T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜNEY KARAMAN KOYUN IRKINDA GENETİK POLİMORFİZMİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

İbrahim AYTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Konya, 2006

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜNEY KARAMAN KOYUN IRKINDA GENETİK POLİMORFİZMİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

İbrahim AYTEKİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu tez 21.07.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir

Prof. Dr. Saim BOZTEPE
(Danışman)

Doç. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI
(Üye)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÜNEY KARAMAN KOYUN IRKINDA GENETİK POLİMORFİZMİN RAPD-PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

İbrahim AYTEKİN
Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Saim BOZTEPE
2006, 68

Jüri: Prof. Dr. Saim BOZTEPE
Doç. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

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

RAPD-PCR, 8 erkek ve 8 dişi toplam 16 bireysel genotipte rasgele seçilmiş oligonükleotid primerler ile gerçekleştirildi. Bu primerlerden çoğaltılabilir ve skorlanabilir olan en uygun 10 primer seçilerek toplam 1451 DNA bandı elde edilmiştir. Bütün RAPD bantları 600-3000 bç (baz çifti) aralığında tespit edilmiştir. Toplam 147 fragmanın 133'ü polimorfik (%90.48) 14'ü monomorfik (%9.52) bulunmuştur. Populasyon içi ortalama genetik benzerlik (Bant Paylaşım Frekansı, Fxy) ve genetik uzaklık oranları sırasıyla 0.7009 ve 0.2991 olarak hesaplanmıştır. Ortalama heterozigotluk oranı 0.3273±0.1697 olarak tahmin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Güney Karaman koyun ırkı, polimorfizm, RAPD-PCR

ABSTRACT

Masters Thesis

DETERMINATION OF GENETIC POLYMORPHISM WITHIN GUNEY KARAMAN SHEEP-BREED VIA RAPD-PCR METHOD

İbrahim AYTEKİN

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Saim BOZTEPE

2006, 68

Jury: Prof. Dr. Saim BOZTEPE

Assoc. Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Asist. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

The objective of this research was to determine the genetic polymorphism within Güney Karaman sheep 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 carried out by using randomly primed oligonucleotide, for 8 male and 8 female individual genotypes. Among the primers tested, 10 most suitable ones, in terms of repeatability and scorability, were used and 1451 DNA bands were scored. All the RAPD bands were determined to be between 600-3000 bp (base pear) in size. From 147 fragments 133 were polymorphic (%90.48) and 14 fragments were monomorphic (%9.52). Within population avarage genetic similarity (Band Sharing Frequency, Fxy) and genetic distance were calculated as 0.7001 and 0.2991, respectively. The avarage expected heterozygosity was estimated as 0.3273±0.1697.
Key Words: Güney Karaman sheep-breed, polymorphism, RAPD-PCR

TEŞEKKÜR

Bana moleküler teknikler konusunda çalışma imkanını sunan ve her alanda önemli katkılarını gördüğüm danışmanım Sayın Prof. Dr. Saim BOZTEPE'ye, laboratuar çalışmalarımda desteğini ve bilgisini esirgemeyen, çalışmalarım ve tez yazım süresince her zaman bana destek olan ve görüşlerini aldığım Sayın Doç. Dr. Soner BALCIOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya, Arş. Gör. Kemal KARABAĞ'a ve Arş. Gör. Emine ŞAHİN'e, istatistiksel analizlerin yapılmasında katkısı olan Sayın Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca her zaman bana duyduğu güveni ve manevi desteğini hiç esirgemeyen eşime ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR……iii
İÇİNDEKİLER……iv
SİMGELER…… vi
ŞEKİLLER……viii
ÇİZELGELER……..…..ix
1. GİRİŞ ……....…….……1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....……..3
2.1. DNA Belirleyicileri...……...10
2.1.1. RFLP …….……..10
2.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu…….....11
2.1.2.1. Mikrosatellitler……..…….13
2.1.2.2. RAPD…….....14
2.1.2.3. AFLP..…….....…….……...…..15
3. MATERYAL VE METOT…….……...……...……26
3.1. Materyal …….……....26
3.2. Metot ……..26
3.2.1. Kan örneklerinin alınması ……..…26
3.2.2. DNA izolasyonu …….....26
3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması …….…….28
3.2.4. Kullanılan primerlerin seçimi……30
3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)……...31
3.2.6. Elektrolit çözeltisi ……..…32
3.2.7. Jelin hazırlanması ve dökülmesi ……...33
3.2.8. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi……..34
3.2.9. Jele yüklenen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi……..35
3.2.9. Jelin boyanması ve RAPD bantlarının elde edilmesi……35
3.2.10. RAPD bantlarının değerlendirilmesi ve genetik analizler…..……36

Sayfa No

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA……...……39
4.1. DNA İzolasyon Sonuçları…….39
4.2. Amplifikasyonlar……..……..39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER …….60
6. KAYNAKLAR ……62

SİMGELER

DNA	Deoksiribonükleikasit
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism - Restriksiyon Uzunluk Parça Polimorfizmi
AFLP	Amplified Fragment Lenght Polymorphism - Çoğaltılmış Uzunluk Parça Polimorfizmi
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA - Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Quantitative Trait Loci - Kantitatif Özellik Lokusları
SSR	Simple Sequence Repeat - Basit Tekrar Dizileri
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats-Değişken Sayılı Ardarda Tekrarlar
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region - Sekans Özgü Çoğaltılmış Bölge
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi
PCO	Principal Component Analysis - Temel Bileşen Analizi
DİE	Devlet İstatistik Enstitüsü
bç (bp)	Baz çifti
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
C	Sitozin
Taq	*Termus Aquaticus*
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
TE	Tris-EDTA
EDTA	Ethylendinitrilotetraaceticacid
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
kg	Kilogram
nm	Nonometre

µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
l	Litre
U	Ünite
OD	Optic Density
M	Molar
rpm	Rotation per minute-Dakikada döngü sayısı
d	Döngü
sn	Saniye
dk	Dakika
Tm	Melting Temperature-Bağlanma Sıcaklığı

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1. Güney Karaman koçu……...4
Şekil 2.2. RAPD-PCR yönteminde istenilen genin üssel çoğalımı ve aşamaları …. 12
Şekil 3.1. DNA İzolasyon Kiti……26
Şekil 3.2. Spektorofotometre……..29
Şekil 3.3. Eppendorf Master Gradient Thermal Cycler PCR cihazı……...32
Şekil 3.4. Jel tepsisi, çok dişli tarak ve donmaya bırakılmış agaroz jel……..34
Şekil 3.5. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi……...34
Şekil 3.6. Yatay elektroforez cihazı……....35
Şekil 3.7. Jel dokümantasyon sistemi……....36
Şekil 3.8. Üç bireye ait RAPD bantları……...…36
Şekil 3.9. Üç bireye ait RAPD bantlarının skorlaması……...37
Şekil 4.1. DNA izolasyonu yapılan 16 bireye ait DNA bantları……39
Şekil 4.2. 18 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……41
Şekil 4.3. 19 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……42
Şekil 4.4. Op15 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……43
Şekil 4.5. Opm10 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……....44
Şekil 4.6. Opp15 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……..…45
Şekil 4.7. Opq04 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……..46
Şekil 4.8. Opq06 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……..47
Şekil 4.9. Ra03 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……....48
Şekil 4.10. Ra35 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……..48
Şekil 4.11. Ra59 nolu primerin RAPD bant görüntüsü……..49
Şekil 4.12. Güney Karaman ırkı 16 koyunun 10 RAPD markörü bakımından UPGMA dendogramı…….……...…58
Şekil 4.13. Güney Karaman koyun ırkında RAPD markörleri bakımından PCO analizi……59

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 2.1. Türkiye mevcut koyun ırk ve tipler……..…….....5
Çizelge 3.4.1. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve bazı özellikleri…….30
Çizelge 4.1. Güney Karaman ırkı 16 koyunda 10 adet primer ile elde edilen bant sayısı ve aralıkları……..…….…..40
Çizelge 4.2. Kullanılan primerlere ait her bir lokus için gen frekansları …….....50
Çizelge 4.3. Kullanılan primerlere ait her bir lokus için heterozigotluk oranları....51
Çizelge 4.4. Güney Karaman ırkı 16 koyunun 10 adet RAPD markeri (belirteç) bakımından genetik benzerlik değerleri……...…...……..…..52

1. GİRİŞ

Bireylerin ve populasyonların genetik yapısının belirlenmesi, ortaya çıkarılan genetik yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, fonksiyonlarının anlaşılması ve diğer genlerle ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla tüm dünyada moleküler biyoloji ve genetik alanında çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir. Özellikle tıp, tarım, veterinerlik ve ormancılık alanlarında moleküler genetik teknolojileri geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Son yıllarda çiftlik hayvanlarında populasyonların genetik yapısının DNA düzeyinde belirlenmesi için moleküler tekniklerden faydalanılmaktadır. Moleküler genetik teknikleri sayesinde elde edilen bilgiler çiftlik hayvanlarında devrim niteliğinde yenilikler sağlamaktadır.

Ülkemiz gen kaynaklarını oluşturan çiftlik hayvanlarımızda klasik ıslah metodlarının yanında DNA düzeyinde bilgi veren moleküler teknikler oldukça fayda sağlamaktadır. Dolayısıyla sayı ve çeşitlilik bakımından büyük bir genetik potansiyele sahip olan çiftlik hayvanlarının moleküler teknikler ile DNA düzeyindeki varyasyonları belirlenerek, bunların tanımlanması, amaç doğrultusunda yetiştirme ve koruma programlarının hazırlanması önem taşımaktadır.

Türkiye'de küçükbaş hayvan populasyonları coğrafi olarak değişik bölgelere adapte olmuş ırk ve ekotiplerden oluşmaktadır. Genellikle morfolojik olarak bu populasyonlar birbirinden ayrılabilmektedirler. Ancak yetiştiriciler tarafından gerçekleştirilen kontrolsüz hayvan haraketleri ve melezlemeler neticesinde yerli gen kaynaklarımızda zaman zaman genotip karmaşası yaşanmakta ve gen kaynaklarımızda tahribatlar meydana gelmektedir. Böylece populasyonların morfolojik olarak sınıflandırılması zorlaşmakta ve bu türlü bir sınıflandırma hayvanlardan elde edilecek yararı düşürmektedir. Ayrıca genetik yapıları hakkında detaylı bir bilgi de vermemektedir. Populasyonların genetik yapılarının bilinmesi hem gen kaynaklarımızı oluşturan hayvan populasyonları hakkında daha kesin bilgiler sağlamakta hem de bu populasyonlar ile kültür ırkı hayvanlar arasındaki varyasyonun tespitini ortaya koymaktadır.

Yakın zamana kadar populasyonların genetik özelliklerinin tespitinde biyokimyasal markörler kullanılmış ve halen kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş ve bunların değişik alanlarda kullanımı hız kazanmıştır. Özellikle çiftlik hayvanlarında veya farklı türlerde genetik benzerliğin ve farklılığın tanımlanması, farklı ırk ve eko-tipler arasındaki genetik ilişkilerin tahmin edilmesi, yabani türlerin tespit edilmesinde, evrim çalışmalarında, genetik haritalamada, pedigri tayininde, embriyoda cinsiyet tayini ve türe özgü markör geliştirme gibi birçok alanda bu teknikler başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Yabancı ülkelerde konuyla ilgili çok sayıda çalışmalara rastlanırken ülkemizde konunun önemi yeni yeni kavranmaya başlanmıştır. Türkiye'de de sığırlarda (Güneren, 1999), Japon bıldırcınlarında (Yeğenoğlu, 1999), kıl keçilerinde (Şahin, 2005), balıklarda (Akhan ve Canyurt, 2005) ve manda (Soysal ve ark., 2005) da yapılmış sınırlı çalışmalar yanında araştırma aşamasında ve devam etmekte olan projelere de rastlanılmıştır.

Türkiye hayvancılığında sayısal olarak büyük bir potansiyele sahip olan koyun, gerek ırk gerekse tip bakımından geniş bir genetik çeşitliliğe sahiptir. Bu bakımdan Türkiye hayvan gen kaynaklarının belirlenmesi, korunması ve geliştirilmesi açısından yerli hayvan kaynaklarının DNA düzeyindeki varyasyonunun bir an önce belirlenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Bu sayede elde edilen bilgiler ile yetiştirme yönünün ve şeklinin tespit edilmesi ve amaç doğrultusunda bir yol izlenmesi yarar sağlayacaktır. Moleküler tekniklerden biri olan RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemi ile yapılan çalışmalar, türlerin genetik yapısını ya da tür bazında populasyon içi veya populasyonlar arasındaki genetik parametreleri tahmin etmede başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Bu bakımdan yerli gen kaynaklarını oluşturan koyun ırklarımızdan Güney Karaman koyun ırkının DNA düzeyinde genetik varyasyonunu tespit etmek amacıyla hem RAPD-PCR yönteminin kullanılabilirliğini ortaya koymak hem de bu populasyona ait DNA parmakizlerinin çıkarılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

İnsan gelişmesinin yapı taşlarından olan hayvansal proteinin başlıca kaynağı olan hayvancılık, ülkelerin tarım sektörü içinde önemli bir yer tutmaktadır. Dünya'da bir milyarın üzerinde sayısal varlığı ve 2000'den fazla koyun ırkı ile yetiştirilmekte olan ve ilk evcilleştirilen türlerden biri olan koyun, uzun yıllardan bu yana insanoğlu için önemli bir üretim unsurudur. Bu ırklardan yaklaşık 200 kadarının ekonomik olarak önem taşıdığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle koyun, hayvansal üretimde, dolayısıyla tarımsal üretimde ve ülkelerin ekonomilerinde önemli bir yere sahiptir (Akçapınar, 1994; Akman ve ark., 2001). Kaymakçı ve ark.'nın (2005) DİE 2002 yılı verilerine dayanarak bildirdiğine göre ülkemizde 25.174.000 adet koyun varlığı ile ülkemiz kırmızı et üretiminin yaklaşık % 18'ini ve süt üretiminin % 7,8'ini sağlamaktadır. Bu yapısıyla koyun yetiştiriciliği Türkiye ekonomisi için önemli bir yere sahiptir.

