeltiler

DNA moleküllerinin izolasyonu PCR optimizasyonlarının yapılması, restriksiyon enzimi ile muamele edilmesi, agaroz jellerin hazırlanması ve elektroforez işlemlerinin yapılmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Tampon Çözeltilerin Molaritesi / Miktarı ve İçerikleri

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
Eritrosit Lisis	0,32 M 10 mM 5 mM	Sukroz EDTA $MgCl_2$
Fizyolojik	75 mM 25 mM	NaCl EDTA
Lisis TE	500 mM 20 mM 10 mM	Tris-HCI EDTA NaCI
TE (Tris-EDTA)	10 mM 1 mM	Tris EDTA
6M NaCl	5.64 g 10 ml'ye tamamlanır	NaCI Deiyonize bd H_2O
DNA Yükleme	5.0 ml 2.0 ml 1.5 ml 1.5 ml	Gliserol Bromfenol EDTA Deiyonize bdH_2O
10XTBE Elektroforez/Jel	108.0 g 55.0 g 40.0 ml 1 litreye tamamlanır	Tris Borik asit 0.5 M EDTA (pH 8,0) Deiyonize bdH_2O
1XTBE Elektroforez/Jel	200 ml 2 litreye tamamlanır	10 X TBE Deiyonize bdH_2O

3.2. Metot

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

DNA izolasyonu için gerekli kan örnekleri keçilerin boyun toplardamarından (vena jugularis), vakumlu kan alma tüpleri ve kanül kullanılarak alınmıştır. Her hayvandan yaklaşık 5 ml kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri kısa sürede Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genetik laboratuvarına getirilerek DNA izolasyon işlemine kadar -20 ºC'de saklanmıştır.

3.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA molekülünün izolasyonunda Miller ve ark. (1988) tarafından bildirilen DNA izolasyon protokolü labaratuvar ortamında optimize edilmiş ve aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. -20 ºC'de muhafaza edilen kan örnekleri çözülene kadar oda sıcaklığında (24- 25 ºC) bekletilmiştir.
2. Her bir kan örneğinden 500 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüp içine konulmuştur.
3. Örneklerin üzerine 1.000 µl Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi ilave edilmiş ve kısa bir süre vorteksle iyice karıştırarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Bekletme süresinin sonunda örnekler 5000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Ependorf tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım (süpernatant) dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan peletlerin (hücre kısmı) rengi gözlenerek, peletlerin rengi beyaz olana kadar Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi ile tekrar (en fazla 3 defa) muamele edilmiştir.
6. Peletlerin üzerine 1.000 µl Fizyolojik Tampon Çözeltisi eklenmiş ve kısa bir süre karıştırılmıştır.
7. Örnekler 5000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.

8. Peletlerin üzerine 300 µl Lisis TE Tampon Çözeltisi eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.

9. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl SDS (%10 luk) solusyonu ve 5 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 65 ºC'de 1.5 saat su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılmıştır.

10. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 250 µl 6M NaCl Çözeltisi eklenmiş ve 15 dk vorteksle iyice karıştırılmıştır.

11. Örnekler 12.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.

12. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine koyulmuştur.

13. Örnekler 12.000 rpm de 10 dk tekrar santrifüj edilmiş ve yine üstte kalan sıvı kısım, tuz kısmına dokunmadan yeni bir ependorf tüp içine alınmıştır.

14. Örnekler üzerine örnek hacminin iki katı hacimde %99.9'luk soğuk etanol ilave edilmiştir.

15. Soğuk etanol ilave edildikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 4–5 kez hafifçe karıştırılmıştır.

16. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 10.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.

17. Santrifüj sonunda etil alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletlerinin üzerine 1.000 µl %70'lik etil alkol ilave edilerek 10.000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir.

18. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde yer alan alkol uzaklaştırılmıştır.

19. Tüp içindeki alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler, çeker ocak içinde kurumaya bırakılmıştır.

20. Tamamen kuruyan örnekler üzerine 100 µl TE Tampon Çözeltisi (Çizelge 3.2) ilave edilmiş olup, DNA peletlerinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 ºC'de bekletilmiştir.

21. Genomik DNA izolasyonunun miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop Spektrofotometre (ND 1000) 'den yararlanılmış ve elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması

Polimeraz Zincir Reaksiyonuna başlamadan önce izolasyonu yapılan DNA'ların miktarlarının spektrofotometre ile ölçülmeleri önemlidir. Genomik DNA miktarının spektrofotometre ile ölçülmesi, DNA solusyonunun 260/280 nm'deki okuma değerine göre OD miktarının hesaplanmasına dayanmaktadır. Sambrook ve ark. (1989)'nın bildirdiğine göre; DNA ve RNA örneklerinin saflık dereceleri spektrofotometredeki 260nm ve 280 nm değerlerinin oranlanması ile (OD_{260}/OD_{280}) belirlenmektedir. 260 nm dalga boyunda yapılan okuma, örnekteki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanmasını sağlamaktadır. Örnekte okunan 1 OD absorbans değeri yaklaşık olarak 50µg/ml çift sarmallı DNA ve 40 µg/ml RNA'nın varlığına işaret etmektedir. Spektrofotometre küvetinde bulunan sıvının 260 ve 280nm dalga boylarında ölçülen absorbans değerleri birbirine oranlandığında bulunacak OD_{260}/OD_{280} (DNA/protein) oranının 1.8–2.00 değerleri arasında olması arzulanır. Bu oranın 1.8'den düşük olması ortamda protein ya da fenol artıklarının varlığına işaret etmektedir (Aytekin 2006). Dolayısıyla bu maddelerin ortamda mevcudiyeti PCR uygulamasının verimini düşürmektedir.

Çalışmada 100 µl steril TE (10:1) tampon çözeltisinde çözülen DNA'ların konsantrasyonları 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD_{260}/OD_{280}) spektrofotometre ile okunmuş ve konsantrasyonları steril saf su ile 50 ng/µl olacak şekilde eşitlenmiştir.

3.2.4. Kullanılan primerlerin seçimi

RAPD tekniğinde bazıları daha önce değişik çalışmalarda kullanılmış olan 10 bazlık primerler denenmiş ve ele alınan primerlerin monomorfik/polimorfik olmaları ile yeterli sayıda bant üretmelerine bağlı olarak en iyi sonuç veren 8 adet primer seçilerek RAPD analizleri için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ve primerler ile ilgili bazı bilgiler çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan RAPD Primerleri ve Bazı Özellikleri

No	Primerin İsmi	Primer Uzunluğu	Baz Sırası (5'□ 3')	Bağlanma Sıcaklığı (ºC)
1	Ra35	10	AAG CTC CCC G	34
2	Ra59	10	CGG GCA ACG T	34
3	Opp08	10	ACA TCG CCC A	32
4	Opp11	10	AAC GCG TCG G	34
5	Opp15	10	GGA AGC CAA C	32
6	Opq06	10	GAG CGC CTT G	34
7	Op08	10	TGG ACC GGT G	34
8	Opm10	10	TCT GGC GCA C	34

Primerlerin bağlanması aşamasındaki Tm değerinin hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

Bağlanma Sıcaklığı Tm (ºC) = [(A+T'lerin sayısı) x 2 ºC + (G+C'lerin sayısı)x4 ºC]

Genel olarak çalışmada kullanılan primerler 10 baz çifti uzunluğunda ve bağlanma sıcaklıkları (Tm) 32-34 ºC değerleri arasında olup, her bir primer için Guanin(G) + Sitozin(C) toplamının toplam baz sayısına oranları %60-70 değerlerindedir.

3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR uygulaması Şahin'in (2005) bildirdiği yöntem kullanılarak yürütülmüştür. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Miktarları

1X'lik PCR Reaksiyon Karışımı	**Miktar (µl)**
Steril Destile Su	5.6 µl
10x PCR Tamponu	1.2 µl
25 mM $MgCl_2$	1.5 µl
dNTPs (2 mM her birinden)	2.4 µl
Primer	3 µl
Taq Polimeraz (Taq Fermantas 5U/ml)	0.3 µl

Reaksiyonlar toplam 1 µl DNA + 14 µl PCR karışımı (mix) olacak şekilde 15 µl hacimde 0.2'lik PCR tüplerinde yapılmıştır. PCR uygulamaları Biorad Thermal Cycler marka cihazda yürütülmüştür. Cihazın kapak sıcaklığı 105 ºC olacak şekilde PCR programı ayarlanmıştır. Bu uygulamanın amacı PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemektir.

Amplifikasyonlarda kullanılan reaksiyon koşulları ise; 2 dakika 94 ºC'de ön ısıtmadan sonra 3 aşamada gerçekleşen PCR programında reaksiyonlar, ayrılma (denatürasyon) aşamasında sıcaklık 94' ºC de 1 dk, bağlanma/yapışma (annealing) aşamasında 35 ºC'de 2dk ve uzama/sentez aşamasında ise 72 ºC'de 3dk'dan meydana gelen toplam 45 döngü uygulanmış ve son olarak tüpler 72 ºC'de 7dk bekletilerek çalışmalara başlanmış ve kullanılan primerlere bağlı olarak sıcaklık ve zaman dilimlerinde bazı optimizasyonlara gidilmiştir. Çizelge 3.5'de uygulanan PCR programı verilmiştir. Şekil 3.1'de ise Biorad Thermal Cycler 96 örneklik PCR cihazı görülmektedir.

Çizelge 3.5. PCR Programı (Şahin 2005)

94 ºC →2dk	45 DÖNGÜ	Ön Denaturasyon (DNA Eksenlerinin Birbirinden Ayrılması)
94 ºC → 1dk		Denaturasyon (DNA Eksenlerinin Birbirinden Ayrılması)
35 ºC → 2dk		Annealing (Primerin Komplimenter Kalıp DNA Ekseni Bölgesine Bağlanması)
72 ºC → 3dk		Extension (Üzerinde Durulan DNA Bölgesinin Sentezinin Yapılması)
72 ºC → 7dk		Son Extension (Üzerinde Durulan DNA Bölgesinin Sentezinin Son Kez Yapılması)



Şekil 3.1. Biorad Thermal Cycler 96 Örneklik PCR Cihazı

3.2.6. Elekroforez çözeltisi

Örneklerin elektroforez işlemi için elektroforez çözeltisi olarak Çizelge 3.2' de içeriği verilen 1 X Elektroforez /Jel Tampon Çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforez çözeltisi önce 10 X Elektroforez /Jel Stok Tampon Çözeltisi olarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Hazırlanan bu stok solüsyonu deiyonize su ile 10 katı kadar sulandırılarak (1XTBE Elektroforez /Jel Tampon Çözeltisi) hem jelin hazırlanmasında hem de elektroforez tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Jelin hazırlanması için 100 ml, tanka konulacak elekrolit çözeltisi olarak da 1000 ml 1X TBE Elektroforez / Jel Tampon Çözeltisi kullanılmıştır.