Koyun yetiştiriciliği genel olarak zayıf çayır meraları, nadas alanlarını ve bitkisel üretime uygun olmayan diğer alanları değerlendirerek et, süt, yapağı ve deri gibi ürünlere dönüştüren bir faaliyettir. Bunun yanında kolay tüketilebilir ve üretilebilir olması, kötü çevre şartlarına uyum yeteneğinin yüksekliği, idaresindeki kolaylıklar ve insana yatkınlığından dolayı koyun vazgeçilmez bir üretim unsurudur. Türkiye'de koyun yetiştiriciliği büyük ölçüde, ekonomik gücü ve ortak hareket etme becerisi düşük kesimlerce, ekstansif koşullarda yapılmaktadır (Akman ve ark. 2001). Bunun sonucu olarak yetiştiriciler arasında örgütsüz ve plansız bir yapı görülmektedir.

Türkiye'nin sahip olduğu değişik coğrafi yapısı ve iklim şatlarına bağlı olarak her bölgede ve o bölgenin şartlarına uyum sağlamış koyun ırk ve tipleri yetiştirilmektedir. Tipik kara iklimine sahip bölgelerde genellikle yağlı kuyruklu koyun ırkları yetiştirilir. Sahil kesimlerinde ve bu sahillere yakın olan ve nispeten yağışlı, ılık ve nemli bölgelerde ise yağsız uzun kuyruklu koyun ırkları yetiştirilir. Orta ve Doğu Anadolu bölgelerinde Akkaraman ve Morkaraman, Orta Anadolu'nun batı kesimlerinde ve Sakarya Nehri'nden Ege kıyı illerine kadar

olan yerlerde Dağlıç, Trakya ve Batı Anadolu'da sahile yakın yerlerde Kıvırcık, Güneydoğu Anadolu'da süt veriminin yüksekliği ile tanınan İvesi, Karadeniz kıyı şeridinde ve kıyı şeridine yakın kesimlerde Karayaka ırkı koyunlar yetiştirilir. İzmir Çeşme'de ve yer yer batı sahillerinde döl ve süt veriminin yüksekliğiyle tanınan Sakız ırkı, Çanakkale civarında İmroz (Gökçeada) ırkı, Kars civarında Tuj ırkı gibi ırklar dar sınırlar içerisinde yetiştirilen yerel koyun ırklarıdır. Merinos x yerli ırk melezlemesi ile geliştirilen Karacabey Merinosu ise Orta Anadolu'da yetiştirilmektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1996).

Karakoyun olarak ta bilinen Güney Karaman koyun ırkı Güney ve Güneybatı illerinde, özellikle Toroslarda yetiştirilen ve Karagül'e çok benzeyen yağlı kuyruklu bir ırktır. Renk siyahtan kül rengine kadar değişmektedir. Kuyruk Akkaraman ve Morkaraman'dakinden daha küçük, yapağı ve süt verimi onlarınkine yakındır. Kuzuların postları bukleli olup, iç kürk yapımında kullanılabilecek niteliktedir. Türkiye koyun varlığı içerisindeki payı ise çok düşüktür (Öztürk, 2000). Güney Karaman koyununun ülkemiz koyun varlığı içindeki sayısal varlığına ilişkin herhangi bir istatistiğe ulaşılamamakla birlikte, 50.000 kadar oldukça düşük seviyelerde olduğu tahmin edilmektedir. Şekil 2.1'de Güney Karaman koyun populasyonundan bir resim verilmiştir.



Şekil 2.1. Güney Karaman koçu

Türkiye koyun varlığının çoğunluğu ıslah edilmemiş yerli ırklar ve tiplerden oluşmaktadır. Sayı ve çeşitlilik bakımından büyük bir genetik potansiyele sahip olan koyunculuk, verimlilik göz önüne alındığında verim kapasitesi düşük

hayvanlardan oluştuğu bilinmekle beraber, verimlerine ait gerçek değerler de bilinmemektedir. Yalnız istatistiklerde kullanılan verim değerleri; koyun başına süt verimi için 50 kg, koyun başına karkas ağırlığı için 20–22 kg, kesilen kuzu başına karkas ağırlığı için 14–15 kg, yapağı verimi için de 1.5 kg civarındadır. Bu değerlerden yapağı verimi hariç, koyunlar için dikkate değer ölçüde düşük kabul edilebilecek değer yoktur (Akman ve ark. 2001). Ancak yetiştirici tercihlerinin zamanla değişmesi ve mevcut şartlarda daha fazla gelir elde edebilme gayesi için yetiştiriciler tarafından yüksek verim seviyelerinde genotipler kullanılarak sistemsiz ve plansız bir şekilde melezlemeler yapılmıştır. Dolayısıyla mevcut gen kaynaklarımızda zamanla tahribatlar olmakta ve muhtelif bölgelerde çok sayıda yerli ırk tehdit altına girmektedir.

Çizelge 2.1. Türkiye mevcut koyun ırk ve tiplerinin tehdit durumları (Anonim, 2006a)

Irk ve Tip	Yok olma tehdidi yok	Tehdit altında	Ağır tehdit altında	Yok olmuş
Akkaraman	X			
Morkaraman	X			
Güney Karaman		X		
Ulaş (Kangal) Akkaraman	X			
Dağlıç		X		
İvesi	X			
Herik		X		
Tuj		X		
Kıvırcık		X		
Karayaka	X			
Sakız			X	
İmroz	X			
Hemşin		X		
Ödemiş			X	
Karakaçan				X
Karakaş		X		
Çine Çapari		X		
Halkal				X
Norduz			X	

Çizelge 2.1'de Güney Karaman, Dağlıç, Herik, Tuj, Kıvırcık, Hemşin, Karakaş ve Çine Çapari tehdit altında, Sakız, Ödemiş ve Norduz ağır tehdit altında ve hatta yok olmuş koyun ırk ve tiplerimiz görülmektedir. Koyun yetiştiriciliğinde belirli

ırklarda ekonomik önemi olan verimler üzerinde yapılan seleksiyon ile zaman içerisinde genetik değişim sağlanarak gen kaynaklarımızı oluşturan yerli koyun ırklarında genotip karmaşası içine girilmiştir. Dolayısıyla mevcut gen kaynaklarımızda kayıplar olmakta ve bu genotipler yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalarak nesillerinin devamı tehlikeye girmektedir.

Geçtiğimiz yarım yüzyıl içerisinde Türkiye'de çiftlik hayvanları gen kaynakları bakımından kayıplar olduğu bilinmektedir. Bu durum; ekonomik, sosyal ve çevresel gelişmelerin hayvancılıkta farklı yerlerde çeşitli düzeylerde olmak üzere entansifleşmeyi zorunlu kılması, az girdi ile yetiştirilebilen, buna karşı düşük verimli olan yerli ırkların yerini kademeli ve hızlı bir şekilde kültür ırklarının almasının bir sonucudur. Buna Merinos koyunu, Leghorn tavuğu ve Siyah-Alaca sığırı örnek olarak verilebilir. Oysa yerli ırklar yüzyıllardır yetiştirile geldikleri çevrenin kendine özgü koşullarına çok iyi uyum sağlamış, verimleri düşük olsa bile özgün nitelikleri olan, dayanıklı, kanaatkâr, yetersiz çevre koşullarında üreyebilen hayvanlardan oluşur. Yerli ırkların yok olması, taşıdıkları ayırıcı özelliklerin de yok olması anlamına gelmektedir. Gelecekte bu özelliklerin hangisine gereksinim duyulacağını şimdiden tahmin etmek güç veya olanaksızdır. Kaldı ki bu gen kaynaklarının bugün saptanamamış olan olası özellikleri de ancak bunların varlıklarını sürdürebilmesi halinde elde tutulabilir (Ertuğrul ve ark., 2005). Yerli koyun ırklarımızdan biri olan Güney Karaman koyun ırkı da yok olma tehdidi altında bulunan bir koyun ırkımızdır. Bu sebeple Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından yayımlanan hayvancılığın desteklenmesi hakkında uygulama esasları tebliğinde (No: 2006/9) gen kaynaklarının korunması kapsamına alınan bir koyun ırkımızdır (Anonim, 2006a).

Yetiştiricisine ekonomik seviyede cevap verebilecek genotiplerin elde edilebilmesi için gelecek yıllarda entansifleşmeye bağlı olarak koyunculukta melezleme çalışmalarının daha yoğun bir şekilde devam etmesi muhtemeldir. Ancak burada yetiştiricilik yapılacak bölgenin coğrafi ve ekonomik şartlarına göre yetiştirme yönünün ve şeklinin belirlenerek amaca uygun koyun ırk ve tiplerinin seçimi önem taşımaktadır. Geçmiş yıllarda hayvansal üretimi artırmak için gelişmiş ülkelerdeki yüksek verimli hayvanlar getirilerek bunlardan basit ve kolay bir yol gibi

yararlanma şeklinin tercih edilmesi yapılan yanlışlığı açıkça ortaya koymuştur. Dolayısıyla gen kaynaklarını belirleyip, geliştirmek yerine daha kolay sonuç vereceği düşünülen genotiplerin populasyona dahil edilmesi şeklinde yapılacak uygulamalar koyun yetiştiriciliğinde olumsuzluklara neden olabilecektir. Gen kaynaklarımızın korunması genetik varyasyonun devamı için önemli bir konudur. Ülkemiz gen kaynaklarını oluşturan populasyonların genetik çeşitliliğini geleceğe taşımak kültürel, ekonomik ve bilimsel açılardan önem taşımaktadır. Bunu sağlarken klasik ıslah metotlarının yanında moleküler tekniklerden de yararlanmak fayda sağlayacaktır.

Bir populasyonu oluşturan bireylerin genetik, biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemlerle araştırılması, o populasyonun genetik yapısına ilişkin daha ayrıntılı ve kesin bilgilerin elde edilmesine olanak verir (Asal ve ark. 1996). Yerli koyun ırklarımızın ıslah çalışmaları başlatılırken her şeyden önce üzerinde durulan verim bakımından populasyonların genetik özelliklerinin iyi bir şekilde belirlenmesi ve bu özelliklerin tanımlananarak amaca uygun yetiştirme programlarının hazırlanması gerekmektedir. Bu şekilde yapılan bir uygulama ile mevcut olan bütün çevre şartlarında yetiştiricisine ekonomik olarak verim verebilecek en üstün genotiplerin belirlenmesi sağlanmış olacak ve gelecek generasyonlarda bunların populasyondaki nispi miktarını artırma gayesi başarıya ulaşacaktır.

Diğer türlere göre aynı tür içerisindeki hayvanlar daha az varyasyon göstermelerine rağmen, çeşitli karakterler yönünden bakılırsa birbirlerinden oldukça farklılıklar göstermektedirler. Bu sebeple koyun ırklarının tanımlanması, birbirleri ile olan ilişkileri ve farklılıkları konusunda morfolojik ve ölçülebilen özellikler konusunda günümüze kadar oldukça çok çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaktadır. Polimorfik biyokimyasal sistemlerin çoğunun erken yaşta saptanması, çevre etkilerinden etkilenmemesi, genel olarak kodominant kalıtım göstermesi ve polimorfik karakterler ile çeşitli verim özellikleri arasındaki ilişkilerin ırka özel olmasından dolayı genetik yapının tahmin edilmesinde oldukça yoğun bir şekilde kullanılmış ve halen kullanılmaktadır (Boztepe ve ark., 1993; Elmacı, 2001; Karabağ ve ark., 2002; Mert ve ark., 2003).

Polimorfizm, populasyonlardaki genetik dengenin bir ürünü olup; söz konusu bir populasyonda herhangi bir özelliğin 2 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 DNA nükleotid değişimlerine denir. Populasyon boyutunda düşünülürse, bir populasyonda iki ya da daha fazla alternatif fenotipin varlığı olarak tanımlanabilir (Anonim, 2006b).

DNA'daki yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve yerleşmeleri sonucunda meydana gelen polimorfizm fenotipik varyasyonun kaynağını oluşturmaktadır. Populasyonda mevcut varyansa sebep olabilecek faktörlerin belirlenerek bunların etkilerinin tespit edilmesi hayvancılıkta verimliliği artıracaktır. Hedrick'e (1985) göre, bir gen lokusunun polimorfik olabilmesi için, nadir allelin populasyondaki nispi frekansının en az 0.05 veya 0.01 olması gerekmektedir (Şahin, 2005).