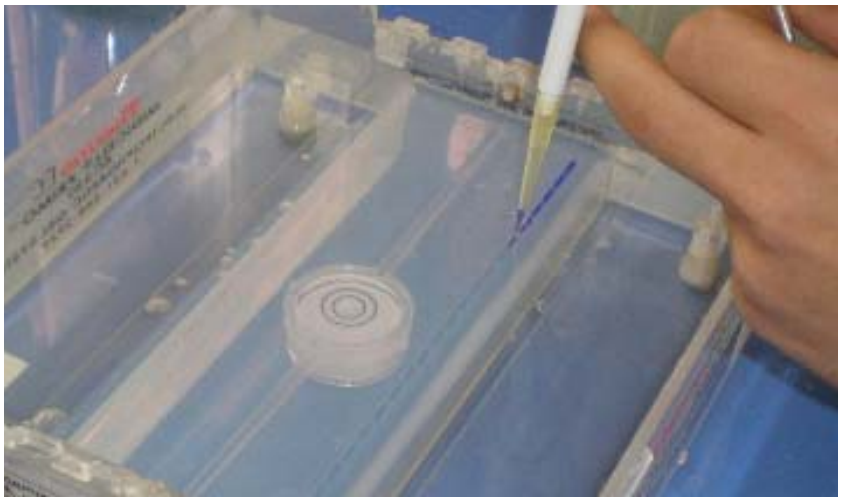
3.2.7. Jelin hazırlanması ve dökülmesi

PCR işlemlerinin tamamlanmasından sonra, RAPD yöntemi ile çoğaltılan DNA örneklerinin elektroforetik ayrımı için agaroz jel (Prona Agarose Basica LE) kullanılmıştır. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelinde yürütülmüştür.

Jel hazırlanırken agaroz, erlen mayerde TBE tampon çözeltisi içinde yüksek sıcaklıkta 250–300 ºC'de bir mikrodalga fırın içinde 2–3 dk kaynatılarak eritilmiştir. Kaynama esnasında yaklaşık 10–20 s'de bir çözelti sallamak suretiyle şeffaf bir görünüm kazanıncaya kadar karıştırılmıştır. Jel kaynatıldıktan sonra üzerine 5 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg etidyum bromür/ml deiyonize su) ilave edilmiştir. Hazırlanan jel 8 x 20 x 0.8 cm ebatlarında olan ve üzerinde 22 kuyucuklu tarak bulunan jel tablasına, tarakların bulunduğu bölgelerde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek dökülerek oda sıcaklığında soğuması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Hazırlanan jel 1 x TBE Elektroforez /Jel Tampon Çözeltisi ile dolu olan yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jel tanka yerleştirildikten sonra üzerini tamamen kaplayacak şekilde kadar 1 x TBE Elektroforez / Jel Tampon Çözeltisi ilave edilmiştir.

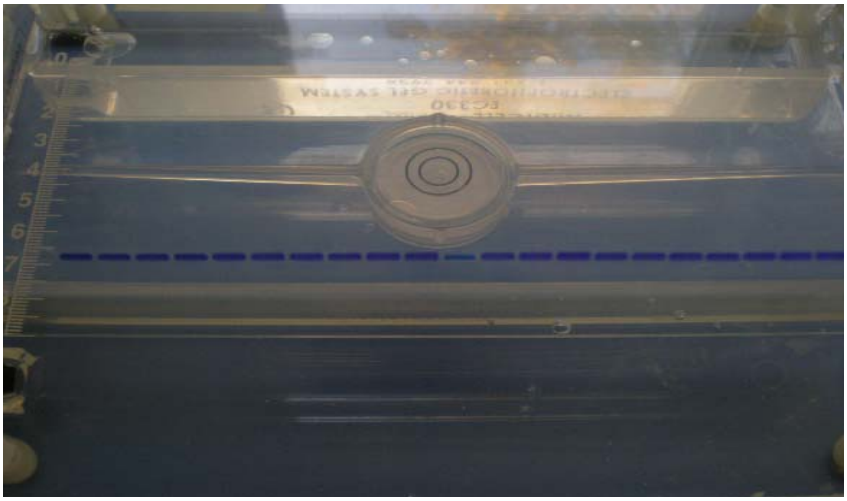
3.2.8. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi

PCR cihazı ile çoğaltılan DNA örneklerinin jelde yürütülebilmesi, takibi ve elektroforez çözeltisi ile karışmasının önlenmesi amacıyla yükleme çözeltisi hazırlanmıştır. PCR ürünlerinden 15 µl alınarak 0.2 µl 'lik PCR tüplerine konulmuş ve üzerine 5 µl DNA Yükleme Tampon Çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin jele yüklenmesinden önce PCR ürünlerinin tüplerin kenarlarına yapışmış olma ihtimalini azaltmak için bu karışım 3-5 s mikrosantrifüjde 3.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu karışım kuyulara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Şekil 3.2'deki resimde PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi görülmektedir.



Şekil 3.2. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi

RAPD bantlarının jelde molekül büyüklüklerine göre yürüdükleri bant aralığını (baz çifti) tespit edebilmek için standart olarak DNA Marker (50 bp ve 100 bp Ladder, Fermantas® GeneRuler SMO241) standart DNA markeri (DNA Ladder) kullanılmıştır. Şekil 3.3'deki resimde PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi bittikten sonraki durum görülmektedir.



Şekil 3.3. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmiş hali

3.2.9. Jele yüklenen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi

Jel kuyucuklarına yüklenen PCR ürünleri elektrik akımı olan ortamda birbirlerinden ayırmak için yatay elektroforez cihazında 90 V'da 2.5 - 3 saat süreyle kontrol edilerek yürütülmüştür. Kontrolün sebebi jelin bitiş noktasına kadar PCR ürünlerinin yürümesini engellemektir. Şekil 3.4'de yatay elektroforez cihazı görülmektedir.



Şekil 3.4. Yatay Elektroforez Cihazı

3.2.10. RAPD Bantlarının Görüntülenmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için jel elektroforezden çıkarılmıştır. Elektoforez işleminden sonra jellerin Jel Görüntüleme Analiz Sisteminde (Kodak Gel Logic 200) fotoğrafları çekilerek elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Şekil 3.5'deki resimde jel dokümantasyon sistemi verilmiştir.



Şekil 3.5. Jel Görüntüleme Analiz Sistemi

3.2.11. RAPD bantlarının değerlendirilmesi ve genetik analizler

RAPD bantlarına ilişkin fotoğraflar jel görüntüleme analiz sisteminde elde edildikten sonra jel resimlerininin yüksek çözünürlükte baskı veren özel yazıcıdan çıktıları alınmış ve değerlendirmeler bu çıktılar üzerinden skorlama yapılarak gerçekleştirilmiştir. RAPD bantlarının değerlendirilmesinde dominant bantlar var/yok esasına göre (1= var; 0= yok olacak şekilde) skorlama yapılmış ve veri matriksi oluşturulmuştur. Şekil 3.6'da değerlendirmenin yapılışına bir örnek verilmiştir. 1 nolu lokus 110; 2 nolu lokus 111; 3 nolu lokus 101 şeklindedir.

LOKUS NO	MARKER	A	B	C
1	--	--	--	
2	--	--	--	--
3	--	--		--
Toplam Bant Sayısı		**3**	**2**	**2**

Şekil 3.6. Üç Bireye ait RAPD Bantları

RAPD-PCR bantları çekilen jel fotoğrafları incelenerek değerlendirilmiş ve mevcut bantlar 1, olmayan bantlar ise 0 olacak şekilde bir veri matrisi oluşturulmuştur. Elde edilen veri matrisi kullanılarak benzerlik oranı, polimorfizm oranı ve heterozigotluk oranları gibi istatistikler bilgisyarda POPGEN programı ile hesaplanmıştır.

Bireyler arasındaki genetik benzerlik (Fxy) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Nei 1987);

$$\mathbf{Fxy = 2\ Mxy\ /\ (Mx + My)}$$

Formüldeki; Fxy : Genetik benzerlik
Mxy: İki birey arasında ortak RAPD bant sayısı,
Mx : Birinci bireyin toplam RAPD bant sayısı,
My : İkinci bireyin toplam RAPD bant sayısını göstermektedir.

Ortalama heterozigotluğun (H) hesaplanmasında aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Nei 1987);

$$\mathbf{H=\Sigma h/r}$$

Formüldeki; r: Lokus sayısı,

h: Beklenen tek lokus heterozigotluğu olup aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$\mathbf{h=1-\Sigma X_i^2}$$

Burada ; X_i^2 : homozigot genotiplerin oranlarıdır.

Polimorfizm oranı ise gözlemlenen polimorfik bant sayısını toplam bant sayısına oranlayarak hesaplanmıştır.

Polimorfizm oranı = Polimorfik bant sayısı / Toplam bant sayısı

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. RAPD-PCR Bantlarının Analizi

Araştırmada değerlendirilen RAPD-PCR bant modelleri, TİGEM Eskişehir Anadolu Tarım İşletmesi'nde gen kaynaklarının muhafazası ve korunması kapsamında yetiştirilmekte olan, Ankara Keçisi populasyonundan rastgele alınan 50 hayvana aittir. Bu bantlar 8 primer kullanılarak elde edilmiştir. Kullanılan primerler ve verdikleri bantların sayı ve yaklaşık uzunlukları çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Bu çizelgede görüldüğü gibi, kullanılan primerler yardımıyla elde edilen bantların uzunlukları genel olarak 200–3000 bç aralığında değişmektedir. Opm10 primeri toplamda 345 ile en fazla bant sayısına ve Ra59 primeri ise 113 ile en az bant sayısına sahiptir. Bütün primerler toplamda 1847 bant meydana getirmiştir.

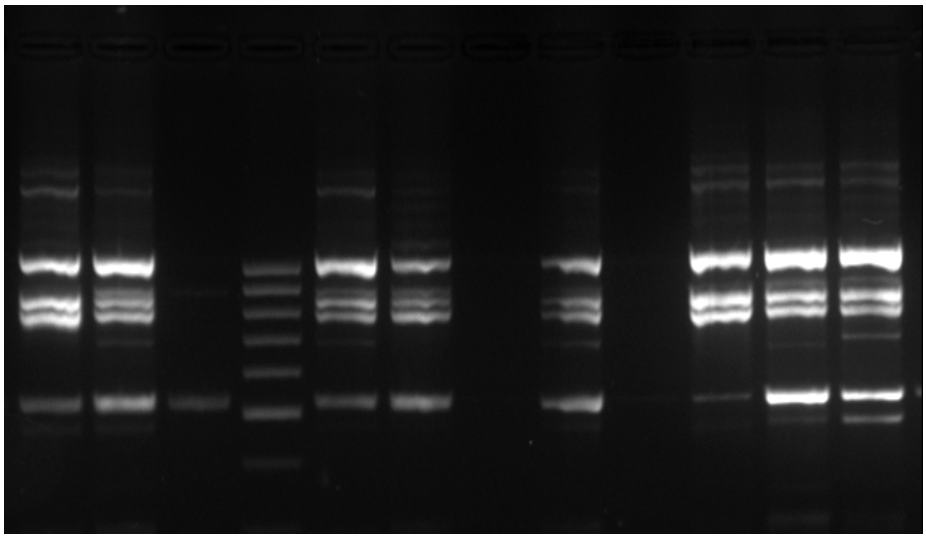
Var-yok esasına göre skorlanan fragmentlerin kullanılan primerlere ait her bir lokus için gen frekansları (Çizelge 4.2) ve heterozigotluk oranları (Çizelge 4.3) POPGEN32 programı ile belirlenmiştir. Ayrıca NTSYS genetik analiz programında genotipik yakınlığı gösteren dendogram oluşturulmuştur.