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 (Beuzen ve ark., 2000). Populasyonlarda veya bireylerde bu varyasyonları tespit amacıyla son yıllarda DNA düzeyinde moleküler genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

Populasyonların genetik yapısının belirlenmesi, ortaya çıkarılan genetik yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, fonksiyonlarının anlaşılması ve diğer genlerle ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla tüm dünyada moleküler biyoloji ve genetik alanında çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir. Çiftlik hayvanlarında populasyonların genetik yapısının DNA düzeyinde belirlenmesi ve ıslah çalışmalarında marköre dayalı seleksiyon çalışmaları için moleküler teknikler kullanılmaktadır. Özellikle hayvancılıkta ekonomik öneme sahip, ölçülmesi pahalı ve güç olan kantitatif karakterlerde hayvanların fenotipine bakarak en iyi allelleri

taşıyan genotiplerin belirlenmesi oldukça güçtür. Bu gibi durumlarda ilgili allelleri taşıyan bireyleri DNA markerleri ile belirlemek için son yıllarda özellikle süt verimi, hastalıklara direnç ve döl verimi gibi kantitatif karakterler üzerinde oldukça yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Schnabel ve ark., 2005). Kantitatif karakterlerle ilgili genlerin kromozom üzerindeki spesifik yerlerini tanımlama amacıyla genetik markörlerden faydalanılmakta ve çiftlik hayvanlarında marköre dayalı seleksiyon programları yapılmaktadır. QTL analizinde sığır, koyun ve domuzda ticari ve deneysel amaçlı olarak kantitatif karakterlerin tespiti yapılmaktadır. Süt sığırlarında süt verimi ve süt komponentleri, et sığırlarında doğum ağırlığı, boynuz büyümesi, doğum öncesi gelişme ile koyunlarda döl verimi ve kas hipertrofisi ile ilişkisi olan markörler tespit edilmiştir (Davis ve DeNise, 1998). Bu çalışmaların başlıcaları ilişki analizi, bağlantı analizi ve genom taranması gibi çalışmalardır.

Herhangi bir karakteri determine eden gen veya genler ile diğer taraftan bu genin markörler ile de ilişkisi varsa, genlerin pleiotropik etkisinden yararlanılarak dolaylı seleksiyon kriteri olarak bu markörlerden fayda sağlanalabilir. Başka bir ifadeyle; kantitatif karakterleri belirleyen genler ile ilişkisi tespit edilen markörler arasında yüksek bir genetik korelasyonun tespit edilmesi durumunda damızlıkların erken yaşta seçilmesi mümkün olacaktır. Bu bakımdan marköre dayalı bir seleksiyon esasında genotipe dayalı olarak yapılacak ve zaman kazancından dolayı seleksiyonun etkinliği de artacaktır. Bu durum özellikle tek cinsiyette görülen karakterler (ineklerde süt verimi, tavuklarda yumurta verimi gibi) bakımından damızlık seçiminde isabeti artırarak çok yararlı sonuçlar sağlayacaktır.

Yaygın kullanılan moleküler biyoloji tekniklerinden birisi olan DNA Parmakizi analizleri (DNA Fingerprinting) ilk kez Jeffreys ve ark. (1985) tarafından Leicester Üniversitesi'nde insanlar üzerinde yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır. Canlılara özgü olan DNA nükleik asit diziliş farklılığından dolayı genetik yapının tahmin edilmesine yarayan moleküler metodlara DNA Parmakizi adı verilmektedir. DNA parçalarının elektroforez sonucunda oluşturduğu bantlara DNA parmak izleri denilir. 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 populasyonlarında genetik çeşitlilik ve akrabalığın belirlenmesinde, yabani formların araştırılmasında, evrim çalışmalarında ve gen haritalarının oluşturulması gibi çeşitli alanlarda sıkça kullanılmaktadır. Takip eden bölümde bu moleküler markör tekniklerinin yaygın kullanımına sahip en önemlileri ile ilgili çalışmalardan söz edilecektir.

2.1. DNA Belirleyicileri

Farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan belirteçlere DNA markörleri (DNA belirleyicileri) adı verilmektedir. Günümüze kadar yoğun olarak DNA Parmakizi analizinde kullanılan ve DNA'yı temel alan en önemli moleküler markörler Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Mikrosatelitler (Basit Tekrar Dizileri - SSR), Çoğaltılmış Fragman Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) metotlarıdır. Bu markörlerden restriksiyon enzimleri ile kesim esasına dayalı çalışan RFLP belirleyicileri hibridizasyon tabanlı, diğerleri ise polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR) yöntemine dayalı metodlardır.

2.1.1. RFLP

RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphisms*) analizi, dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan restriksiyon enzimlerince kesilmesi ile sonda olarak kullanılan DNA'nın melezlediği (hibridizasyon) DNA etrafındaki farklı kesim yerlerinin tespit edilmesi esasına dayanır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Genomik DNA'nın restriksiyon enzimlerince kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerinin jel elektroforezinde molekül büyüklüklerine göre ayrışması sağlanır. Daha sonra DNA jel ortamından daha kullanışlı olan naylon filtrelere/membranlara tek iplikçik halinde Southern transfer metoduyla transfer edilir. Filtreler bundan sonra çoğunlukla radyoaktif ^{32}P ile işaretlenmiş bir DNA sondası ile hibridize edilmekte ve görüntülenmektedir.

DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabileceğinden değişik restriksiyon enzimlerinin kullanımıyla farklı uzunlukta DNA parçaları meydana gelmektedir. RFLP tekniği, restriksiyon enziminin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini bile tanımaktadır. Tanıma yerinin baz dizilişi değişikliği, farklı genotipler arasındaki polimorfizmin bir sebebi olmakla birlikte bu polimorfizm daha yaygın olarak, nokta mutasyonu olabileceği gibi restriksiyon enziminin tanıdığı iki kesim bölgesi arasındaki parça eklenmesi (*insertion*) veya çıkmasından (*deletion*) da kaynaklanabilir.

RFLP markörlerinin farklı laboratuar şartlarına göre değişkenliğinin az olmasından dolayı güvenilir olmaları, çeşitli çalışmalara transferlerinin yapılabilmesi ve kodominant özellikte olmaları önemli avantajları arasındadır. Dezavantajları olarak RFLP analizinde Southern Blot hibridizasyonu ve radyoaktiviteye ihtiyaç duyulduğundan bu yöntem pahalı olmakta, zaman ve işgücü gerektirmektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

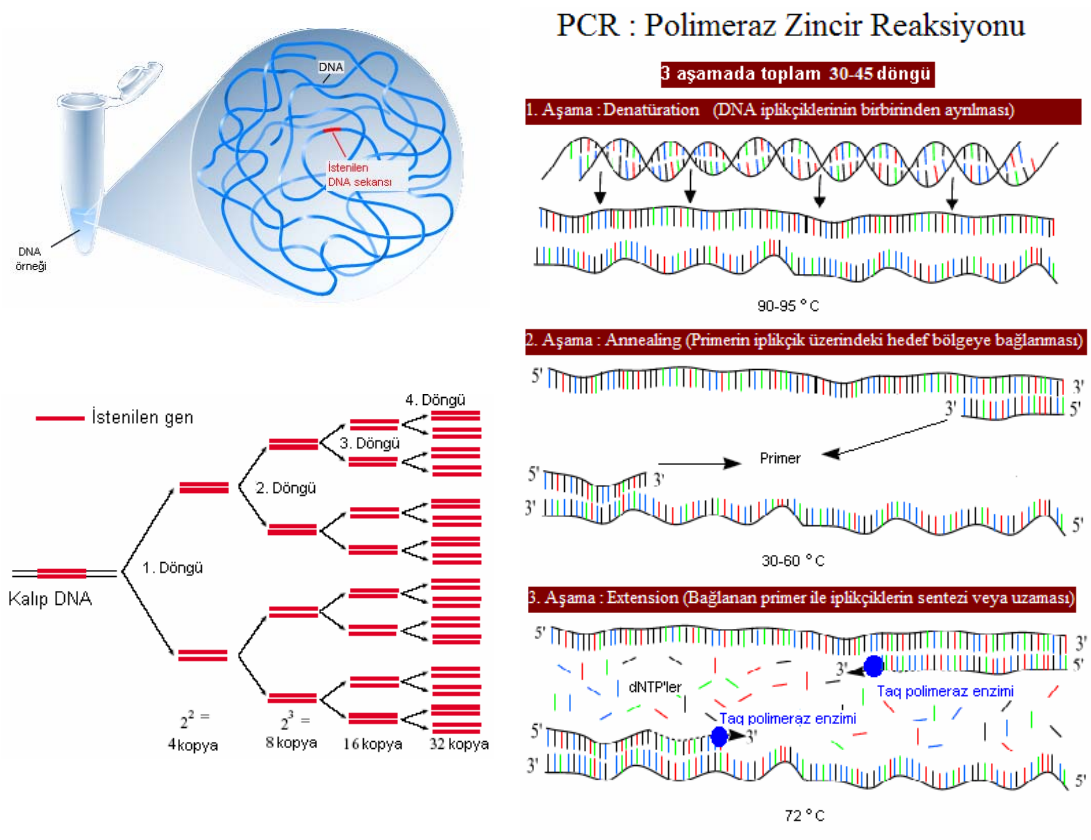
2.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

In vitro koşullarda, istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilebilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlamasına ek olarak, 1980'li yıllardan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu kullanılmaya başlanmıştır. PCR, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi PCR replikasyon sürecini taklit ederek bu olayı *in vitro* koşullarda gerçekleştirir (Arı, 2004).

PCR programı genel olarak 3 aşamada gerçekleşir (her döngünün 3 aşaması vardır). Bu aşamalar; ayrılma (*denaturation*): DNA iplikçiklerinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması, bağlanma/yapışma (*annealing*): Primerin hedef DNA zincirindeki komplementeri olduğu bölgelere yapışması, sentez/uzama (*extension*): *Taq DNA polimeraz* enzimi yardımıyla uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat ($dNTP_s$) varlığında yeni çift zincirli DNA'lar

oluşturacak şekilde primerin DNA zincirindeki 3’ ucundan zincirin 5’-3’ yönünde sentezlenmesidir. Sentez esnasında kullanılan DNA polimeraz enzimi genellikle yüksek sıcaklıklarda yaşayan bir canlı olan *Thermus aquaticus* mikroorganizmasından elde edilmektedir.

Bu şekilde optimizasyona bağlı ardı ardına 30–45 kez döngü gerçekleştirilir ve üssel olarak istenilen gen bölgesi çoğalır. Sonuç olarak DNA örneğinden çoğaltılmak istenen DNA zinciri döngü sayısına bağlı olarak 2^n sayıda çoğaltılır.



Şekil 2.2. RAPD-PCR yönteminde istenilen genin üssel çoğalımı ve aşamaları (Anonymous, 2006a)

PCR yöntemi ile çoğaltılan DNA parçaları daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülerek molekül büyüklüklerine göre ayrışırlar. Elektriksel alanda ayrışan DNA parçaları daha sonra Ethidium bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görünür hale gelirler (Williams ve ark., 1990; Kantanen ve ark., 1995; Ahmed Ali, 2003; Öz Aydın, 2004).

2.1.2.1. Mikrosatelitler

Mikrosatelitler, ökaryotik genomlar boyunca ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 sayıdaki nükleotid veya nükleotid gruplarının tekrarlarından oluşmaktadır (Beuzen ve ark., 2000). Bu yöntemde (CA)n, (GC)n, (GCC)n, (ATT)n gibi, ökaryotik genomların poliploidi düzeyine göre artış gösteren ve yüksek düzeyde polimorfizme yol açan, DNA tekrar dizinlerinin ürettiği bantlar esas alınmaktadır. Dolayısıyla di-, tri-, tetra-, penta-nükleotid gruplarına mikrosatelit adı verilmekte ya da Basit Tekrar Dizileri (Simple Sequence Repeat; SSR) olarak bilinmektedirler. Mikrosatelitler kodominant markörler olup temelde lokus-spesifiktirler. Genom boyunca mikrosatelitlere göre daha uzun bir çekirdek sekansın daha fazla sayıda tekrar ettiği dizileri oluşturan minisatelit adı da verilen Değişken Sayılı Ardarda Tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats; VNTR) da bulunmaktadır.

Yöntemin uygulanmasında belli lokuslardaki mikrosatelitlerin çalışması için primerlerin tasarlanması gerekmektedir. Genomdaki değişken tekrar dizilerinin önünde ve sonunda bulunan değişken olmayan sekans dizilerinin kullanılması ile bu gerçekleştirilir. Dolayısıyla söz konusu lokusların DNA sekans bilgilerine ihtiyaç duyulur. Bu da mikrosatelit parmakizi yönteminin en büyük dezavantajı olarak kabul edilir (Meghen ve ark., 1994). Ancak bir defa böyle bir lokusa ait primerler tasarlandığında, RFLP tekniğinin aksine, artık bu primer sekanslarını her isteyen araştırmacı kullanabilir, RFLP'de olduğu gibi sonda paylaşılması gerekmemektedir.

Kısaca mikrosatelit polimorfizmleri Cushwa ve ark.'nın (1996), Weber ve May 1989'dan bildirdiğine göre PCR ile çoğaltılan di- veya tri-nükleotid gruplarının çeşitli sayılarına dayanmakta ve jel elektroforezindeki farklı uzunluklarından belirlenmektedir.

Mikrosatelit parmakizi yöntemi çiftlik hayvanlarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur (MacHugh ve ark., 1998; Vanhala ve ark., 1998; Barker ve ark, 2001; Diez-Tascón ve ark., 2000; Stephen ve ark., 2001; Arora ve ark., 2001; Maudet ve ark., 2002).

Diez-Tascón ve ark., (2000) altı Merinos koyun ırkı (Spanish Mutton Merino, French Mutton Merino, German Mutton Merino, Portuguese Black Merino, Portuguese White Merino ve New Zealand Merino) içinde genetik varyasyonu belirlemek için 20 mikrosatelit kullanmışlardır. Spanish Mutton Merino, French Mutton Merino, German Mutton Merino, Portuguese Black Merino, Portuguese White Merino ve New Zealand Merino populasyonlarında heterozigotluk değerlerini sırasıyla 0.712, 0.679, 0.763, 0.703, 0.762, 0.735 olarak tespit etmişlerdir. Populasyon içi genetik benzerlik değerlerini ise sırasıyla, 0.315, 0.406, 0.386, 0.308, 0.330 ve 0.321 olarak belirlemişlerdir.

Stephen ve ark., (2001) 5 Tanzanya koyun eko-tipi (Arusha, Mwanza, Mtwara, Dodoma ve Coast) arasında genetik ilişkileri tespit etmek için 4 RAPD primeri ve 6 mikrosatellit kullanmışlardır. RAPD ile 30 adet polimorfik bant, mikrosatellit ile 198 adet polimorfik bant elde etmişlerdir. RAPD primerleri ile bu koyun ekotiplerinde ortalama heterozigotluk değerlerini 0.137-0.203 değerleri arasında tespit etmişlerdir.

Arranz ve ark., (2001) İspanya koyun ırkları içindeki ve arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla 18 mikrosatelit kullanmışlardır. Çalışmada İspanya koyun ırklarından Churra, Latxa, Castellana, Rasa-Aragonesa ve Merino ırkları ile referans olarak İvesi koyun ırkı üzerinde durulmuştur. Beş İspanya koyun ırkında lokus heterozigotluğu 0.63–0.86 değerleri arasında, ortalama olarak 0.77, İvesi koyun ırkında ise ortalama 0.75 olarak tespit etmişlerdir.

Arora ve ark., (2001) Hindistan'ın koyun ırklarından en yüksek canlı ağırlığına sahip olan Muzzafarnagri ırkı koyunların genetik yapısını belirlemek amacıyla 25 mikrosatellit kullanarak çeşitli genetik çeşitlilik parametrelerinden yüksek oranda genetik varyasyon belirlediklerini bildirmişlerdir. Bu parametrelerden Muzzafarnagri ırkı koyunların ortalama gözlemlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk değerlerini sırasıyla 0.6523 ve 0.6973 olarak tespit etmişlerdir. Ortalama polimorfizm oranını ise 0.6364 olarak bildirmişlerdir.

Soysal ve ark. (2005), Anadolu manda populasyonunun genetik yapısını belirlemek amacıyla çalışmalarında 11 sığır mikrosatellit lokusu kullanmışlardır. Çalışmada bu lokusların dört tanesinin Anadolu mandalarında polimorfik olduğunu bildirmişlerdir. Gözlenen heterozigotluk değerlerini (Ho) 0,550 ile 0,775 arasında, beklenen heterozigotluk değerleri (He) ise 0,494 ile 0,815 arasında hesaplanmışlar ve Anadolu Manda populasyonunun Hardy–Weinberg dengesinde olduğunu bildirmişlerdir.

2.1.2.2. RAPD

RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), ilk olarak farklı laboratuarlarda çalışan Williams ve ark. ile Welsh ve McClelland isimli iki araştırmacı grubu tarafından 1990 yılında türler arası ve türler içi akrabalığı ve genetik varyasyonu DNA düzeyinde belirlemek amacıyla eşzamanlı olarak geliştirilen bir yöntemdir. Rasgele primerler (9–10 bç uzunluğunda) kullanılarak genom içine tesadüfi dağılmış bölgelerin PCR ile DNA fragmentlerinin çoğaltılması temeline dayanan bir yöntemdir. Diğer PCR uygulamalarından farklı olarak hem kalıp DNA zincirinde hem de komplementeri olan zincirde DNA üretimi için sadece bir primer kullanılır. PCR ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütüldüklerinde bazı genotiplerde DNA bantları gözlemlenmekte bazılarında ise gözlemlenmemektedir. Bireyler arasında nükleotit dizilimi farkından oluşan ve bireye özgü olan bu bantlara RAPD bantları adı verilir. Bu bantların varlığı ve yokluğunda polimorfizm ortaya çıkar. Bantlar hepsinde var ya da hepsinde yoksa monomorfik kabul edilir. RAPD tekniğinde kullanılan primerlerin G+C oranının % 50–80 oranına sahip olması, herhangi bir palindromik dizi içermemesi ve birbirinin komplementeri olmaması gerekmektedir (Williams ve ark., 1990; Williams ve ark., 1993).

RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılan DNA parçaları daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülerek molekül büyüklüklerine göre ayrışırlar. Elektriksel alanda ayrışan DNA parçaları daha sonra Ethidium bromür ile boyandıktan sonra

ultraviyole ışık altında görünür hale gelirler (Williams ve ark., 1990; Kantanen ve ark., 1995; Ahmed Ali, 2003; Öz Aydın, 2004).

Bir birey, bandın yokluğunda resesif allel için homozigot, varlığında ise en az bir dominant allele sahip olmaktadır (Wei, 1997). Bu yüzden RAPD metodu ile bir lokusta elde edilen bantların homozigot ya da heterozigot olup olmadıklarını ayırmak mümkün olmadığı için RAPD dominant-resesif genetik markör olarak kabul edilir ve bireylerin genetik yapısının tanımlanmasında ve ebeveyn tespitinde kullanılır.

Diğer PCR uygulamalarına göre RAPD yönteminin uygulanması daha kolay, çabuk sonuç vermesi ve düşük maliyetli olduğundan daha çok tercih edilmektedir. Nanogram seviyelerinde az miktarda ve düşük kalitede DNA'nın yeterli olması, DNA sıralarına ilişkin ön bilgiye gereksinim duyulmaması da avantajları arasındadır. Ayrıca polimorfizm oranı da çok yüksektir (Bowditch ve ark., 1993; Kantanen ve ark., 1995; Öz Aydın, 2004). Ayrıca RAPD tekniğinde Southern transferine, DNA hibridizasyonuna ve radyoaktiviteye ihtiyaç duyulmamaktadır.

RAPD bantları mendel kalıtım yolunu izlemekte ve genomik DNA'da tek bir baz değişikliği bile RAPD yöntemi ile tespit edilebilmektedir. RAPD yöntemi; çeşitli türlerin gen haritasının çıkarılmasında, populasyon genetiği çalışmalarında ve bitki ve hayvan yetiştirme uygulamalarında kullanılabilir (Williams ve ark., 1990).

RAPD tekniğinin dezavantajları olarak farklı ekipman ve kimyasal malzeme ile tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve farklı laboratuarlarda farklı araştırıcılar tarafından değişik sonuçlar elde edildiği için güvenirliğinin düşük olduğu bildirilmektedir. Fakat RAPD tekniği laboratuar şartlarına göre otomasyona uygun bir yöntemdir (Tingey ve Tufo., 1993).

RAPD metodunun güvenirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen çok sayıda faktör vardır. Bu faktörler hedef DNA, $MgCl_2$ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denatürasyonu, primer karışımları gibi temel değişkenlerdir. Ayrıca

PCR'da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan materyal, 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 (Öz Aydın, 2004). Bununla birlikte RAPD yönteminin standart şartlarda, otomasyonu da devreye sokarak, çok başarılı sonuçları da bulunmaktadır.

RAPD tekniği moleküler biyoloji ve diğer bir çok alanda kullanılmak üzere, çiftlik hayvanlarında genetik benzerliğin ve farklılığın tanımlanması, farklı ırk ve eko-tipler 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, 2001), embriyoda cinsiyet tayini (Gutiérrea-Adán ve ark., 1997) ve türe özgü markör geliştirme gibi birçok alanda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. RAPD yöntemi sığır (Kantanen ve ark., 1995; Cerit, 2001), koyun (Kantanen ve ark., 1995; Cushwa ve ark., 1996; Tahmoorespur ve ark., 2003; Ahmed Ali, 2003; Paiva ve ark., 2005), keçi (Li ve ark., 2002; Şahin, 2005), tavuk (Smith ve ark., 1996; Wei ve ark., 1997; Sharma ve ark., 2001; Ahmed Ali ve ark., 2003), hindi (Smith ve ark., 1996), bıldırcın (Yeğenoğlu, 1999; Sharma ve ark., 2000), balık (Akhan ve Canyurt, 2005), arı (Suazo ve ark., 1998), at (Apostolidis, 2001) ve domuz (Yen ve ark., 2001) gibi çeşitli çiftlik hayvan türlerinde uygulama imkanı bulmuş ve RAPD'in potansiyel bir genetik markör olarak etkinliğini ortaya koymuştur. Aşağıda RAPD tekniğinin kullanıldığı bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Lee ve Chang (1994) insan, sığır, keçi, domuz, köpek, sıçan, tavşan, tavuk ve ördek gibi farklı türlerin tanımlanması amacıyla RAPD metodunu çalışmalarında kullanmışlardır. On nükleotidlik tek bir primer ve bir PCR programı kullanarak yaptıkları çalışmada bu türlere ait parmakizleri karşılaştırılarak tür tanımlanmasında basit, hızlı ve hassas bir metot olan RAPD-PCR yönteminin kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

Kantanen ve ark. (1995) nesli tehlikede olan Finlandiya evcil hayvan populasyonlarının (Yerli Doğu Fin sığırı, Kuzey Fin sığırı ve Fin Gri koyunu) genetik varyasyonunu belirlemek için 5 Finlandiya sığır ırkı (Yerli Doğu Fin Sığırı, Kuzey Fin Sığırı, Batı Fin Sığırı, Finlandiya Ayrshire ve Finlandiya Friesian) ile beyaz ve gri renk tipi olan 2 Finlandiya populasyonunda RAPD yöntemini kullanmışlardır. Sığır ırklarında 11 adet primer ile toplam 46 fragment elde etmişler ve bu primerlerden 3 tanesi ile 3 adet polimorfik bant elde etmişlerdir. Koyun populasyonlarında kullandıkları 13 primer ile 48 fragment ve bu primerlerden 5 tanesi ile 7 adet polimorfik bant elde etmişlerdir. Ayrıca çalışmada kullandıkları GCACTGAGTA primerinin Fin gri koyununa özgü olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmadaki sığır ırkları arasında ortalama genetik benzerliği 0.872–0.882 değerleri arasında, ırklar içinde ortalama genetik benzerliği ise 0.864-0.894 değerleri arasında tespit etmişler ve sığır ırkları arasındaki genetik benzerlik değerinin ırk içi genetik benzerlik değerine yakın olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmadaki koyun populasyonları sığır ırklarına göre daha düşük genetik varyasyon göstermiştir. Fin Beyaz koyun tipinde populasyon içindeki genetik benzerlik değeri 0.956 olurken, Fin Gri koyun tipinde bu değeri 0.906 olarak tespit etmişler ve koyun populasyonları arasında genetik varyasyonu 0.928 olarak bildirmişlerdir. Sonuç olarak koyun populasyonlarının sığır ırklarından daha çok homojenlik gösterdiğini ve sığır ırkları içinde ve arasında tespit edilen benzerlik değerinin daha önceden yapılmış olan kan grubu ve protein polimorfizminden önemli bir farkının olmadığını bildirmişlerdir.

RAPD tekniği ile yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılan primerler ile bazı türlerde diğer türlere göre daha fazla fragment üretildiğini, bunun sebebinin kullanılan primerlerin genom üzerinde farklı bölgelere yapışması sonucu türe özgü fragmentlerin daha yüksek frekanslara sahip olması olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte bazı türlerde elektroforez sonunda RAPD bantları gözlenirken diğer türlerde ya gözlenmemekte ya da farklı lokusta (bç) gözlemlenmektedir. Bunun sebebinin ise kullanılan primerin o türe özgü olduğundan ya da kullanılan primerler ile ilişkili olan benzer yada aynı genin genomlar üzerinde farklı formlarının olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Smith ve ark., 1996).

Smith ve ark. (1996), 4 tavuk ırkı (Araucona, Rhode Island Red, White Leghorn ve White Plymouth Rock) ile 2 hindi populasyonunda (rastgele yetiştirilen hindi populasyonu ve ticari hindi populasyonu) genetik ilişkileri ve çeşitliliği belirlemek amacıyla RAPD metodunu kullanmışlardır. Çalışmada 60 primer kullanmışlar ve bu primerlerden 42 adet primeri, çalışmada materyal olarak kullandıkları populasyonların en az birinde bir adet polimorfik bant verdikleri için, seçmişlerdir. Kırkiki adet primerden 10 adedinin türe özgü fragment verdiklerini, 6 adedinin ise populasyon içi ve arasında genetik ilişkiyi belirlemek için kullandıklarını bildirmişlerdir. 6 adet primer ile tavuk ırklarında bant paylaşım frekansından hesaplanan populasyon içi genetik benzerliği 0.70-0.83 değerleri arasında tahmin ederlerken, hindi populasyonlarında 0.73 ile 0.77 olarak bulmuşlardır. Türler arasındaki genetik uzaklığı türler içinden daha yüksek bulmuşlar ve RAPD tekniğinin farklı kanatlı populasyonları içinde ve arasında genetik ilişkileri belirlemek için etkin bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Cushwa ve ark., (1996) RAPD yöntemi ile 5 koyun ırkında (Coopworth, Merino, Perendale, Romney ve Texel) ve bu ırkların melezlerini koyun genomunun tanımlanmasında ve genetik haritalamasında polimorfik markörleri tespit etmek için toplam 131 adet primer denemişlerdir. Bu primerden 53'ünü kullandıklarında, polimorfizm oranını %65-%96 arasında, ortalama %85, olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta genetik bağlantı haritalarının oluşturulması ve polimorfizmi belirlemek için bu markörlerin kullanımıyla RAPD deneyinin güçlü bir uygulama olduğunu bildirmişlerdir.