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'den de görüleceği gibi toplam 62 lokusun 57'sinin polimorfik olduğu 5'inin monomorfik olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen polimorfizm oranı % 91.94 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. 50 Ankara Keçilesinden, 8 Adet Primer ile Elde Edilen Bant Sayısı ve Aralıkları

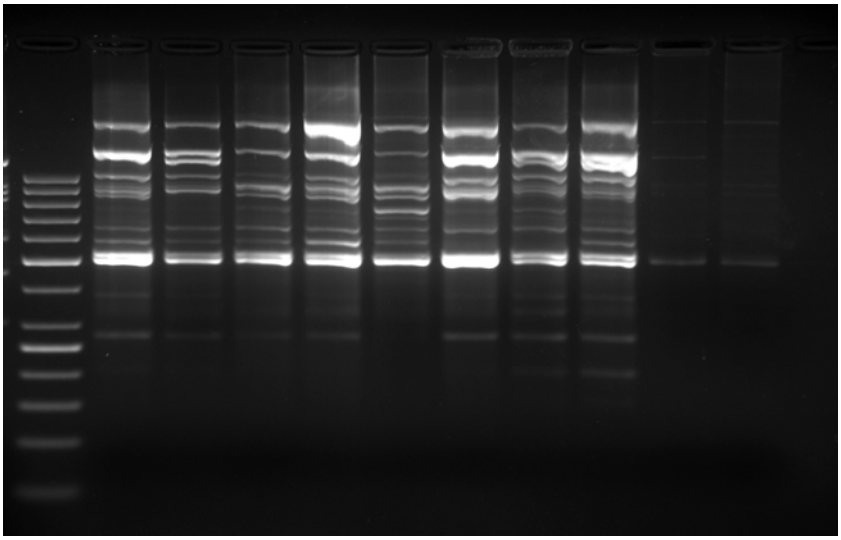
| Primer Adı | Bant Aralığı(bç) | GENOTİPLER | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Toplam Bant Sayısı |
|---|---|---

Aşağıda Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 , Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 ile ilgili açıklamalar ve araştırmada kullanılan 8 adet primerden elde edilen RAPD-PCR bantlarına ilişkin bazı fotoğraflar verilmiştir.



Şekil 4.1. Op08 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

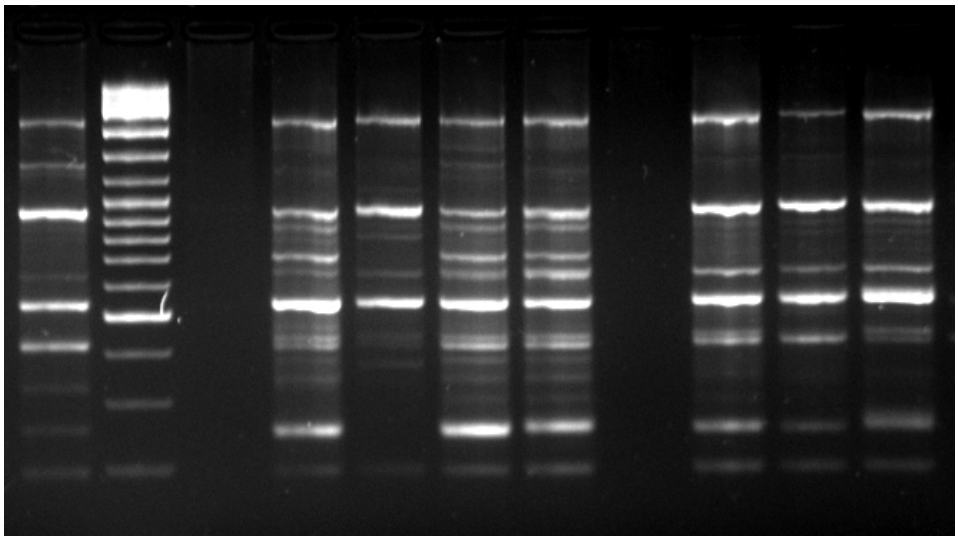
Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Op08 primeri ile 500-3000 bç aralığında toplam 8 bant elde edilmiştir. Bu bantların hepsi polimorfik bulunmuştur. Sekiz bant ile en fazla bant sayısına 15, 38, 46 ve 47 no'lu bireyler sahip iken, 22, 24, 26, 29, 30, 33, 34, 42, 44 ve 49 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. En yüksek frekans 8. lokusta (0.8515) ve en düşük frekans 4. lokusta (0.3873) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 7. lokusta (0.4888) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyon bu lokusta olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.2. Opm10 Primerina ait RAPD Bant Görüntüsü

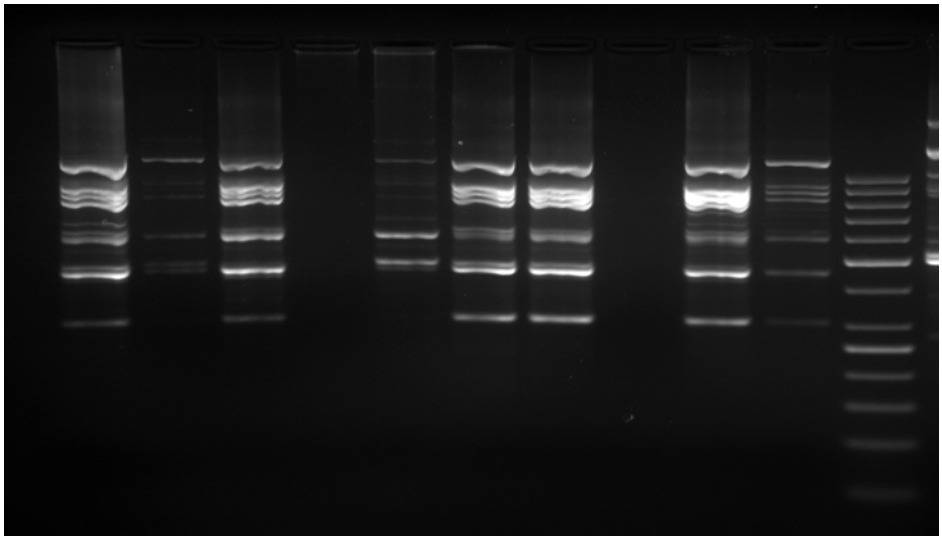
Opm10 primeri ile 500-3000 bç aralığında toplam 9 bant elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu bantların 8 tanesi polimorfik, 1 tanesi de monomorfik bulunmuştur. Dokuz bant ile en fazla bant sayısına 7, 8, 10, 12, 14, 17, 22, 28, 38, no'lu bireyler sahip iken, 36 ve 48 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. Ayrıca bütün primerlerin mevcut genotiplerde verdikleri toplam bant sayıları ele alındığında Opm10 primeri 345 bant sayısı ile en çok bant veren primer olmuştur (Çizelge 4.1) En yüksek frekans 3. ve 6. lokuslarda (0.6455) ve en düşük frekans 9. lokusta (0.1443) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 3. ve 6. lokuslarda (0.4861) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyon bu lokuslarda olmaktadır (Çizelge 4.3).

Sharma ve ark. (2001b) White Leghorn, Rhodes Island Red, Red Cornish, White Plymouth Rock ve Kadaknath tavuk ırkları arasındaki genetik çeşitliliği tespit etmek amacıyla toplam 50 primeri çalışmada denemişler ve 12 primerin polimorfik bant verdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada kullanılan Opm10 ile Opp15 primerleri Sharma ve ark. (2001b)'nın çalışmasında da kullanılmıştır. Çalışmalarında 12 adet polimorfik bant ile en fazla bant veren primer Opm10 primeri olurken, Opp15 primeri ile hiç polimorfik bant elde etmediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada hem Opm10 hem de Opp15 primerlerinin bireylerin genotiplerinin tanımlanmasında etkili olarak kullanılabileceği sonucu çıkmıştır.



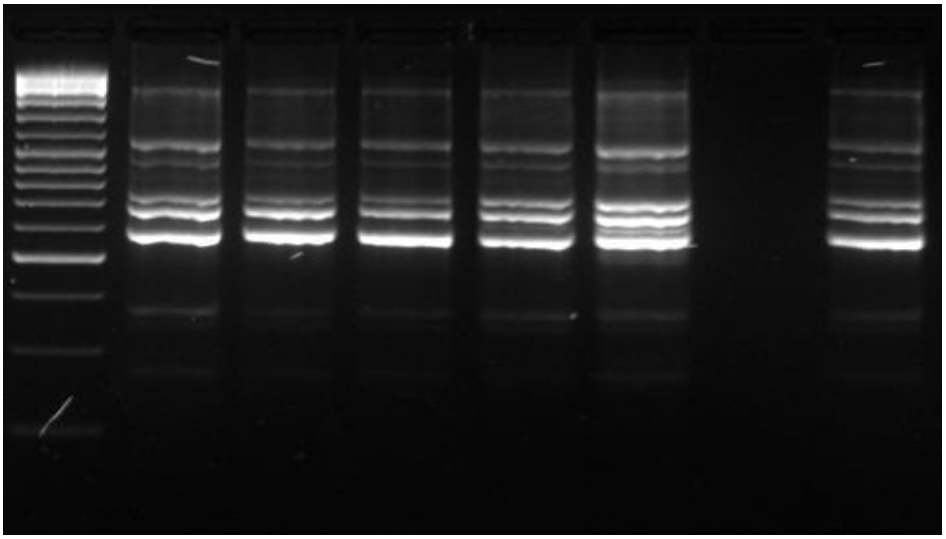
Şekil 4.3. Opp08 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Opp08 primeri ile 200-2200 bç aralığında toplam 10 bant elde edilmiştir. Bu bantların 9 tanesi polimorfik, 1 tanesi de monomorfik bulunmuştur. On bant ile en fazla bant sayısına 2, 3, 7, 8, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 34 no'lu bireyler sahip iken, 5, 6, 22, 25, 26, 29, 31, 36, 44, 45 ve 50 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. En yüksek frekans 3. lokusta (0.7161) ve en düşük frekans 1. lokusta (0.2265) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı 3. lokusta (0.4997) görülmektedir. Buradan yola çıkarak en yüksek varyasyon bu lokusta olduğu öne sürülmektedir (Çizelge 4.3).



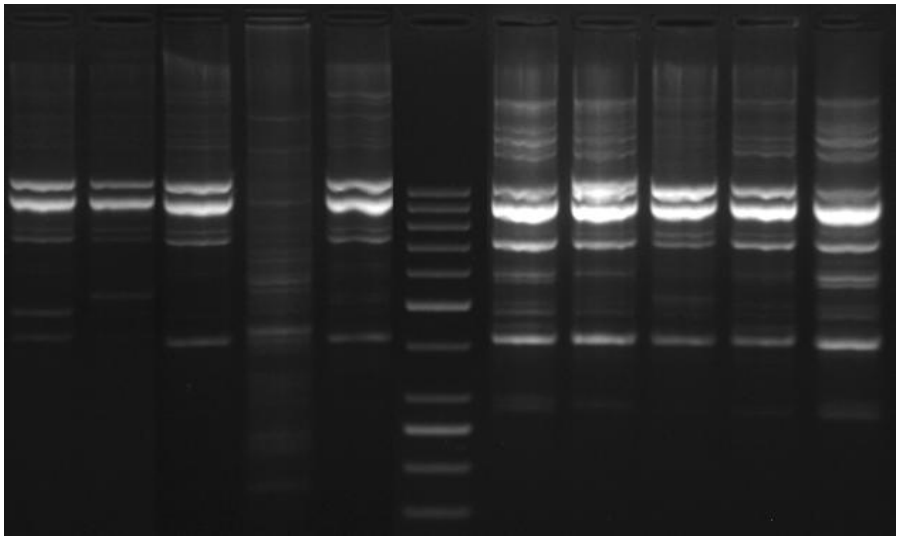
Şekil 4.4. Opp11 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Opp11 primeri ile 300-1500 bç aralığında toplam 8 bant elde edilmiştir. Bu bantların 7 tanesi polimorfik, 1 tanesi de monomorfik bulunmuştur. Sekiz bant ile en fazla bant sayısına 1, 8, 20, 27, 28, 41, 43, 46, 47, 49 no'lu bireyler sahip iken, 12, 25, 29, 36, 40, 44, 48 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. En yüksek frekans 6. lokusta (0.6988) ve en düşük frekans 1. lokusta (0.1525) tespit edilmiştir. (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 6. lokusta (0.4997) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyon bu lokusta olmaktadır (Çizelge 4.3).