Gutiérrea-Adán ve ark. (1997), koyunlarda ve keçilerde RAPD-SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) markörü 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.

Suazo ve ark. (1998) RAPD yöntemi ile Avrupa ve Afrika bal arıları arasındaki farklılığı tespit etmek amacıyla çalışmalarında toplam 700 primer kullanmışlar ve bu primerlerden 5 tanesinin arı populasyonlarını ayırt edebilmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Primerlerden birinin Avrupa bal arılarının alt türü olan Doğu Avrupa grubuna, iki primerin ise Afrika bal arı türüne özgü olduğunu bildirmişlerdir. Diğer iki primerin ise Afrika bal arı populasyonlarına nazaran Avrupa bal arı populasyonlarında daha yüksek seviyede frekansa sahip olduğunu, diğer bir ifadeyle Avrupa bal arı populasyonlarında daha fazla bant elde edildiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak RAPD yöntemi ile Avrupa ve Afrika bal arılarını ayırt etmek için türe özgü markörler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Koh ve ark., (1998) RAPD yöntemi ile kırmızı ete sahip yaban domuzu, evcil domuz, at, kanguru, bufalo, sığır, geyik, köpek, kedi ve tavşan türlerinin ayrımı için %G+C oranı 50-80 olan 29 adet farklı primer kullanmışlardır. Çalışma neticesinde kullanılan primerlerden bazılarının bu amaç için uygun olmadığını, bazılarının ise et orjininin hangi hayvan türüne ait olduğunu başarılı bir şekilde tespit ettiğini bildirmişlerdir.

Yeğenoğlu (1999), RAPD yöntemi ile Japon bıldırcınlarının (*Coturnix coturnix* japonica) DNA parmakizlerini çıkarmak amacıyla 8 primer kullanarak yaptığı çalışmada, bıldırcın populasyonu içindeki bu primerler bakımından genetik benzerliği 0.35, polimorfizm oranını ise 0.65 olarak tespit etmiştir.

Sharma ve ark. (2000), RAPD yöntemi ile 6 bıldırcın hattında (HBW-yüksek canlı ağırlığa sahip bıldrıcın hattı, WES-beyaz yumurta kabuğuna sahip bıldırcın hattı, KLQ, MTQ, JLQ ve SLQ) populasyon içi ve arası genetik çeşitliliği tespit edebilmek için toplam 6 primer kullanmışlar ve bu primerlerden 60 adet bant elde etmişlerdir. Altmış bandın 19'unun polimorfik olduğunu (polimorfizm oranı %31.7) bildirmişlerdir. Populasyon içi genetik benzerlik değerlerinin 0.749-0.815 arasında,

populasyonlar arası genetik benzerlik değerlerinin ise 0.709-0.808 arasında değişiklik gösterdiğini bildirmişler ve RAPD metodunun genetik ilişkileri belirlemek için etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Sharma ve ark. (2001) White Leghorn, Rhodes Island Red, Red Cornish, White Plymouth Rock tavuk ırkları ile yerli tavuk ırkı olan Kadaknath arasındaki genetik çeşitliliği tespit etmek amacıyla toplam 50 primeri çalışmada denemişler ve 12 primerin polimorfik bant verdiğini tespit etmişlerdir. Bu primerler ile hesaplanan populasyon içi polimorfizm oranı ve genetik benzerlik değerlerini 0.81—0.96 arasında tahmin etmişlerdir. Bant paylaşım oranından hesaplanan populasyon içi genetik benzerlik değeri en düşük olan tavuk ırkı Kadaknath (0.81) olurken, diğer kültür ırklarında populasyon içi genetik benzerlik değerleri daha yüksek bulunmuştur. En yüksek populasyon içi genetik benzerlik değerini ise White Leghorn tavuk ırkında (0.96) tespit etmişlerdir. Çalışmada ırklar arasında genetik benzerlikliği en yüksek olan ırklar Rhodes Island Red ile Kadaknath et ırkları arasında (0.945), en düşük olan ırklar ise White Leghorn ile Red Cornish ırkları arasında (0.778) tespit edilmiştir. White Leghorn tavuk ırkı ise diğer ırklar ile genetik benzerliği en düşük olan ırk olmuştur. Dolayısıyla RAPD tekniğinin çeşitli tavuk ırkları arasında polimorfizmi belirlemek ve populasyon çalışmalarında başarılı bir şekilde etkinliği olduğunu göstermişlerdir.

Yen ve ark. (2001), Taoyuan (T) ve Duroc (D) domuzları arasındaki genetik çeşitliliği ve Taiwan Siyah ticari domuz tipinin (TB; %75 T, %25 D) bu domuzlar ile olan genetik ilişkisini belirlemek için 71 primer ile RAPD parmak izi analizini çalışmalarında kullanmışlardır. Yetmişbir adet primerden 35 adedi T ve D domuzlarında, 22 adedi sadece T domuzunda, 12 adedinin ise D domuz populasyonlarında polimorfik bant verdiğini bildirmişlerdir. Bant paylaşım frekansından hesaplanan populasyon içi genetik benzerlik değerlerini T, D ve TB için sırasıyla 0.742, 0.747 ve 0.745 olarak tespit ederlerken, populasyonlar arası genetik benzerlik değerini T-TB arasında 0.946, D-TB arasında 0.953 ve D-T arasında ise 0.934 olarak bildirmişler ve TB domuzunun D'ye genetik bakımdan T'den daha çok benzediğini ifade etmişlerdir.

Li ve ark. (2002) 3 Shanxi yerli keçi ırkları (Bai, Hei ve Qing) arasında genetik ilişkiyi RAPD yöntemi ile tespit etmek amacıyla çalışmalarında 60 primer kullanmışlar ve bu primerlerden 8 primeri değerlendirilebilir bulmuşlardır. Bu primerler ile toplam 76 fragment elde edilmiş olup, 44 adet fragment keçi ırkları için polimorfik bulunmuştur. Dolayısıyla polimorfizm oranını 0.5789 (44/76) olarak tespit etmişlerdir. Keçi ırkları arasındaki genetik uzaklığı 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 kullanmışlardır. 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.

Ahmed Ali ve ark. (2003) RAPD tekniği ile 5 Mısır yerli tavuk hattında (Anshas, Silver Montazah, Mandarah, Baheij ve El-Salam) yumurta ve et verim özellikleri ile genetik benzerlik arasındaki ilişkileri tespit etmek amacıyla 6 oligonükleotit primer kullanarak çalışmışlardır. Çalışmada yumurta verim yönlü hatlar (Anshas, Silver Montazah, Mandarah) arasındaki genetik benzerliği 0.724-0.854 değerleri arasında, et verim yönlü hatlar arasındaki genetik benzerliği ise 0.869 olarak tespit etmişler ve RAPD metodunun tavuk hatları arasındaki genetik benzerliği ve ilişkileri belirlemek için kullanılabilecek potansiyel bir araç olduğunu bildirmişlerdir.

Ahmed Ali (2003) Mısır'da yetiştirilen 4 koyun ırkında (Barki, Rahmani, Baladi ve Suffolk) toplam 19 RAPD primeri denemiş ve bu primerlerden 5'inin polimorfik bant verdiği bildirilmiştir. Mısır'daki 4 koyun ırkı arasındaki genetik benzerlik

0,8190–0,9570 değerleri arasında bulunmuştur. Bu ırklardan Barki ve Rahmani (% 95,7) diğer ırklara nazaran genetik yakınlığı en fazla olan ırklar olmuştur. Genetik yakınlığı en az olan ırklar ise Baladi ve Saffolk (% 81,9) ırkları olmuştur. Bunun sebebi de Sufflok ırkının kültür ırkı olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

İlhak ve Arslan (2003) tarafından et ve et ürünleri orijininin tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerde (anatomik farklılıklar, duyusal analizler, doku yağlarının kimyasal özellikleri, histolojik farklılıklar, proteine dayalı testler ve serolojik testler) karşılaşılan güçlükler ve bazı dezavantajlar nedeniyle sığır, koyun, keçi ve yabani domuz etinin ayırt edilmesinde diğer yöntemlere nazaran daha doğru sonuç veren, basit ve hızlı, özellikle DNA'nın *in vitro* koşullarda kısa sürede çoğaltılmasını sağlayan RAPD-PCR yöntemi kullanmışlardır. RAPD-PCR yöntemiyle Koh ve ark., (1998)'nın kırmızı ete sahip 10 türün ayrımında kullandığı CGCCCTGGTC dizilimine sahip 10 bazlık bir primer kullanmışlardır. Sonuçta et ve et ürünlerinden türlerin orjininin belirlenmesinde bu primerin kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tahmoorespur ve ark. (2003), 5 İran koyun ırkında (Arman, Balouchi, Iranblack, Kordi ve Karakol) 17 RAPD primeri kullanmışlar ve bu primerlerden sadece 3 tanesinden (Moh-4, Moh-13 ve Moh-21) 10 adet polimorfik bant elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan markörler ile 5 İran koyun ırkı arasında ve içinde çeşitliliği çok düşük bulduklarını ve koyun ırkları arasındaki ve içindeki genetik ilişkiyi ayrıntılı bir şekilde belirlemek için daha çok primer ile daha çok çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmektedirler.

Akhan ve Canyurt (2005), RAPD-PCR yöntemi kullanarak üç farklı kuluçkahanedeki (Muğla-Fethiye, Burdur-Gölhisar, Denizli-Çameli) gökkuşağı alabalıkları (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1972) arasında genetik çeşitliliği belirlemek için 10 adet primer ile çalışmışlardır. Ancak populasyonlara göre değişmekle birlikte, kullanılan 10 primerden 2–3 primer değerlendirilebilir nitelikte bulunmuştur. Çalışmada üç populasyonda hesaplanan populasyon içi genetik benzerlik değerleri Fethiye, Çameli ve Gölhisar için sırasıyla 0.429, 0.311, 0.348 gibi

düşük seviyelerde tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Populasyonlar içi genetik farklılık ise sırasıyla 0.571, 0.689 ve 0.652 olarak bulunmuştur. Populasyonlar arası genetik farklılık değerlerini ise en yüksek Fethiye-Gölhisar populasyonları arasında, 0.752 olarak, en düşük ise Fethiye-Çameli populasyonları arasında, 0.659 olarak, belirlemişlerdir.

Paiva ve ark., (2005) 5 Brezilya kıl koyun ırkında (Santa Ines, Rabo Largo, Somali, Morada Nova ve Bergamasca) toplam 140 primer 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 5 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 (%) sırasıyla 0.3881, 0.3857, 0.4050, 0.3929, 0.3229 ve 100, 98.15, 98.15, 94.44, 90.74 olarak tespit etmişlerdir.

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.

2.1.2.3. AFLP

AFLP (*Amplified Fragment Lenght Polimorphism*) Vos ve ark. (1995) tarafından geliştirilen multilokus bir hibrit markör tekniğidir. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimi (*Mse*I ve *Eco*RI gibi) yardımı ile kesimi sonucu meydana gelen DNA parçalarının bir kısmının PCR ile selektif çoğaltımına dayanan bir genotipleme tekniğidir. AFLP tekniğinde, restriksiyon enzimi ile kesilen DNA segmentleri bu enzimler için hazırlanmış olan adaptörler ile ligasyona girer. Daha sonra adaptör bağlanmış restriksiyon ürünlerinin PCR ile çoğaltılması ve poliakrilamid jelde çoğaltılan parçaların analizi gibi 3 aşamada gerçekleştirilir.

Ajmone-Marsan ve ark., (2001) İtalya keçi populasyonunun genetik çeşitliliğini belirlemek amacıyla Bionda dell' Adamello, Frisa, Orobica, Verzaschese, Val di Livo ve Sarda ile referans olarak Sanen keçi ırklarında 7 AFLP primeri kullanmışlardır. Bu ırklar arasında en yüksek ortalama beklenen heterozigotluk değerini Sarda ırkında 0.24 olarak tespit ederlerken en düşük heterozigotluk değeri ise Orobica, Sanen, Val di Livo, Verzaschese ırklarında 0.21 olarak tespit etmişlerdir. Bu keçi ırkları içinde heterozigotluk değerleri bakımından önemli bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir. Keçi ırkları arasındaki genetik benzerliği ise 0.57-0.87 değerleri arasında ortalama 0.72 olarak belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Gen kaynaklarının muhafazası ve korunması kapsamında Bahri Dağdaş Uluslar arası Tarımsal Araştırma ve Uygulama Enstitüsü'nde yetiştirilmekte olan Güney Karaman koyun populasyonundan 8 erkek ve 8 dişi koyundan alınan kan örnekleri çalışmada kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

DNA izolasyonu için hayvanların boyun toplardamarından (*Vena jugularis*) Sodyum Sitratlı vakumlu kan alma tüpleri ve kanül kullanılarak alınan kan örnekleri soğuk zincirde korunarak (+4^{o}C) S.Ü. Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji laboratuarına en kısa sürede getirilmiş ve DNA izolasyonu yapana kadar derin dondurucuda –20^{o}C muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda mümkün olduğu kadar komponent sayısı az ve kan örnekleri arasında farklı sonuçlar vermeyecek bir yöntemin takip edilebilmesi için Bio Basic Inc., Kanada, DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Kullanılan DNA izolasyon kitinin içeriği ve resmi aşağıda verilmiştir.