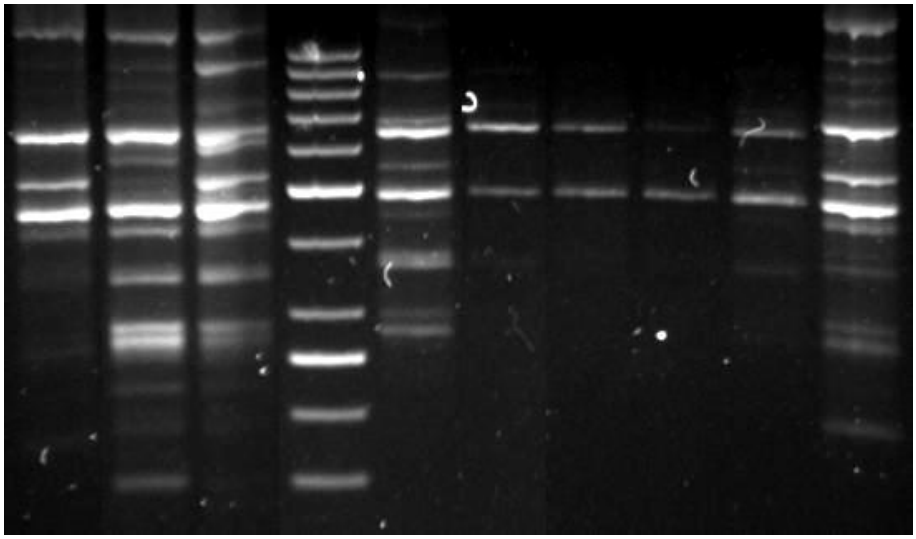
Şekil 4.5. Opp15 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Opp15 primeri ile 600-2500 bç aralığında toplam 9 bant elde edilmiştir. Bu bantların 8 tanesi polimorfik, 1 tanesi de monomorfik bulunmuştur. Dokuz bant ile en fazla bant sayısına 3, 6, 7, 8, 19, 20, 21, 27, 28, 34, 39 no'lu bireyler sahip iken, 22, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 36, 40, 44, 45, 48, 50 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. En yüksek frekans 4. lokusta (0.6151) ve en düşük frekans 5 ve 8. lokuslarda (0.1644) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 4. lokusta (0.4704) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyonun bu lokusta olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



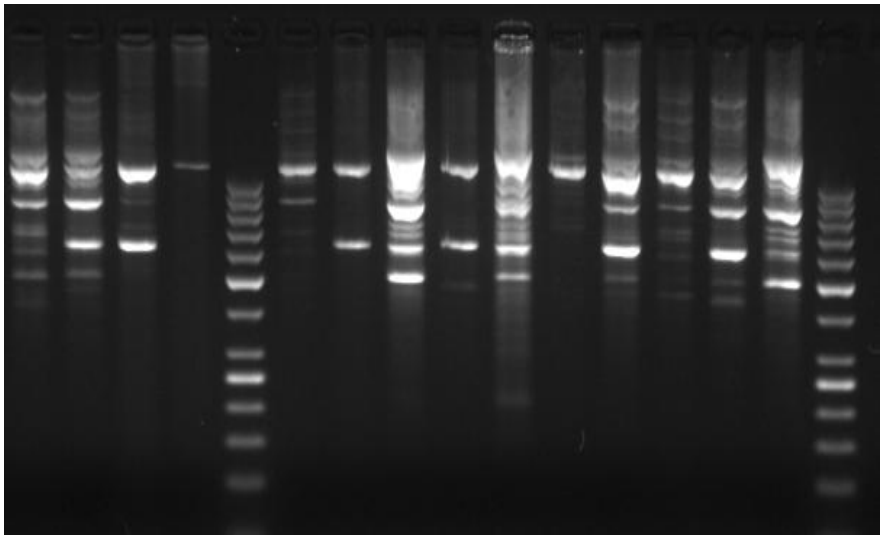
Şekil 4.6. Opq06 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Opq06 primeri ile 400-1200 bç aralığında toplam 6 bant elde edilmiştir. Bu bantların 5 tanesi polimorfik, 1 tanesi de monomorfik bulunmuştur. Altı bant ile en fazla bant sayısına 2, 3, 6, 7, 8, 11, 15, 17, 20, 21, 28, 29, 33, 37, 40, 48 no'lu bireyler sahip iken, 4, 12, 13, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 35, 36, 39, 41, 42, 47 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. En yüksek frekans 5. lokusta (0.5941) ve en düşük frekans 1. lokusta (0.1715) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 5. lokusta (0.4567) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyon bu lokusta olmaktadır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.7. Ra35 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Ra35 primeri ile 250-1200 bç aralığında toplam 7 bant elde edilmiştir. Bu bantların hepsi polimorfik bulunmuştur. Yedi bant ile en fazla bant sayısına 3, 11, 14, 19, 20 no'lu bireyler sahip iken, 24, 26, 29, 30, 31, 36, 39, 40, 43, 44, 45, 50 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. En yüksek frekans 7. lokusta (0.8272) ve en düşük frekans 3. lokusta (0.2294) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 2. ve 6. lokuslarda (0.4501) görülmektedir. En yüksek varyasyon bu lokuslarda bulunmaktadır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.8. Ra59 Primerine ait RAPD Bant Görüntüsü

Çizelge 4.1'den görüleceği gibi Ra59 primeri ile 500-1200 bç aralığında toplam 5 bant elde edilmiştir. Bu bantların hepsi polimorfik bulunmuştur. Beş bant ile en fazla bant sayısına 3, 4, 7, 8, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 30, 33, 41, 50 no'lu bireyler sahip iken, 2, 21, 22, 26, 29, 31, 32, 34, 35, 36, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 48 no'lu bireylerde bant gözlenememiştir. Ayrıca bütün primerlerin mevcut genotiplerde verdikleri toplam bant sayıları ele alındığında Ra59 primeri 113 bant sayısı ile en az bant veren primer olmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek frekans 5. lokusta (0.7289) ve en düşük frekans 1 ve 4. lokuslarda (0.4330) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 5. lokusta (0.4980) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyon bu lokuslarda olmaktadır (Çizelge 4.3).

Ra35 ve Ra59 primerleri, Yongjun ve ark., (1998) tarafından Tibet Keşmir keçilerinde denenmiştir. Yapılan bu çalışmada toplam 37 primerden elde edilen 5 tane ikili primer kombinasyonları kullanılmıştır. Ra33 primeri, Ra20 primeri ile birlikte denenmiş ve toplamda 16 bant elde edilmiştir. Ra35 primeri, Ra09 primeri ile kombine edilerek çalışılmış ve toplamda 10 bant elde edilmiştir. Mevcut çalışmada da Ra35 primeri ile 7 bant elde edilmiştir. Ra59 primeri 5 bant vermiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan Primerlere Ait Her Bir Lokus İçin Gen Frekansları

Primer Adı	Bant	Lokuslar ve Gen Frekansları									
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Op08	0 1	0.6124 0.3876	0.4183 0.5817	0.4183 0.5817	0.3873 0.6127	0.4743 0.5257	0.8216 0.1784	0.7583 0.2417	0.8515 0.1485		
Opm10	0 1	1. 0000	0.4082 0.5918	0.6455 0.3545	0.4787 0.5213	0.3819 0.6181	0.6455 0.3545	0.5000 0.5000	0.4082 0.5918	0.1443 0.8557	
Opp08	0 1	0.2265 0.7735	0.6405 0.3595	0.7161 0.2839	0.3581 0.6419	0.5991 0.4009	1. 0000	0.5064 0.4936	0.4804 0.5196	0.4529 0.5471	0.3581 0.6419
Opp11	0 1	0.1525 0.8475	1. 0000	0.4313 0.5687	0.6288 0.3712	0.5283 0.4717	0.6988 0.3012	0.3735 0.6265	0.6288 0.3712		
Opp15	0 1	0.4650 0.5350	1. 0000	0.4027 0.5973	0.6151 0.3849	0.1644 0.8356	0.5199 0.4801	0.5452 0.4548	0.1644 0.8356	0.2847 0.7153	
Opq06	0 1	0.1715 0.8285	1. 0000	0.4201 0.5799	0.4851 0.5149	0.5941 0.4059	0.4851 0.5149				
Ra35	0 1	0.3974 0.6026	0.5849 0.5141	0.2294 0.7706	0.5130 0.4870	0.2810 0.7190	0.8111 0.1889	0.8272 0.1728			
Ra59	0 1	0.4330 0.5670	0.5000 0.5000	0.5590 0.4410	0.4330 0.5670	0.7289 0.2711					

Çizelge 4.3. Kullanılan Primerlere Ait Her Bir Lokus İçin Heterozigotluk Oranları

Örnek Büyüklüğü	Lokus	h	Örnek Büyüklüğü	Lokus	h
40	Op08 -1	0.4688	43	Opp11-5	0.4024
40	Op08 -2	0.2888	43	Opp11-6	0.4997
40	Op08 -3	0.2888	43	Opp11-7	0.2401
40	Op08 -4	0.2550	43	Opp11-8	0.4781
40	Op08 -5	0.3487	37	Opp 15-1	0.3389
40	Op08 -6	0.4387	37	Opp 15-2	0.0000
40	Op08 -7	0.4888	37	Opp 15-3	0.2717
40	Op08 -8	0.3987	37	Opp 15-4	0.4704
48	Opm10-1	0.0000	37	Opp 15-5	0.0526
48	Opm10-2	0.2778	37	Opp 15-6	0.3944
48	Opm10-3	0.4861	37	Opp 15-7	0.4178
48	Opm10-4	0.3533	37	Opp 15-8	0.0526
48	Opm10-5	0.2491	37	Opp 15-9	0.1490
48	Opm10-6	0.4861	34	Opq06-1	0.0571
48	Opm10-7	0.3750	34	Opq06-2	0.0000
48	Opm10-8	0.2778	34	Opq06-3	0.2907
48	Opm10-9	0.0408	34	Opq06-4	0.3599
39	Opp08-1	0.0973	34	Opq06-5	0.4567
39	Opp08-2	0.4839	34	Opq06-6	0.3599
39	Opp08-3	0.4997	38	Ra35-1	0.2659
39	Opp08-4	0.2235	38	Ra35-2	0.4501
39	Opp08-5	0.4602	38	Ra35-3	0.0997
39	Opp08-6	0.0000	38	Ra35-4	0.3878
39	Opp08-7	0.3813	38	Ra35-5	0.1454
39	Opp08-8	0.3550	38	Ra35-6	0.4501
39	Opp08-9	0.3261	38	Ra35-7	0.4321
39	Opp08-10	0.2235	32	Ra59-1	0.3047
43	Opp11-1	0.0454	32	Ra59-2	0.3750
43	Opp11-2	0.0000	32	Ra59-3	0.4297
43	Opp11-3	0.3029	32	Ra59-4	0.3047
43	Opp11-4	0.4781	32	Ra59-5	0.4980
Ortalama ve standart hata					**0,3038± 0,1582**

RAPD-PCR yöntemiyle belirlenen her bir lokusa ait gen frekanslarının verildiği Çizelge 4.2‘ nin kullanılmasıyla primerlere ait, her bir lokustaki allel frekanslarından elde edilen heterozigotluk oranları Çizelge 4.3 ’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi ortalama heterozigotluk oranı 0.3038 ± 0.1582 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. 50 Ankara Keçisinin 8 Adet RAPD Markeri Bakımından Genetik Uzaklık Değerleri