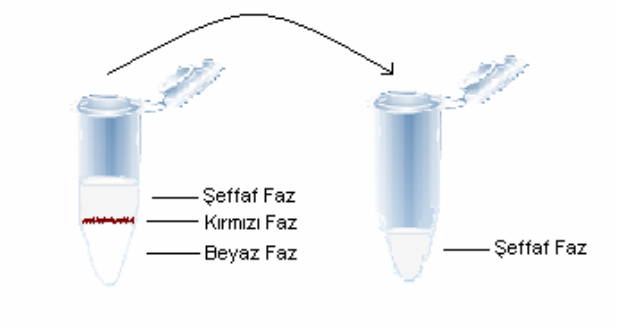
Şekil 3.1. DNA İzolasyon Kiti

- 25 ml TE Buffer
- 40 ml Cell Lysis Solution
- 60 ml Precipiatation Solution
- 20 ml 1.2 M NaCl
- 6 mg Proteinase K
- 3 mg RNase A

Proteinase K ve RNase A DNA izolasyonunda kullanılana kadar –20^{o}C'de, diğer komponentler ise oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Hayvanlardan alınan kan örnekleri DNA izolasyonunda kullanılmadan önce buz içerisinde çözdürülmüş ve aşağıda verilen aşamalara göre kit ile DNA izolasyonlarının hepsi aynı anda yapılmıştır. İzolasyon Kit'in prosedürüne bağlı olarak altta ifade edildiği şekilde yapılmıştır.

- 1.5 ml'lik *DNase* ve *RNase*-free ve steril mikrosantrifüj tüpüne (eppendorf) 300µl kan örneği konulmuş ve üzerine 600µl *Cell Lysis Solution* ilave edilerek hafif bir şekilde elde çalkalanarak karışımı yapılmış ve kısa bir süre (3-5 saniye) vorteksle çalkalanmıştır.
- 900µl'lik karışımın üzerine 5µl Proteinase K eklenerek, ayarlı su banyosunda 65^{o}C'de ara sıra tüpler alt üst edilerek 15dk inkübe edilmiştir.
- Daha sonra karışım üzerine 500µl kloroform eklenerek yaklaşık 10 saniye vorteksle çalkanandıktan sonra 12.500 rpm (*rotation per minute*, d/dk)'de santrifüj (Hettich marka) yapılmıştır.
- Santrifüjden alınan mikro tüpler içerisinde 3 faz oluşmuştur.



Her örnek için üst fazdan (şeffaf faz-süpernatant) yaklaşık 500µl alınarak yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılır. Kalan kısım mikrosantrifüj tüpü ile birlikte atılır. Yeni tüplere 500µl *Precipiatation Solution* (Çökeltme solüsyonu) ilave edilerek hafif bir şekilde dikey düzlem yönünde mikro tüpler ters çevrilmeden karışım yapılır. Bu aşamada DNA sarmalları solüsyon içerisinde beyaz bir renkte asılı şekilde gözlenmiştir.

- Mikro tüplerdeki solüsyon 2-5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3dk 12.500rpm'de santrifüj yapılır. DNA sarmalları bu aşamada pelet halinde tüplerin dibine çökmüştür.
- Üst kısım dikkatli bir şekilde döküldükten sonra tüplere 100µl 1.2M NaCl ilave edilmiştir ve tüpler içerisindeki DNA peleti tamamen çözülene kadar pipet ucu ile hafif bir şekilde pipetaj yapılmıştır.
- Pelet DNA tamamen çözüldükten sonra karışım üzerine 4µl *RNase* A eklenip 37^{o}C'de 13dk inkübe edilmiştir.
- Karışım üzerine -20^{o}C'de saklanan %99.5'lik alkolden 300µl ilave edilmiş, karışım vortekslenip -20^{o}C'de 10dk bekletilmiştir.
- Daha sonra 3-4dk 10.000rpm'de santrifüj edilerek DNA tüplerin dibine çöktürülüp tüplerdeki alkol dikkatli bir şekilde yavaşça dökülmüştür.
- Tüplerdeki DNA'lar %70'lik soğuk alkol ile tekrar yıkanarak 4dk 12.500rpm'de santrifüj yapılmıştır. Alkol dikkatli bir şekilde tekrar dökülüp tüpler ağzı açık bir şekilde yatay konuma getirilerek alkolün ortamdan buharlaşması için oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- Sonra 100µl TE tamponu (*Tris-EDTA Buffer*) tüplere ilave edilerek DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır.
- Tüplerin kapaklarının ağzı buharlaşmayı engellemek için parafilm ile sarılarak kullanıma kadar stok olmaları amacıyla -20^{o}C'de derin dondurucuya kaldırılmıştır.

DNA izolasyonu sonunda tüplerdeki DNA'ların parçalanmadan yeterli miktarlarda elde edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla %1'lik agaroz jel elektroforezinde DNA'lar yürütülmüş ve olumlu sonuç alınmıştır.

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 260nm'deki okuma değerine göre (Optik Density=OD), miktarının hesaplanmasına dayanmaktadır. Sambrook ve

ark.'nın (1989) 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 40µg/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 (Anonymous, 2006b). Dolayısıyla bu maddelerin ortamda mevcudiyeti PCR uygulamasının verimini düşürmektedir.

Çalışmada 100µl steril 1xTE tampon çözeltisinde çözülen DNA'ların konsantrasyonları 260 ve 280nm dalga boylarında (OD_{260}/OD_{280}) spektrofotometre ile okunmuş ve konsantrasyonları steril saf su ile 20ng/µl olacak şekilde eşitlenmiştir. Bu örneklerden eşit miktarlarda % 1'lik agaroz jelinde (1 x TE tamponunda) yürütülerek konsantrasyonlarının eşitliği gözle de gözlenmiş ve DNA'ların parçalanmamış oldukları belirlenmiştir. Şekil 3.2'de spektrofotometrenin resmi verilmiştir.



Şekil 3.2. Spektorofotometre

3.2.4. Kullanılan primerlerin seçimi

Çalışmada kullanılacak olan primer sayısının mümkün olduğu kadar çok olması arzulanır. Ancak araştırma olanaklarına göre primer seçimi maliyeti etkilemektedir. 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 10 adet primer seçilerek RAPD analizleri için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ve primerler ile ilgili bazı bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve bazı özellikleri

Primer Adı	Primer Uzunluğu	Baz Sırası (5'→ 3')	Bağlanma Sıcaklığı Tm (^{o}C)	G+C Oranı (%)
18	10	GGG CTA GGG T	34	70
19	10	ACC GGG AAC G	34	70
Op15	10	GAC GGA TCA G	32	60
Opm10	10	TCT GGC GCA C	34	70
Opp15	10	GGA AGC CAA C	32	60
Opq04	10	AGT GCG CTG A	32	60
Opq06	10	GAG CGC CTT G	34	70
Ra03	10	CGA TCG AGG A	32	60
Ra35	10	AAG CTC CCC G	34	70
Ra59	10	CGG GCA ACG T	34	70

Başarılı bir PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için primerlerin bağlanması aşamasındaki Tm değerinin hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

Bağlanma Sıcaklığı Tm (^{o}C) = [(A+T'lerin sayısı)x2 ^{o}C + (G+C'lerin sayısı)x4^{o}C]

Genel olarak çalışmada kullanılan primerler 10 baz çifti uzunluğunda ve bağlanma sıcaklıkları (Tm) 32-34^{o}C 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)

Kullanılan PCR protokolü Şahin'in (2005) Flaman ve ark., (1994), Suazo ve ark., (1998) ile Öz Aydın, S.'den (2004) bildirdiğine ve Ahmed Ali'ye (2003) göre optimize edilerek PCR uygulaması yürütülmüştür.

PCR tüplerine (0.5ml'lik) DNA izolasyonu sonucunda elde edilen her biri 20ng/µl olacak şekilde eşitlenen DNA örneklerinden 1'er µl olacak şekilde ilave edilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan moleküler biyoloji hassasiyetindeki kimyasallar ve miktarları aşağıda verilmiştir.

1X'lik PCR reaksiyon karışımı	Miktar (µl)
Steril distile su	14.0µl
10x Buffer pH: 8.5 (48.4 g Tris base, 10.22 ml Glacial Asetik asit, 20 ml EDTA pH 8.0)	2.5µl
25mM $MgCl_2$	2.5µl
$dNTP_s$ (2.5 mM her birinden)	4.0 µl
Primer	0.5 µl
Taq Polimeraz (Taq Bioron 5 U/ml)	0.5 µl

Reaksiyonlar toplam 1µl DNA + 24µl karışım (mix) olacak şekilde 25µl hacimde ince çeperli *RNase* ve *DNase*-free PCR tüplerinde yapılmıştır. PCR uygulamaları Eppendorf Master Gradient Thermal Cycler marka cihazda yürütülmüştür. Cihazın kapak sıcaklığı 102^{o}C ve blok sıcaklığı 94^{o}C olacak şekilde PCR programı ayarlanmıştır. Bu uygulamanın amacı PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemektir. Her bir 0.2ml'lik PCR tüplerine 1'er µl DNA ilave edilerek karıştırılmış ve cihaza yerleştirek 94^{o}C'de 2 dk ön ısıtmaya (hot start) tabi

tutulmuştur. Daha sonra, yukarıda reaksiyon içeriği (master mix) verilen karışımdan ön ısıtmaya tabi tutulan PCR tüplerine 24µl ilave edilmiş ve toplamda 25µl karışım elde edilmiştir.

Amplifikasyonlarda kullanılan reaksiyon koşulları ise; 2 dakika 94^{o}C'de ön ısıtmadan sonra 3 aşamada gerçekleşen PCR programında reaksiyonlar, ayrılma (denatürasyon) aşamasında sıcaklık 94^{o}C'de 50sn, bağlanma/yapışma (annealing) aşamasında 33^{o}C'de 55sn ve uzama/sentez aşamasında ise 72^{o}C'de 50sn'den meydana gelen toplam 40 döngü uygulanmış ve son olarak tüpler 72^{o}C'de 5dk bekletilerek çalışmalara başlanmış ve kullanılan primerlere bağlı olarak sıcaklık ve zaman dilimlerinde bazı optimizasyonlara gidilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kısaca santrifüj edildikten sonra elektroforez işlemi gerçekleşene kadar kapakları parafilm ile sarılarak +4^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Şekil 3.3'de Eppendorf Master Gradient Thermal Cycler PCR cihazının resmi verilmiştir.



Şekil 3.3. Eppendorf Master Gradient Thermal Cycler PCR cihazı

3.2.6. Elektrolit çözeltisi

Elektroforez tankının içine konulacak elektrolit sıvısı olarak genellikle TAE (Tris-Acetate-EDTA) ve TBE (Tris-Boric asit-EDTA) çözeltileri kullanılır. Bu çalışmada TAE çözeltisi elektroforezde tampon çözelti olarak kullanılmıştır. 50X yoğunlukta pH 8.0 olacak şekilde stok solüsyon hazırlayıp 1l distile suda çözdürülmüştür. Bu stok çözeltiden ihtiyaç duyuldukça 20ml alınıp 1l distile suda

çözdürülerek 1X yoğunlukta TAE çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Bu tampon hem elektroforez tankına konulacak çözelti olarak hem de agarozu eritmek için kullanılacak çözelti olarak kullanılmıştır.

50X'lik TAE Tampon Çözeltisi	Miktar
Tris base	242.0 g
Glacial Asetic Asit	51.1 ml
EDTA (0,5M, pH 8.0)	100.0 ml

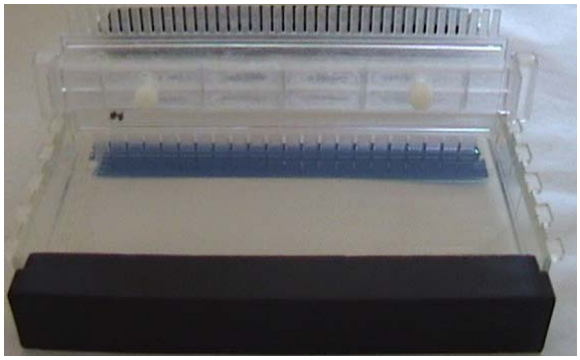
Tampon çözeltisi kullanılırken dikkat edilmesi gereken nokta, elektroforez tankına konulacak çözelti ile agarozu eritmek için kullanılacak çözeltinin aynı olması gerekliliğidir.

3.2.7. Jelin hazırlanması ve dökülmesi

PCR işlemlerinin tamamlanmasından sonra RAPD yöntemi ile çoğaltılan DNA örneklerinin elektroforetik ayrımı için agaroz jel (Bio Basic Inc.) kullanılmıştır. PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jelinde yürütülmüştür.

Jel hazırlanırken agaroz, erlen mayerde TAE tampon çözeltisi içinde yüksek sıcaklıkta 300–305^{o}C'de bir mikrodalga fırın içinde 2–3dk kaynatılarak eritilmiştir. Kaynama esnasında yaklaşık 10–20 sn'de bir çözelti sallamak suretiyle şeffaf bir görünüm kazanıncaya kadar karıştırılmıştır.

Eriyik jel tepsi içine dökülmeden önce DNA örneklerinin yükleneceği kuyucukların oluşması için çok dişli bir tarak tepsi üzerindeki yuvasına yerleştirilmiştir. Daha sonra soğutulan eriyik jel kalıbında ve tarakların bulunduğu bölgelerde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek tepsiye dökülmüştür. Jel donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılarak elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Daha sonra jelin üst kısmını kapatacak kadar hazırlanan TAE elektrolit çözeltisinden dökülmüştür. Şekil 3.4'deki resimde jel tepsisine yerleştirilmiş olan taraklar ve donmaya bırakılmış jel gözükmektedir.

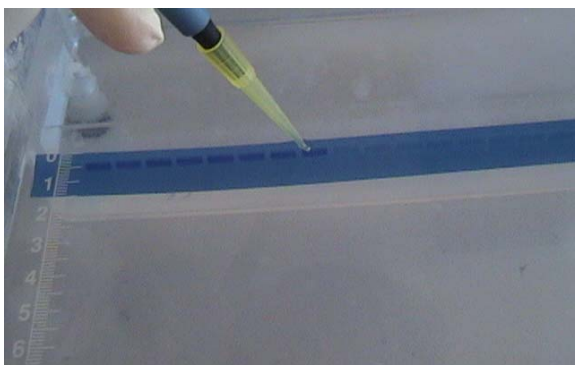


Şekil 3.4. Jel tepsisi, çok dişli tarak ve donmaya bırakılmış agaroz jel

3.2.8. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi

PCR cihazı ile çoğaltılan DNA örneklerinin jelde yürütülebilmesi, takibi ve elektrolit çözeltisi ile karışmasının önlenmesi amacıyla Loading Dye (Yükleme boyası) adı verilen yükleme çözeltisi hazırlanmıştır. Elektroforez uygulanacak olan her bir PCR ürününden 15µl alınıp yeni tüplerde hazır bulunan her biri 3µl 6X yükleme çözeltisi ile mikro pipet ucu yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra karışım jelde hazır bulunan kuyucuklara yüklenmiştir. Loading Dye hazırlamada kullanılan kimyasal maddeler ve oranları aşağıda verilmiştir. Şekil 3.5'deki resimde PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi görülmektedir.

6X'lik Loading Dye
% 25'lik Bromophenol Blue
% 25'lik Xylene Cyanol
% 30'luk Glyserol (suda)



Şekil 3.5. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi

RAPD bantlarının jelde molekül büyüklüklerine göre yürüdükleri bant aralığını (baz çifti) tespit edebilmek için standart olarak *DNA Moleculer Weight Marker* (100 bp *Ladder, AMRESCO*) kullanılmıştır. DNA örnekleri jele yüklenirken markörden de 3 µl alınıp 1 µl 6X yükleme çözeltisi ile karıştırılarak ilk kuyucuğa yüklenmiştir.

3.2.9. Jele yüklenen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi

Jel kuyucuklarına yüklenen PCR ürünlerini elektrik akımı olan ortamda birbirlerinden ayırmak için yatay elektroforez cihazında 75V'da 2.5-3 saat ara sıra kontrol edilerek yürütülmüştür. Kontrolün sebebi jelin bitiş noktasına kadar PCR ürünlerinin yürümesini engellemektir. Şekil 3.6'daki resimde yatay elektroforez cihazı görülmektedir.

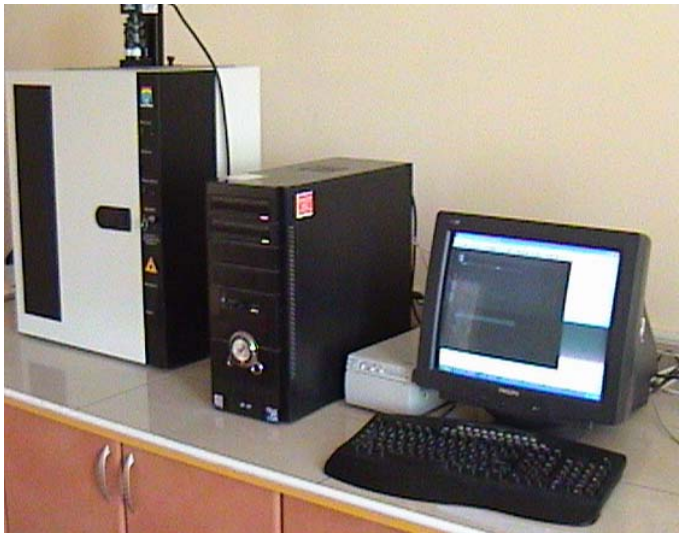


Şekil 3.6. Yatay elektroforez cihazı

3.2.10. Jelin boyanması ve RAPD bantlarının elde edilmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için jel elektroforezden çıkarılmıştır. DNA'ların UV ışığı altında gözlemlenebilmesi için jel 0.5µg/ml Ethidium Bromür çözeltisinin içinde 15–25 dakika bekletilerek ethidium bromürün jele nüfus etmesi sağlanmıştır. Daha sonra, jel çözelti içerisinden alınarak, RAPD bantlarına ilişkin fotoğraflar jel dokümantasyon sisteminde transilüminatör yardımı ile 254nm dalga boyundaki UV ışığı altında elde edilmiş ve

veriler elektronik ortamda saklanmıştır. Şekil 3.7'deki resimde jel dokümantasyon sistemi verilmiştir.



Şekil 3.7. Jel dokümantasyon sistemi

3.2.11. RAPD bantlarının değerlendirilmesi ve genetik analizler

RAPD bantlarına ilişkin fotoğraflar jel dokümantasyon 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. Değerlendirmenin nasıl yapıldığı bir örnekle açıklanacak olursa;

Lokus No	Marker	A	B	C
1	___	___	___	
2	___	___	___	___
3	___	___		___
Toplam Bant sayısı		3	2	2

Şekil 3.8. Üç bireye ait RAPD bantları

Şekil 3.8'de jel dökümantasyon sisteminde elde edilmiş 3 bireye ait RAPD bantları görülmekte ve bunların skorlanmaları Şekil 3.9'da görülmektedir. Bunlara ilaveten polimorfik/monomorfik bantlar da gösterilmiştir.

Lokus No		Marker	A	B	C	
1	___	1	1	0		←Polimorfik bant
2	___	1	1	1		←Monomorfik bant
3	___	1	0	1		←Polimorfik bant
Toplam Bant Sayısı			3	2	2	

Şekil 3.9. Üç bireye ait RAPD bantlarının skorlaması

Elde edilen bu veri matriksi ile bireyler arasında genetik benzerlik oranı, polimorfizm oranı, heterozigotluk değerleri ve gen frekansları gibi istatistikler NTSYS-pc ve POPGEN programları ile hesaplanmıştır.

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

$$Fxy = 2\,Mxy / (Mx + My)$$

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 sayısı olmaktadır.

Ortalama heterozigotluk (H) değerinin hesaplanmasında aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Nei, 1987).

$$H=\Sigma h/r$$

Formüldeki; r: Lokus sayısı,

h: Beklenen tek lokus heterozigotluğu olup aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$h=1-\Sigma X_i^2$$

X_i^2: homozigot genotiplerin oranlarıdır.

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

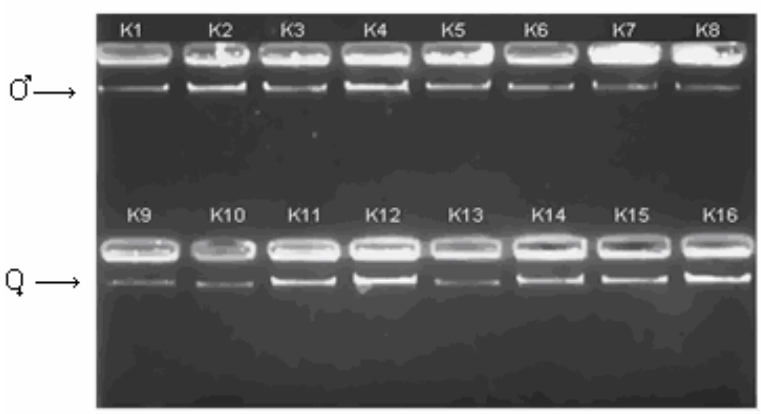
$$\text{Polimorfizm oranı: } \frac{\text{Polimorfik bant sayısı}}{\text{Toplam bant sayısı}}$$

Bunlara ilaveten NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi) genetik analiz programında bireyler arasındaki genotipik yakınlığı gösteren dendogram ve Principal Component Plot (PCO) elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyon Sonuçları

Çalışmada kullanılan kanlar Konya Bahri Dağdaş Uluslar arası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde gen kaynaklarının muhafazası ve korunması kapsamında yetiştirilmekte olan Güney Karaman koyun populasyonundan 8 erkek ve 8 dişi hayvandan sağlanmıştır. Koyunlardan DNA izolasyonu sonunda elde edilen tüplerdeki DNA'ların yeterli miktarlarda elde edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla %1'lik agaroz jel elektroforezinde DNA'lar yürütülmüş ve olumlu sonuç alınmıştır. Şekil 4.1'de DNA izolasyonu yapılan 16 bireye ait DNA bant fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 4.1. DNA izolasyonu yapılan 16 bireye ait DNA bantları

4.2. Amplifikasyonlar

On adet primer kullanılarak 16 hayvana ait RAPD-PCR bantları elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ile Güney Karaman ırkı 16 koyunda elde edilen her bir primere ait bant sayısı ve aralıkları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Güney Karaman ırkı 16 koyunda 10 adet primer ile elde edilen bant sayısı ve aralıkları

Primer Adı	Bant Aralığı (bç)	ERKEK BİREYLER								DİŞİ BİREYLER								Toplam Bant Sayısı
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
18	700-3000	8	8	3	7	6	7	8	8	8	8	8	8	8	8	5	8	116
19	700-3000	13	10	9	12	5	9	11	8	12	12	10	9	8	6	11	10	155
Op15	600-3000	12	10	12	11	10	9	4	4	9	12	14	4	8	12	9	8	148
Opm10	800-3000	10	0	7	9	4	8	10	3	9	7	10	8	9	10	11	9	124
Opp15	600-3000	11	4	0	11	11	12	13	8	12	10	14	12	12	5	14	11	160
Opq04	700-3000	16	12	14	15	13	12	14	11	16	16	14	12	12	15	13	12	217
Opq06	600-3000	1	9	12	12	8	10	5	12	15	13	9	13	9	9	14	9	160
Ra03	800-3000	9	9	10	10	11	12	7	7	11	10	12	10	8	11	8	9	154
Ra35	900-3000	7	0	6	6	0	7	8	6	7	7	7	7	7	7	7	7	96
Ra59	900-3000	7	6	6	11	8	10	6	3	9	10	7	6	6	10	9	7	121
Toplam Bant Sayısı		94	68	79	104	76	96	86	70	108	105	105	89	87	93	101	90	**1451**

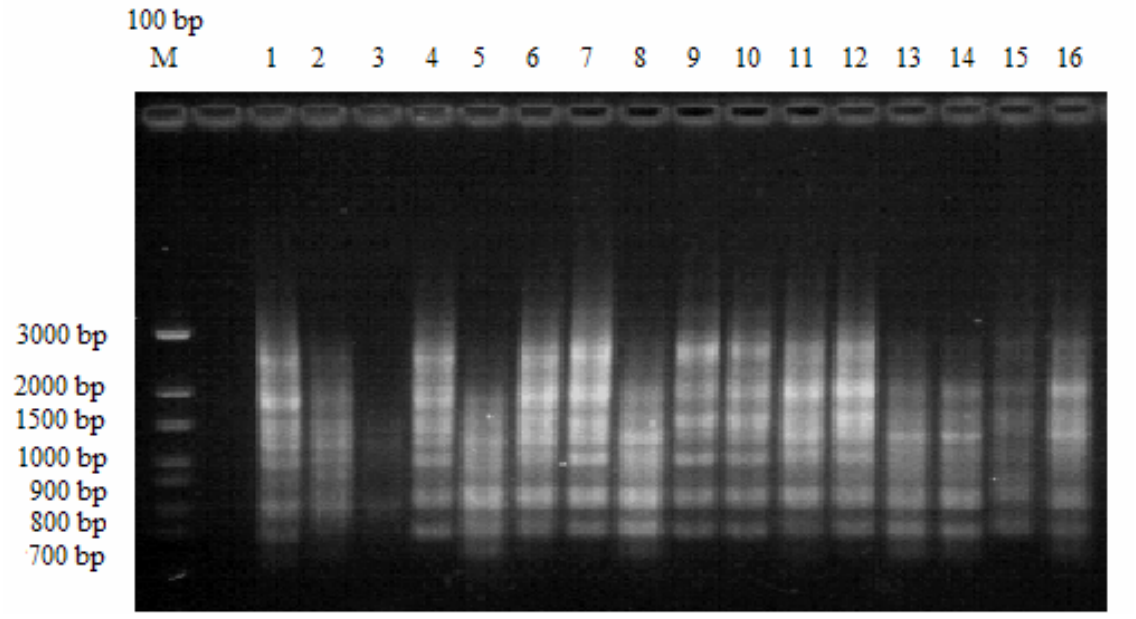
Çizelge 4.1'den görüleceği gibi kullanılan 10 adet primer ile elde edilen bantlar genel olarak 600-3000 bç aralığında görüntü vermiştir. Bu bantların 673 tanesi erkek bireylerde 778 tanesi de dişi bireylerde olmak üzere toplamda 1451 bant elde edilmiştir. Kullanılan 10 adet primer ile üzerinde çalışılan bireylerin lokusları yüksek oranda polimorfizme sahip olmuştur ve daha fazla farklı lokusların taranmasını gereksiz kılmıştır. Her bir primerden elde edilen bant sayıları dikkate alındığında Opq04 primeri 217 ile en fazla bant veren primer olurken, Ra35 ise 96 ile en az bant veren primer olmuştur.