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1	****																																																	
2	0.2151	****																																																	
3	0.2770	0.1198	****																																																
4	0.2559	0.2151	0.3205	****																																														
5	0.2985	0.2985	0.3205	0.2985	****																																													
6	0.3659	0.2770	0.1759	0.4136	0.3205	****																																													
7	0.3205	0.1568	0.0667	0.2770	0.2770	0.1382	****																																											
8	0.2151	0.1382	0.1198	0.2985	0.2985	0.2353	0.1198	****																																											
9	0.2770	0.3205	0.3429	0.4636	0.3659	0.4895	0.3895	0.2770	****																																										
10	0.3205	0.1953	0.2559	0.2770	0.1953	0.2559	0.2151	0.1953	0.2559	****																																									
11	0.3429	0.1759	0.0841	0.3895	0.3429	0.1953	0.1198	0.1382	0.3659	0.2770	****																																								
12	0.2353	0.2353	0.3429	0.2770	0.4136	0.2559	0.3429	0.2770	0.3895	0.2985	0.3659	****																																								
13	0.5436	0.5436	0.6306	0.3895	0.6614	0.6306	0.6931	0.5436	0.6931	0.6306	0.6614	0.4136	****																																								
14	0.4383	0.2559	0.2353	0.3895	0.3895	0.3205	0.2353	0.2559	0.4136	0.3205	0.2151	0.3205	0.6008	****																																							
15	0.2985	0.1759	0.1198	0.4383	0.3895	0.3205	0.1953	0.1759	0.3659	0.3659	0.1759	0.4136	0.5436	0.3429	****																																						
16	0.4383	0.4383	0.5162	0.2559	0.2985	0.4636	0.4636	0.4895	0.4636	0.3205	0.4383	0.4136	0.6008	0.3895	0.5436	****																																						
17	0.2353	0.1953	0.1382	0.3659	0.3205	0.2985	0.1759	0.0496	0.2985	0.2559	0.1568	0.3429	0.5162	0.2770	0.1198	0.5162	****																																					
18	0.3659	0.1953	0.2559	0.3205	0.2770	0.3895	0.2559	0.1568	0.2985	0.2151	0.2353	0.3895	0.4636	0.1953	0.3205	0.3659	0.1759	****																																				
19	0.3659	0.2770	0.1382	0.5162	0.3659	0.3429	0.2151	0.1953	0.3429	0.3895	0.1953	0.4895	0.6931	0.3659	0.1568	0.5162	0.1759	0.3429	****																																				
20	0.3205	0.1953	0.1018	0.3659	0.3659	0.2151	0.1018	0.0841	0.3429	0.2985	0.0841	0.3429	0.6931	0.2353	0.1568	0.4636	0.1382	0.2559	0.1382	****																																				
21	0.2985	0.2151	0.1953	0.2985	0.3895	0.3659	0.1953	0.1018	0.3659	0.2770	0.2151	0.3659	0.4895	0.3429	0.2151	0.6008	0.1568	0.2770	0.2770	0.1953	****																																				
22	0.3659	0.2770	0.2559	0.5162	0.3205	0.4383	0.2985	0.2770	0.2559	0.3895	0.3659	0.5436	0.7598	0.4636	0.1953	0.5162	0.2559	0.3429	0.2151	0.2985	0.3205	****																																				
23	0.4895	0.4383	0.4636	0.4895	0.5436	0.5718	0.4636	0.3429	0.5718	0.3659	0.4383	0.4136	0.6008	0.5436	0.4383	0.5436	0.4136	0.4636	0.5162	0.4136	0.2985	0.6306	****																																				
24	0.2770	0.2770	0.1759	0.4136	0.4636	0.3429	0.2151	0.2770	0.3429	0.3429	0.2353	0.3429	0.6306	0.3659	0.1568	0.5162	0.2985	0.4895	0.2559	0.2151	0.2353	0.3429	0.3205	****																																				
25	0.3429	0.2151	0.1953	0.4383	0.2559	0.2770	0.2353	0.1382	0.4136	0.2353	0.1759	0.3205	0.7259	0.3429	0.2559	0.5436	0.1953	0.3205	0.2770	0.1953	0.2151	0.3659	0.2985	0.3205	****																																				
26	0.3659	0.1953	0.1018	0.4136	0.3659	0.2985	0.1382	0.2353	0.3895	0.3429	0.1568	0.4895	0.6931	0.3659	0.0841	0.5718	0.2151	0.3895	0.1759	0.1382	0.2353	0.2151	0.4636	0.1382	0.3205	****																																				
27	0.2985	0.2985	0.1568	0.4383	0.3429	0.1568	0.1568	0.2151	0.3659	0.2770	0.1759	0.2770	0.7259	0.3429	0.2559	0.6008	0.2353	0.4136	0.2770	0.1568	0.2985	0.4136	0.4383	0.2353	0.2151	0.2353	****																																				
28	0.2770	0.1953	0.1382	0.3205	0.2353	0.1759	0.1382	0.1198	0.3429	0.1759	0.1568	0.2151	0.6306	0.2770	0.2353	0.4636	0.1759	0.2985	0.2559	0.1382	0.2353	0.3429	0.3205	0.2559	0.1198	0.2559	0.1198	****																																				
29	0.2770	0.1568	0.0667	0.4136	0.4136	0.2559	0.1382	0.1568	0.3429	0.3429	0.1198	0.3895	0.6931	0.3205	0.0841	0.5718	0.1759	0.3429	0.1382	0.0667	0.2353	0.2559	0.4636	0.1382	0.2353	0.0667	0.1568	0.1759	****																																				
30	0.3659	0.2353	0.1382	0.3205	0.4136	0.3429	0.1759	0.2770	0.3895	0.3429	0.1953	0.4895	0.6306	0.4136	0.1568	0.5162	0.2985	0.3895	0.2559	0.1759	0.2353	0.2985	0.4136	0.1018	0.3659	0.0667	0.2353	0.2985	0.1018	****																																				
31	0.3895	0.3429	0.2353	0.3895	0.3895	0.3205	0.2353	0.2985	0.5162	0.4636	0.2985	0.5718	0.6008	0.3895	0.2559	0.5436	0.2770	0.4636	0.2770	0.2770	0.2559	0.2770	0.6614	0.3205	0.4383	0.1953	0.3429	0.3659	0.2770	0.2770	0.2985	****																																				
32	0.3429	0.2151	0.2353	0.3429	0.3429	0.3659	0.1953	0.2151	0.4136	0.3205	0.2985	0.4136	0.5436	0.3429	0.2559	0.5436	0.2770	0.3205	0.3205	0.2770	0.2559	0.2353	0.4383	0.3205	0.2985	0.2353	0.3895	0.2353	0.2770	0.2770	0.2985	****																																				
33	0.3895	0.2985	0.2353	0.3895	0.4895	0.4136	0.2770	0.3429	0.4636	0.4636	0.2985	0.4636	0.5436	0.3429	0.1759	0.4895	0.2770	0.4136	0.3205	0.2770	0.4383	0.2770	0.6614	0.3205	0.4383	0.1953	0.3895	0.3205	0.2353	0.2770	0.2985	0.2559	****																																				
34	0.2559	0.2151	0.1953	0.3895	0.2985	0.3659	0.2353	0.2151	0.3205	0.3659	0.2985	0.4636	0.6614	0.4383	0.1382	0.4895	0.1953	0.3659	0.2353	0.2353	0.2985	0.0841	0.5436	0.2770	0.2985	0.1568	0.3429	0.2770	0.1953	0.2353	0.2151	0.1759	0.1759	****																																				
35	0.3895	0.2559	0.2353	0.2985	0.2985	0.3659	0.1953	0.2151	0.4136	0.3205	0.2985	0.4136	0.5436	0.3429	0.2985	0.4895	0.2770	0.3205	0.4136	0.2770	0.2559	0.2770	0.4383	0.3659	0.2559	0.2770	0.3895	0.2353	0.3205	0.3205	0.2985	0.1018	0.2559	0.1759	****																																				
36	0.3429	0.2151	0.1568	0.3895	0.4383	0.1568	0.1568	0.1382	0.4636	0.3659	0.1759	0.2770	0.6008	0.2559	0.2151	0.6008	0.1953	0.3205	0.2353	0.1198	0.2151	0.3659	0.5436	0.2770	0.2559	0.2353	0.2151	0.1953	0.1568	0.2770	0.2151	0.2985	0.3429	0.2985	0.3429	****																																				
37	0.4383	0.3429	0.3659	0.4383	0.3429	0.4136	0.3205	0.3429	0.5162	0.3205	0.3895	0.5162	0.6614	0.4895	0.3429	0.5436	0.4136	0.4636	0.5162	0.3659	0.3429	0.3205	0.4383	0.3659	0.2985	0.3205	0.4383	0.2770	0.3659	0.3659	0.3895	0.1759	0.2559	0.2559	0.1382	0.4383	****																																				
38	0.4383	0.4383	0.3205	0.6614	0.4895	0.4136	0.3659	0.3895	0.4136	0.4636	0.3895	0.5162	0.7949	0.3895	0.3429	0.4895	0.4136	0.5162	0.3659	0.3205	0.4895	0.2770	0.5436	0.3205	0.3895	0.3659	0.3429	0.2770	0.2770	0.4136	0.4383	0.2985	0.2985	0.2985	0.3429	0.3895	0.2151	****																																				
39	0.4383	0.3429	0.2770	0.3895	0.3895	0.3205	0.2770	0.2985	0.6306	0.5162	0.2985	0.4636	0.5436	0.3895	0.2985	0.6008	0.3205	0.5162	0.3205	0.2770	0.2985	0.5162	0.6008	0.3659	0.3429	0.2770	0.3895	0.3205	0.2770	0.3659	0.2151	0.3429	0.2985	0.3895	0.2985	0.1759	0.3429	0.4383	****																																				
40	0.3429	0.3895	0.2770	0.3895	0.5436	0.4636	0.3659	0.3895	0.6306	0.6306	0.3429	0.4636	0.4383	0.4895	0.3429	0.6008	0.4136	0.6306	0.3659	0.3205	0.4383	0.5718	0.6614	0.3205	0.4383	0.3205	0.3429	0.3659	0.2353	0.3205	0.3895	0.3895	0.3429	0.4383	0.3895	0.3895	0.4895	0.4383	0.2985	****																																				
41	0.3429	0.2985	0.3205	0.3429	0.3895	0.4136	0.3205	0.2985	0.6306	0.5162	0.3895	0.4136	0.3895	0.4383	0.3429	0.6008	0.3659	0.4136	0.4136	0.3659	0.3429	0.4636	0.4895	0.3659	0.2985	0.4136	0.3895	0.3205	0.3205	0.3659	0.4383	0.2151	0.3895	0.3429	0.2151	0.3895	0.2985	0.3895	0.2985	0.2151	****																																				
42	0.4383	0.3895	0.2770	0.4895	0.4895	0.4136	0.2353	0.3429	0.5718	0.4636	0.3895	0.6306	0.7259	0.4383	0.2985	0.6614	0.3659	0.4636	0.4136	0.3205	0.3895	0.3659	0.4383	0.3205	0.3895	0.2353	0.3895	0.3659	0.2770	0.2770	0.3429	0.2151	0.2151	0.2559	0.1759	0.3895	0.2151	0.3429	0.3429	0.3895	0.2985	****																																				
43	0.2559	0.2559	0.1568	0.3429	0.4383	0.2770	0.1953	0.2151	0.4136	0.4136	0.2559	0.3659	0.5436	0.2985	0.2151	0.6008	0.2353	0.3659	0.2353	0.1953	0.2985	0.3205	0.4895	0.2353	0.3429	0.2353	0.2151	0.1953	0.1568	0.2353	0.2985	0.2151	0.2559	0.2985	0.2559	0.2151	0.2559	0.2559	0.2151	0.2151	0.2559	****																																				
44	0.2770	0.2353	0.1382	0.3659	0.3659	0.2985	0.2151	0.2353	0.4383	0.4383	0.2353	0.4895	0.5718	0.4136	0.1568	0.5162	0.2559	0.3895	0.1382	0.1759	0.3205	0.2985	0.5718	0.2151	0.3205	0.1759	0.2770	0.2559	0.1018	0.1759	0.2353	0.3205	0.2770	0.2353	0.3659	0.2353	0.4136	0.3659	0.2770	0.2353	0.3205	0.1568	****																																				
45	0.2770	0.2353	0.1759	0.4136	0.3205	0.2985	0.1759	0.1953	0.3429	0.3895	0.2353	0.4383	0.6306	0.3659	0.1198	0.4636	0.2151	0.3895	0.1759	0.1382	0.2770	0.1759	0.5162	0.2151	0.3205	0.1382	0.2770	0.2151	0.1382	0.2151	0.1953	0.2353	0.1953	0.0841	0.2353	0.1953	0.3205	0.2770	0.2770	0.3659	0.3659	0.2770	0.2353	0.1759	****																																				
46	0.2353	0.1953	0.1759	0.3659	0.3659	0.3895	0.2559	0.1953	0.3895	0.3895	0.2770	0.3895	0.5162	0.3659	0.1568	0.5162	0.2151	0.3429	0.2151	0.2151	0.2770	0.2559	0.4136	0.2559	0.2770	0.2151	0.3205	0.2151	0.1382	0.2559	0.3659	0.1568	0.2353	0.1568	0.1953	0.2770	0.2353	0.2353	0.2770	0.2770	0.1953	0.2353	0.1568	0.1759	0.1759	****																																				
47	0.2770	0.2770	0.2559	0.4136	0.3659	0.3429	0.2985	0.2353	0.4383	0.3429	0.3205	0.3895	0.6306	0.4136	0.2353	0.5162	0.2559	0.3895	0.3429	0.2559	0.3659	0.2985	0.4636	0.2985	0.2353	0.2985	0.3205	0.2151	0.2151	0.3429	0.4136	0.1953	0.2353	0.1953	0.1568	0.3205	0.1198	0.1953	0.3205	0.3205	0.1953	0.1953	0.1953	0.2559	0.2559	0.1018	****																																				
48	0.4136	0.3659	0.3895	0.3205	0.6306	0.3429	0.3429	0.2770	0.6008	0.4895	0.4136	0.2559	0.4136	0.4136	0.4136	0.5718	0.3429	0.4895	0.4895	0.3429	0.3205	0.4895	0.5162	0.3895	0.3659	0.4895	0.3659	0.3429	0.3895	0.4383	0.4636	0.3205	0.4136	0.4136	0.3659	0.1953	0.4636	0.4636	0.3205	0.3659	0.2770	0.4636	0.3205	0.4895	0.4383	0.3429	0.3429	****																																				
49	0.2770	0.3659	0.3429	0.5162	0.3659	0.5436	0.4383	0.3659	0.3429	0.4895	0.4136	0.4383	0.6931	0.4636	0.3205	0.5718	0.3895	0.4383	0.2985	0.3895	0.4136	0.2559	0.5162	0.2985	0.3205	0.3895	0.4136	0.3429	0.2985	0.3895	0.5718	0.2770	0.3659	0.2770	0.2770	0.4636	0.2770	0.2770	0.4136	0.3659	0.2353	0.3205	0.2353	0.2985	0.3429	0.1382	0.1382	0.4383	****																																				
50	0.3895	0.2559	0.1953	0.4383	0.3895	0.2353	0.1953	0.2559	0.5718	0.4136	0.2559	0.3659	0.6008	0.4383	0.2151	0.6008	0.3205	0.4636	0.2770	0.1953	0.2985	0.4136	0.5436	0.2353	0.2985	0.1953	0.2985	0.2770	0.1568	0.2353	0.2985	0.3429	0.3429	0.2985	0.2985	0.1382	0.3429	0.4383	0.1759	0.3429	0.3429	0.2985	0.2985	0.1953	0.1953	0.2353	0.2770	0.3659	0.3659	****

Çizelge 4.4 ’de 50 Ankara keçisinin 8 adet RAPD markeri bakımından ikili değerlerin basit eşleştirme yöntemi ile genetik uzaklık değerleri verilmiştir. Çizelge 4.4’te görüldüğü gibi 8 ve 17 nolu keçiler genetik yapı bakımından birbirine en yakın olan (0.0496) bireyler olmuştur. Genetik yapı bakımından birbirine en uzak olan keçiler ise 13 ve 38 (0.7949) nolu bireyler olmuştur.

Li ve ark (2002), Shanxi bölgesi keçilerinde RAPD yöntemiyle, 8 primer kullanarak yaptıkları çalışmada; Bai, Hei ve Qing keçi ırklarında elde edilen DNA fragmentleri 180 ve 2870 bç aralığında bantlar vermiştir. Bu çalışmada toplam 76 fragment elde edilmiş ve bunlardan 44 fragment bu keçi populasyonları için polimorfik bantlar meydana getirmiştir. Sekiz primer ile elde edilen polimorfizm oranı % 57.89, genetik uzaklık ise 0.2040 - 0.0810 arasında tahmin edilmiştir. Bu sonuçlarla mukayese edildiğinde, Ankara Keçilerinde genetik varyasyonun Shanxi bölgesi keçi ırklarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Yongjun ve ark. (1998), Tibet Keşmir keçilerinde 5 primer ile 2926 bant elde edildiğini ve bu bantların % 83’ünün polimorfik olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada populasyon içi ortalama benzerlik 0.6734, populasyondaki ortalama genetik uzaklık ise 0.3266 olarak bulunmuştur. Bu araştırmada, Ankara keçileri için tahmin edilen ortalama genetik benzerlik (0.0496) ve genetik uzaklığın (0.7949) bu değerlere uzak olduğu söylenebilir.

Ajmone-Marsan ve ark’nın (2001) yedi farklı İtalya keçi ırkında AFLP yöntemiyle belirlediği çalışmada genetik benzerlik 0.57 - 0.87 arasında ortalama 0.72 olarak bulunmuştur. Bu ırklarda ortalama heterozigotluk oranı ise 0.21 - 0.24 değerleri arasında tahmin edilmiştir. Bu değerlere bakıldığında, Ankara Keçilerinde genetik varyasyonun İtalya keçi ırklarına göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

Ganai ve Yadav’ın (2001) mikrosatellit markerler ile Hindistan bölgesine ait 3 keçi ırkında yaptıkları çalışmada 16 mikrosatellit markeri kullanmışlardır. Bu çalışmalarında, ortalama heterozigotluk değerini 0.54 ± 0.20, polimorfizm oranını ise 0.48 ± 0.20 olarak bulmuşlardır. Ganai ve Yadav’ın yaptığı bu çalışma ile

kıyaslandığında, Ankara keçilerine ait heterozigotluğun (0.3038 ± 0.1582) daha düşük olduğu görülmektedir.

İki Hindistan keçi ırkında (Bengal ve Chegu) yapılan bir başka çalışmada Behl ve ark (2003) 22 mikrosatellit markeri kullanmışlardır. Yapılan bu çalışmada, heterozigotluk Bengal için 0.69 ± 0.11 ve Chegu için ise 0.66±0.07 olarak bulunmuştur. Polimorfizm değerleri ise Bengal için 0.79 ± 0.08 ve Chegu için de 0.78 ± 0.05 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma ile kıyaslandığında tahmin edilen heterozigotluğun (0.3038 ± 0.1582) daha düşük olduğu görülmektedir.

Nyamsamba ve ark (2002)'nın Moğol keçi ırklarında yaptıkları çalışmada, 8 farklı bölgeden aldıkları örneklerle 10 mikrosatellit markeri deneyerek genetik farklılığı ortaya koymaya çalışmışlardır. Bu çalışmada heterozigotluk 0.6690 - 0.7300 değerleri arasında değişim göstermektedir. Ankara keçileri ile kıyaslandığında, heterozigotluk oranının (0.3038 ± 0.1582) daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Kullanılan Primerlere Ait Her Bir Lokus İçin Genetik Varyasyon Ölçütleri

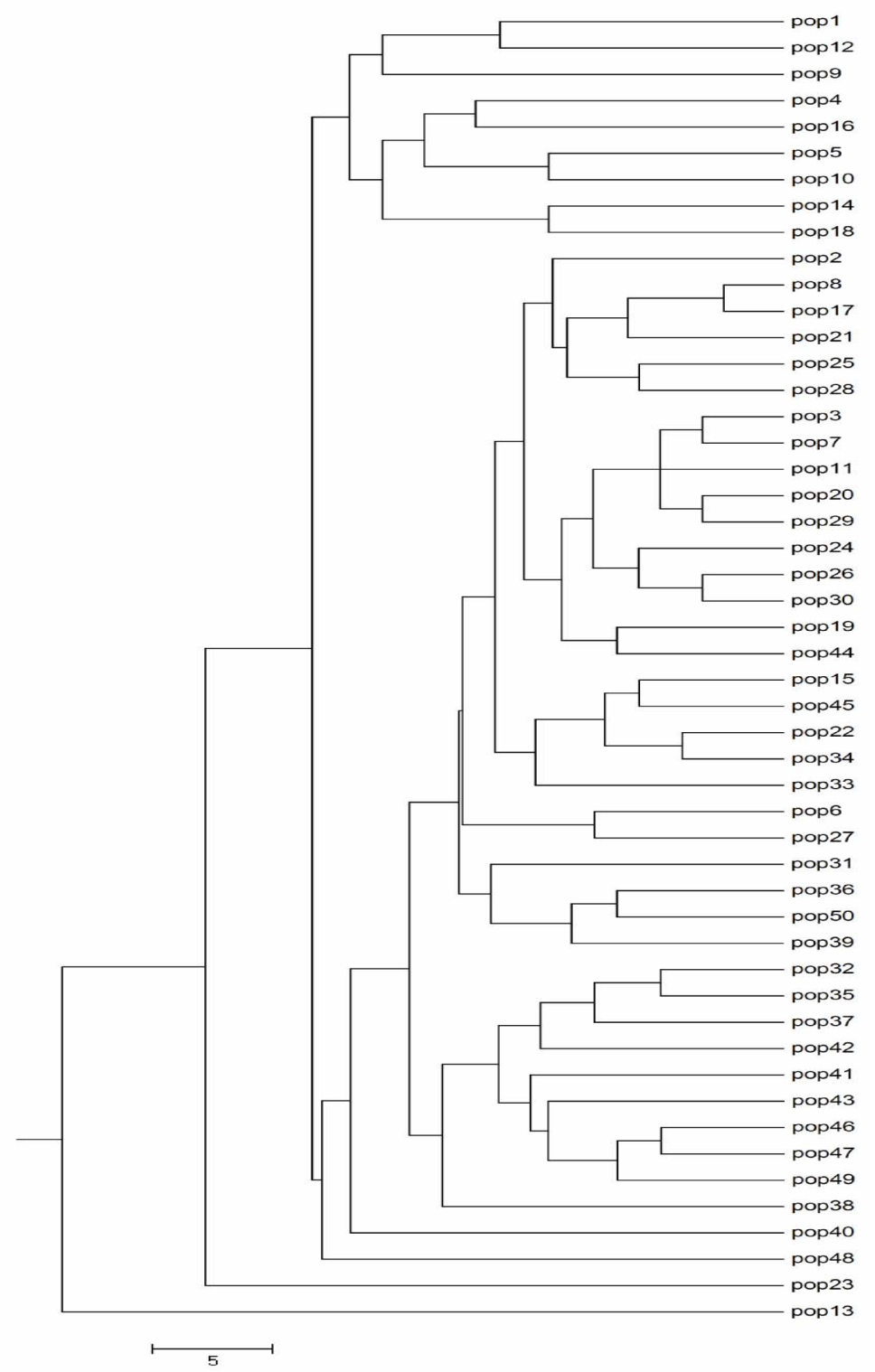
Lokus	Örnek Büyüklüğü	na	ne	h	I	Lokus	Örnek Büyüklüğü	na	ne	h	I
Op08 -1	40	2.000	1.9038	0.4747	0.6677	Opp11-5	43	2.000	1.9936	0.4984	0.6915
Op08 -2	40	2.000	1.9480	0.4867	0.6797	Opp11-6	43	2.000	1.7269	0.4209	0.6118
Op08 -3	40	2.000	1.9480	0.4867	0.6797	Opp11-7	43	2.000	1.8798	0.4680	0.6608
Op08 -4	40	2.000	1.9033	0.4746	0.6675	Opp11-8	43	2.000	1.8756	0.4668	0.6596
Op08 -5	40	2.000	1.9947	0.4987	0.6918	Opp 15-1	37	2.000	1.9902	0.4975	0.6907
Op08 -6	40	2.000	1.4148	0.2932	0.4690	Opp 15-2	37	1.000	1.0000	0.0000	0.0000
Op08 -7	40	2.000	1.5787	0.3666	0.5530	Opp 15-3	37	2.000	1.9270	0.4811	0.6741
Op08 -8	40	2.000	1.3386	0.2529	0.4202	Opp 15-4	37	2.000	1.8993	0.4735	0.6664
Opm10-1	48	1.000	1.0000	0.0000	0.0000	Opp 15-5	37	2.000	1.3788	0.2747	0.4469
Opm10-2	48	2.000	1.9348	0.4832	0.6762	Opp 15-6	37	2.000	1.9968	0.4992	0.6924
Opm10-3	48	2.000	1.8439	0.4577	0.6502	Opp 15-7	37	2.000	1.9838	0.4959	0.6890
Opm10-4	48	2.000	1.9964	0.4991	0.6922	Opp 15-8	37	2.000	1.3788	0.2747	0.4469
Opm10-5	48	2.000	1.8943	0.4721	0.6650	Opp 15-9	37	2.000	1.6873	0.4073	0.5974
Opm10-6	48	2.000	1.8439	0.4577	0.6502	Opq06-1	34	2.000	1.3970	0.2842	0.4583
Opm10-7	48	2.000	2.0000	0.5000	0.6931	Opq06-2	34	1.000	1.0000	0.0000	0.0000
Opm10-8	48	2.000	1.9348	0.4832	0.6762	Opq06-3	34	2.000	1.9502	0.4872	0.6803
Opm10-9	48	2.000	1.3280	0.2470	0.4128	Opq06-4	34	2.000	1.9982	0.4996	0.6927
Opp08-1	39	2.000	1.5393	0.3503	0.5350	Opq06-5	34	2.000	1.9316	0.4823	0.6753
Opp08-2	39	2.000	1.8536	0.4605	0.6531	Opq06-6	34	2.000	1.9982	0.4996	0.6927
Opp08-3	39	2.000	1.6852	0.4066	0.5966	Ra35-1	38	2.000	1.9191	0.4789	0.6719
Opp08-4	39	2.000	1.8508	0.4597	0.6523	Ra35-2	38	2.000	1.9440	0.4856	0.6787
Opp08-5	39	2.000	1.9243	0.4803	0.6734	Ra35-3	38	2.000	1.5470	0.3536	0.5386
Opp08-6	39	1.000	1.0000	0.0000	0.0000	Ra35-4	38	2.000	1.9987	0.4997	0.6928
Opp08-7	39	2.000	1.9997	0.4999	0.6931	Ra35-5	38	2.000	1.6780	0.4041	0.5939
Opp08-8	39	2.000	1.9969	0.4992	0.6924	Ra35-6	38	2.000	1.4418	0.3064	0.4846
Opp08-9	39	2.000	1.9824	0.4956	0.6887	Ra35-7	38	2.000	1.4004	0.2859	0.4603
Opp08-10	39	2.000	1.8508	0.4597	0.6523	Ra59-1	32	2.000	1.9647	0.4910	0.6841
Opp11-1	43	2.000	1.3486	0.2585	O.4270	Ra59-2	32	2.000	2.0000	0.5000	0.6931
Opp11-2	43	1.000	1.0000	0.0000	0.0000	Ra59-3	32	2.000	1.9725	0.4930	0.6862
Opp11-3	43	2.000	1.9630	0.4906	0.6837	Ra59-4	32	2.000	1.9647	0.4910	0.6841
Opp11-4	43	2.000	1.8756	0.4668	0.6596	Ra59-5	32	2.000	1.6535	0.3952	0.5844
Ortalama (na) 1.9194				**Ortalama (ne) 1.7444**							

Çizelge 4.5'den de görüldüğü gibi Op08 primerine bakıldığında tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 5. lokusun (1.9947) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgiyi 5. lokustan (0.6918) elde edebiliriz. Opm10 primerine bakıldığında ilk lokusta 1 allel, diğer tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 7. lokusun (2.000) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgi 7. lokustan (0.6931) elde edebilir.

Çizelge 4.5' den de görüldüğü gibi Opp08 primerine bakıldığında 6. lokusta 1 allel, diğer tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 7. lokusun (1.9997) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgiyi 7. lokustan (0.6931) elde edebilir. Opp11 primerine bakıldığında 2. lokusta 1 allel, diğer tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 5. lokusun (1.9936) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgiyi 5. lokustan (0.6915) elde edebilir. Opp15 primerine bakıldığında 2. lokusta 1 allel, diğer tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 6. lokusun (1.9968) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgi 6. lokustan (0.6924) elde edebilir.

Opq06 primerine bakıldığında 2. lokusta 1 allel, diğer tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 4 ve 6. lokuslarda (1.9982) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgiyi 4 ve 6. lokuslardan (0.6927) elde edebilir. Ra35 primerine bakıldığında tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 4. lokusun (1.9987) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgi 4. lokustan (0.6928) elde edebilir.

Ra59 primerine bakıldığında tüm lokuslarda 2 allel olduğu görülmektedir. Etkili allel sayısı bakımından bakıldığı zaman ise 2. lokusun (2.000) en etkili allele sahip olduğu söylenebilir. En fazla bilgiyi 2. lokustan (0.6931) elde edebilir. Tüm lokuslar üzerinden ortalama allel sayısı (na) 1.9194, ortalama etkili allel sayısı (ne) 1.7444 bulunmaktadır.



Şekil 4.9. 50 Ankara Keçisinin 8 RAPD Markeri Bakımından UPGMA Dendogramı

Araştırma sonucunda skorlanabilen RAPD bantlarından NTSYS - pc ile genotipik varyasyonun gösterildiği genetik ilişki dendogramı UPGMA yöntemine göre oluşturulmuştur. Şekil 4.9 'da görüldüğü gibi 50 keçinin genetik benzerlik değerleri ile oluşturulan genetik ilişki dendogramında 13. bireyin yer aldığı grup ile diğer tüm bireylerin yer aldığı iki ana gruba ayrılmıştır. 13. bireyin dışındaki diğer grubu oluşturan bireyler yine kendi içinde 23. birey ile geri kalan bireylerin oluşturduğu başka bir alt grup oluşturmuştur. Yine bu alt gruplar 2 alt gruba ayrılmış olup, bu alt gruplarda kendi içlerinde farklı alt gruplara sahip olmuşlardır. Dendogramdan 8. birey ve 17 nolu bireylerin genetik yapı bakımından birbirine en yakın olan genotipler olduğu görülmektedir. Çizelge 4.4 ve Şekil 4.9 'dan görüldüğü gibi 13 nolu bireyin genetik yapı bakımından diğer keçilerden farklı olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak Ankara Keçisi temsil eden bu 50 bireyin heterojen bir yapıda olduğu ve bu genetik çeşitliliğin ıslah amaçlı kullanım potansiyeline sahiptir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tanımlanmasına ve yerli gen kaynağı olarak korunmasına yönelik çalışmalar sürdürülen 50 baş Ankara Keçisinde DNA düzeyinde RAPD yöntemi ile genetik benzerlik, uzaklık, polimorfizm ve heterozigotluk gibi parametrelerin belirlenmesine çalışılmıştır.

Ankara keçilerine ait bütün primerler göz önüne alındığında bant sayısı en fazla olan primer Opm10 (TCT GGC GCA C) primeri olurken, Ra59 (CGG GCA ACG T) primeri bant sayısı en az olan primer olmuştur.

Populasyon içi ortalama heterozigotluk oranı 0.3038 ± 0.1582 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada bireyler arasında tespit edilen genetik benzerlik ve uzaklık değerleri ile genotipik varyasyonun gösterildiği genetik ilişki dendogramı bireysel bazda genotipik varyasyonun RAPD-PCR metodu ile tespit edilebildiğini göstermiştir.

Moleküler genetikle ilgili yöntemler genellikle gelişmiş laboratuar gerektiren pahalı yöntemlerdir. RAPD yöntemi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında uygulanabilirlik açısından daha kolay ve ucuz bir yöntemdir. Ankara keçilerinde yapılan bu araştırma sınırlı imkânlarla kurulmuş bir laboratuarda bu alanda yapılan ilk çalışma olmasına karşın, yeterli düzeyde güvenilir sonuçlar elde edildiği söylenebilir. Çalışmayla DNA düzeyinde polimorfizm belirleme yöntemlerinden RAPD yönteminin Ankara keçilerinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Yerli gen kaynakların detaylı envanter kayıtlarının çıkarılması ve hangi ırk yada genotiplerin risk altında olduğu saptanmalıdır. Yerli gen kaynaklarının, gelecekte sunabileceği muhtemel faydaları ve önemi basın yayın organları aracılığı ile kamuoyunun bilgilendirilmesi ve bilinçlendirilmesi gereklidir. Yerli hayvan yetiştiricileri ekonomik yönden ve kurulan birlikler ise teknik yönden daha fazla desteklenmelidir.

Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar gelecekte aynı ırkta yapılacak benzer çalışmalarda yapılacak karşılaştırmalar için referans niteliği taşıyacaktır. Türkiye' de diğer keçi populasyonlarında yapılacak çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılması içinde yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak, RAPD markerleri bakımından Ankara Keçisine ait bireyler arasında genetik polimorfizm ortaya konularak, RAPD yöntemi ile bu hayvanlar hakkında DNA seviyesinde tanımlayıcı bir ön bilginin elde edildiği söylenebilir. Laboratuar ve bütçe imkânları genişletildiğinde, DNA düzeyinde farklı polimorfizm belirleme yöntemlerinin de kullanıldığı daha kapsamlı çalışmalarla, Türkiye'nin tüm Ankara keçisi populasyonu içerisinde olması muhtemel farklı ekotipleri de içine alan, hatta diğer yerli çiftlik hayvanlarını da kapsayacak araştırmaların planlanıp gerçekleştirilmesi yerinde olacaktır. Bu şekilde, yerli gen kaynaklarına ait genetik bilgiler elde edilmiş olacaktır. Bu durum, ilerde yapılması muhtemel yerli gen kaynaklarının korunması programları için de gereklidir. Bununla birlikte diğer yerli ve kültür ırkı keçiler ile de yapılacak çalışmalar planlanmalıdır. Özellikle ekonomik öneme sahip özellikler dikkate alınarak DNA seviyesinde yapılacak çalışmalar ve bunların pratiğe aktarılmaları zamanla daha çok önem kazanacak ve yurt dışında hayvancılık alanında yapılmakta olan markere dayalı seleksiyon çalışmalarının ülkemizde de uygulanması verim artışını sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Ajmone - Marsan, P., Negrini, R., Crepaldi, P., Milanesi, E., Gorni, C., Valentini, A. and Cicogna, M. 2001 Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. Animal Genetics 32: 281–288.

Ajmone - Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M., Vecchiotti - Antaldi, G., Bertoni, G., Kuiper, M. 1997 AFLP Markers for DNA fingerprinting in cattle. Animal Genetics 28: 418 – 426.

Anonim 2005. Akkuş, S. DNA Parmak İzi ve Adli Biyoloji. Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü – 4. Sınıf Bitirme Tezi. Elazığ. Erişim tarihi (05/11/2007).http://www.google.com.tr/search?hl=tr&q=Akku%C5%9F%2C+S.+DNA+Parmak+%C4%B0zi+ve+Adli+Biyoloji&btnG=Google%27da+Ara&meta=

Anonim 2006 Biyoçeşitlilik nedir? http://www.tagem.gov.tr/hgk/biyoceşitlilik.htlm. Erişim tarihi (05/11/2007).

Anonim 2007 http://www.gencbilim.com/odev_tez/rapdpcr+ve+rflp+ yontemleriyle +dna+parmakizi+analizi+esnasinda++yontem+kalitesini+etkileyen+etmenler.odev _tez_makale. 9988. php

Anonim 2008 Ceyhan, O. Genetik Araştırmalar Merkezi- Polimeraz Zincir Reaksiyonu. http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik.pdf. Erişim Tarihi (25/06/2008)

Ashton, G. C. 1958 Polymorphism in the B globulin of sheep. Nature 182 : 849.

Aytekin, İ. 2006 Güney Karaman Koyun Irkında Genetik Polimorfizmin Rapd-Pcr Yöntemiyle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı. Konya.

Bardakçı, F. and Skibinski, D. O. F. 1994 Application of the RAPD techniques in Tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity 73: 117–123.

Bardakçı, F. 2001. RAPD markers. Turk J. Biol. 25: 185-196.

Behl, R., Sheoran, N., Behl, J., Vijh, R.K., Tantia, M.S. 2003 Analysis Of 22 Heterologous Microsatellite Markers For Genetic Variability ın Indian Goats. Animal Biotechnology 14 (2): 167–175.

Beuzen, N. D., Stear, M. J. and Chang, K. C. 2000 Moleculer markers and their use in animal breeding. The Veterinary Journal 160: 42–52.

Birden, E. 2006. Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction (PCR)]. Astım Allerji İmmünoloji 4 (2): 92 – 94.

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

Bowdithch B. M., Albrilght, D.G., Williams, J. G. K., Braun, M. J. 1991. Use of Rapd markers in comparative genome studies. Methods in Enzymology, Vol. 224.

Budak, H., Bölek, Y., Dokuyucu, T. and Akkaya, A. 2004 Potential uses of molecular markers in crop improvement. KSU Journal of Science and Engineering 7(1): 75–79.

Burt, D. W., Albright, D. G., Williams, J. G. K., Ponce De Leon , F. A., Braun, M. J. 1995. Chicken genome mapping: A new area in avian genetics. Trends in Genetics 11: 190 - 194.

Cerit, H. 2003 Bir Holştayn sığır populasyonunda bazı genomik lokusların allel frekanslarının belirlenmesi ve birey tanımlanmasındaki önemi. Turk J. Vet. Anim. Sci 27: 81-91

Clemens, S., Palmgren, M. G. and Krämer, U. 2002 A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation , Trends in Plant Science 7, 309-315

Crawford, A. M., Motgomery, G. W., Pierson, C. A., Brown, T., Dodds, K. G., Sunden, S. L. F., Henry, H. M., Ede, A. J., Swapbrıck, P. A., Beryyman, T., Penty, J. M., Hill, D. F. 1994 Sheep linkage mapping: nineteen linkage groups derived from analysis of paternal half - sib families. Genetics 137: 573–579.

Cushwa, W. T., Dodds, K. G., Crawford, A. M. and Medrano, J. F. 1996 Identification and genetic mapping of random amplified polimorphic DNA (Rapd) markers to the sheep genome. Mammalian Genome 7: 580–585.

Çalışkan, M. 2005 Rapd Analizi ile Güllerde (Rosa sp.) Genetik Tanımlama. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Ankara

Çiftçi., Y . 2003. Balıkçılık ve Su Ürünlerinde Kullanılan Genetik Marker Sistemleri –II. SÜMAE Yunus Araştırma Bülteni – Eylül 3: 3.

Dunnington, E. A., Gal, O., Plotsky, Y., Haberfeld, A., Kirk, T., Goldberg, A., Lavi, U., Cahaner, A., Siegel, P. B. and Hillel, J. 1990 DNA fingerprintings of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. Animal Genetics 21: 247–257.

Güneren, G. 1999 Polimeraz zincir reaksiyonu ile rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA parmak izi yönteminin (RAPD-PCR) Türkiye yerli sığır ırklarında uygulanma olanakları. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Ankara.

Gutiérrea - Adán, A., Cushwa, W. T., Anderson, G. B. and Medrano, J. F. 1997 Ovine-specific Y- Choromosome Rapd-Scar marker for embryo sexing. Animal Genetics 28: 135 – 138.

Ganai, N. A. and Yadav, B. R. 2001 Genetic Variation Within and Among Three Indian Breeds Of Goat Using Heterologous Microsatellite Markers. Animal Biotechnology 12 (2): 121–136.

Horng, Y. M. and Huang, M. C. 2000 Male - Specific Band in Random Amplified Microsatellite Polymorphism Fingerprints of Holstein Cattle. Proc. Natl. Sci. Counc 24 (1): 41-46

Hallden, C., Nilsson, N. O., Rading, I. M., Sall, T. 1994 Evaluation of RFLP Markers in a Comparison Of Brassica Napus Breeding Lines. Theoretical and Applied Genetics 88 (1): 123–128.

İlhak, İ. ve Arslan, A. 2003 RAPD Yöntemiyle Sığır, Koyun, Keçi ve Yabani Domuz Etinin Ayırt Edilmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 17 (1): 59-63

Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. 1985. Hypervariable 'Minisatellite' Regions in Human DNA. Nature 314: 67–73.

Jeffreys, A. J. and Morton, D. B. 1987 DNA Fingerprints of Dogs and Cats. Animal Genetics 18: 1–15.

Koh. M. C., Lim. C. H., Chua, S. B., Chew, S. T. and Phang, A. T. W. 1998 Random Amplifield Polymorphic DNA (Rapd) Fingerprints for Identification of Red Meat Animal Species. Meat Science 48: 275–285.

Lee, J. C. and Chang, J. G. 1994 RAPD-PCR fingerprints in forensic species identification. Forensic Science International 67: 103–107.

Li, B., Du, M., Guo, X. and Zhou, Z. 2002 Genetic analysis of shanxi native goats using Rapd markers. 7th Word Congress on Genetics Applied to Livestok Production, August 19–23, Montpeller, France. Abstract.

Li, L., Zhang, J., Zhu, J., Gu, S., Sun, Q., Zhou G., Fu C., Li Q., Chen L., Li D., Liu S., and Yang Z. 2006 Genetic Diversity of Nine Populations of the Black Goat (Capra hircus) in Sichuan, PR China. Zoological Science 23 (3): 229–234.

Miller, S. A., Dukes, D. D. and Polesk, H. F. 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleid Acids Resarch 16 (3): 1215.

Martin, G. B., Williams, J. G. K. and Tanksley, S. D. 1991 Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near - isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci 88: 2336–2340.

Morgan , U. M., Constantine, C. C., Greene, W.K., Thompson, R.C. 1993 Rapd analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 87 (6): 702–705.

Morton, D. B., Yaxley, R. E., Patel, I., Howes, S. J., Debenham, P. G. 1987 Use of DNA fingerprint analysis in identification of the sire. Veterinary Record 121: 592-–593. Abstract.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. NewYork

Nyamsamba, D., Takahashi, H., Nomura, K., Zagdsuren, Y., Minezawa, M., Amano, T. 2002 Microsatellite Analysis of Mongolian Goat Populations: High Genetic Variation Within and Low Genetic Differentiation Between Populations. 7th World Congress On Genetics Applied to Livestock Production, August 19–23. Montpellier, France.

Paiva, S. R., Silvério, V. C., Egito, A. A., McManus, C., Assis de Faria, D., Mariante, A. S., Castro, S. R., Albuquerque, M. S. M. and Dergam, J. A. 2005 Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. Pesq. agropec. bras., Brasília 40(9): 887-893

Plotsky, Y., Kaiser, M. G. and Lamont, S. J. 1995 Genetic characterization of highly inbred chicken lines by two DNA methods: DNA fingerprining and polimerase chain reaction using arbitrary primers. Animal Genetics 26: 163–170.

Rothuizen, J. and Van Wolferen, M. 1994 Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. Animal Genetics 25: 13–18.

Saitbekova, N., Gaillard, C., Obexer-ruff, G., Dolf, G. 1999 Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. Animal Genetics 30: 36–41

Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988 Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487–491.

Scott, M. P., Heymes, K. M., Williams, S. M. 1992 Parentage analysis using Rapd-Pcr. Nucleic Acids Research 20: 5493.

Sharma, D., Appa Rao, K. B. C., Singh, R. V. and Totey, S. M. 2001a Genetic diversity among chicken breeds estimated through randomly amplified polymorphic DNA. Animal Biotechnology 12(2): 111–120.

Sharma, D., Appa Rao, K. B. C., Totey, S. M. 2001b Measurement of within and between population genetic variability in quails. British Poultry Science 41: 29–32

Smith, E. J., Jones, C. P., Bartlett, J. and Nestor, K. E. 1996 Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and Turkey. Poultry Science 75: 579–584.

Stepniak, E., Zagalska, M. M. and Świtónski, M. 2002 Use of RAPD technique in evolution studies of four species in the family Canidae. J. Appl. Genet 43(4): 489-499.

Şahin, E. 2005 Antalya yöresi Kıl keçilerinde genetik polimorfizmin Rapd-Pcr yöntemiyle belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı. Antalya

Whitkus, R., Doebley, J., Wendel, J.F., 1994 DNA- based markers in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531-6535.

Wei, R., Dentine, M. R. and Bitgood, J. J. 1997 Random amplified polymorphic DNA markers in crosses between inbred lines of Rhode Island Red and White Leghorn chickens. Animal Genetics 28: 291–294.

Wough, R., Powell, W., 1992 Using Rapd markers for crop improvement, Tibtech, 101, 186-191

Yen, N. T., Huang, M. C., Tai, C. 2001 Genetic variations of randomly amplified polymorphic DNA polymorphisms in Taoyuan and Duroc pigs. J. Anim. Breed. Genet. 118: 111–118.

Yongjun, L., Shilin, C., Ning M., Shuhong, Z., Yongxin, C. and Ciwandobuj, 1998 Random amplified polimorphic DNA study of Tibetan cashmire goat. Proceedings of 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, University of New England and Csıro, Armidale, Australia 24: 103–106.