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 ve principal component plot (PCO) oluşturulmuştur.

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'den de görüleceği gibi toplam 147 lokusun (fragman) 133'ünün polimorfik olduğu 14'ünün monomorfik olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen polimorfizm oranı %90.48 olarak tespit edilmiştir. Kullanılan tüm primerlere ait skorlanabilir bantlar incelendiğinde Opm10, Opp15, Opq06 ve Ra35 primerleri polimorfizm yüzdesi en yüksek olan (%100) primerler olmuştur. Polimorfik lokuslarda Nei'ye (1987) göre hesaplanan heterozigotluk oranları genel olarak 0.0615-0.5000 değerleri arasında değişiklik göstermiş olup, ortalama heterozigotluk oranı 0.3273±0.1697 olarak hesaplanmıştır. Bireyler arasındaki genetik benzerlik ortalama 0.7009, genetik uzaklık ise 0.2991 olarak tahmin edilmiştir (Çizelge 4.4).

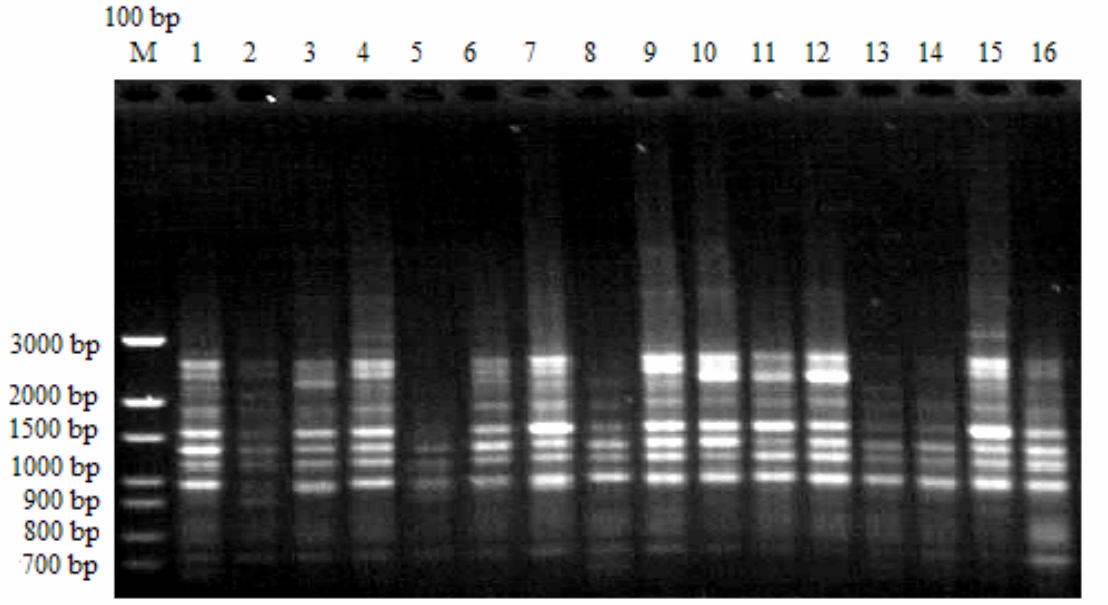
Aşağıda Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 ile ilgili açıklamalar ve araştırmada kullanılan 10 adet primerden elde edilen RAPD-PCR bantlarına ilişkin bazı fotoğraflar verilmiştir.



Şekil 4.2. 18 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 den görüleceği gibi 18 primeri ile 700-3000 bç aralığında toplam 10 bant elde edilmiştir. Bu bantların 9 tanesi polimorfik

bulunmuştur. Bantlardan 1 tanesi de bütün bireylerde ortak görüntü verdiğinden monomorfik olduğu saptanmıştır. Sekiz bant ile en fazla bant sayısına 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ve 16 nolu bireyler sahip iken, 3 bant ile en az bant sayısına 3 nolu birey sahip olmuştur. En yüksek frekans 1. lokusta (0.8660) ve en düşük frekans 5, 6 ve 9. lokuslarda (0.2500) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı ise 2. lokusta (0.4747) görülmektedir. Dolayısıyla en yüksek varyasyon bu lokusta olmaktadır (Çizelge 4.3).

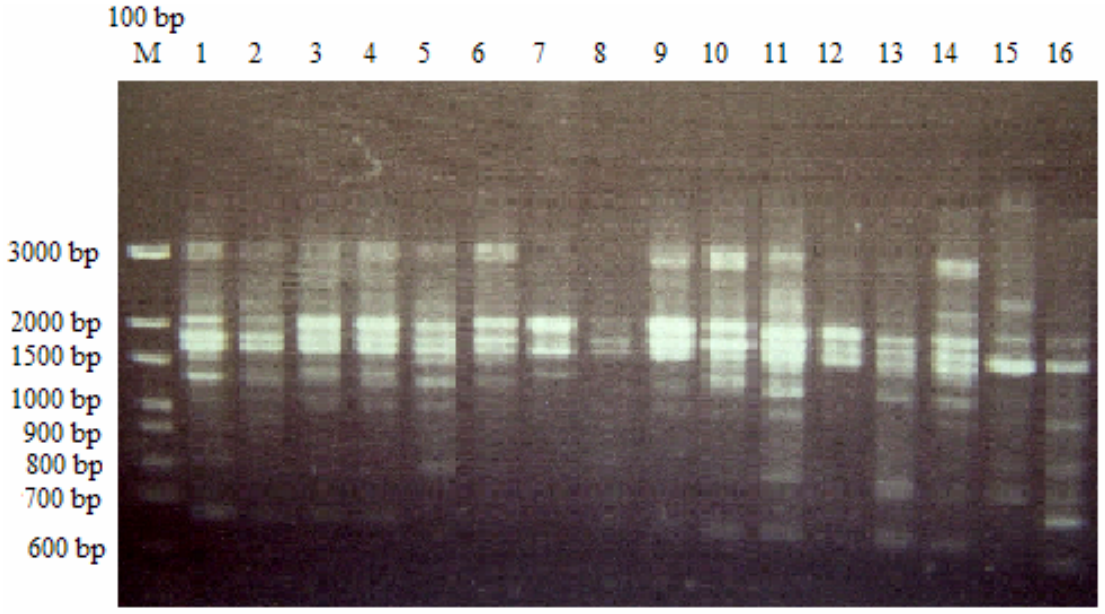


Şekil 4.3. 19 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

19 nolu primer ile ortalama olarak 700-3000 bç aralığında toplam 16 bant elde edilmiştir. Bu bantların 12 tanesi polimorfik 4 tanesi de monomorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 13 bant ile 1 nolu birey sahip olurken, 5 bant ile en az bant sayısına 5 nolu birey sahip olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek frekans 14. lokusta (0.9682) ve en düşük frekans 8. ve 9. lokuslarda (0.2500) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı 4. ve 7. lokuslarda (0.5000) görülmektedir (Çizelge 4.3).

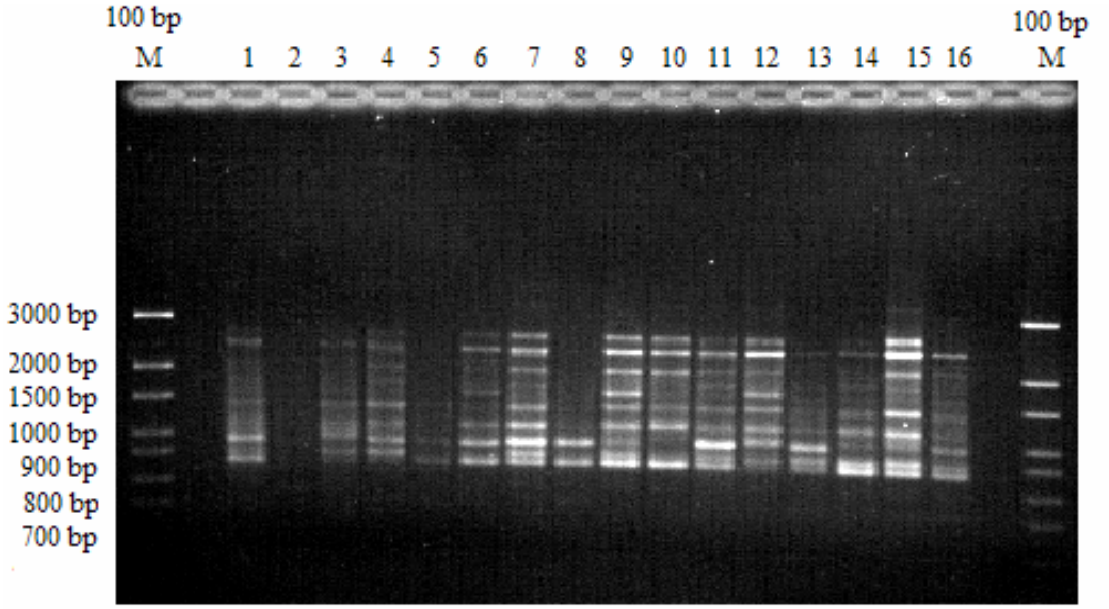
Ahmed Ali (2003) Mısır'da yetiştirilen Barki, Rahmani, Baladi ve Suffolk koyun ırklarında genetik benzerliği tespit etmek amacıyla toplam 19 primeri çalışmada denemiştir. Bu primerlerden 5 tanesi polimorfik bant vermiştir. Kullanılan 18 ve 19

nolu primerler Ahmed Ali'nin (2003) çalışmasında da kullanılmıştır. Ancak 18 ve 19 nolu primerler 4 Mısır koyun ırkında hiç polimorfik bant vermemelerine karşılık bu çalışmada bireylerin genotiplerinin tanımlanmasında etkili olarak kullanılabileceği sonucu çıkmıştır.



Şekil 4.4. Op15 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

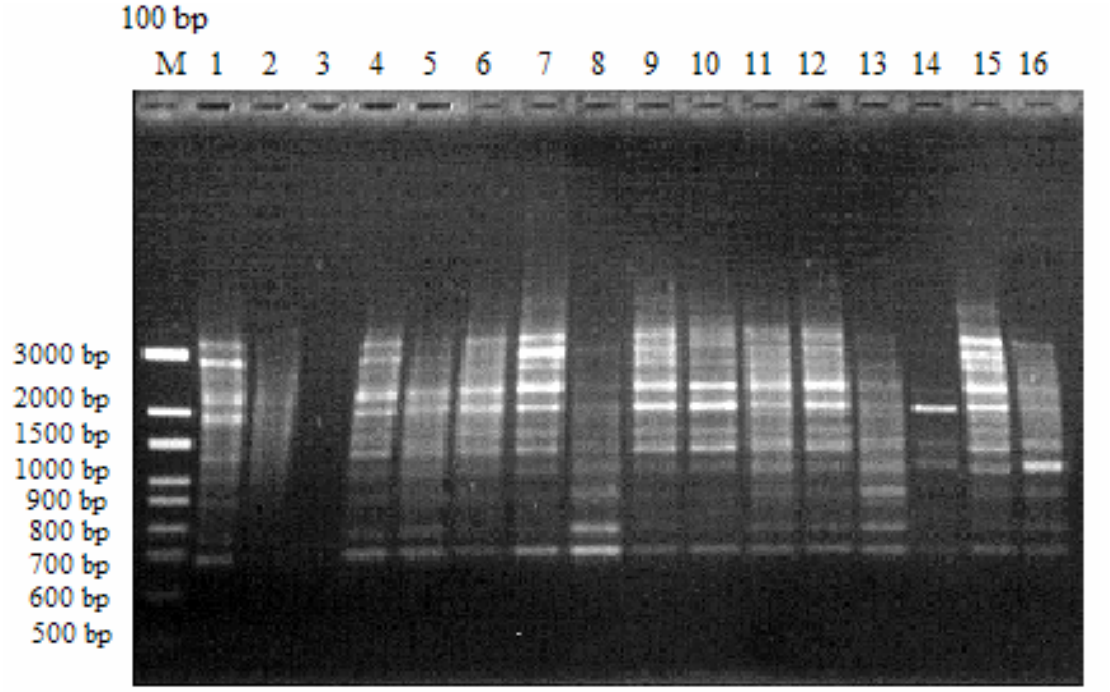
Op15 primeri ile 600-3000 bç aralığında toplam 17 bant elde edilmiştir. Bu bantların 15 tanesi polimorfik 2 tanesi de monomorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 14 bant ile 11 nolu birey sahip olurken, en az bant sayısına 4 bant ile 7, 8 ve 12 nolu bireyler sahip olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek frekans 1. ve 16. lokuslarda (0.9682) ve en düşük frekans 8. lokusta (0.3536) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı 2. ve 17. lokuslarda (0.4930) görülmektedir (Çizelge 4.3). Dolayısıyla varyasyonun en yüksek olduğu lokuslar 2. ve 17. lokuslardır.



Şekil 4.5. Opm10 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

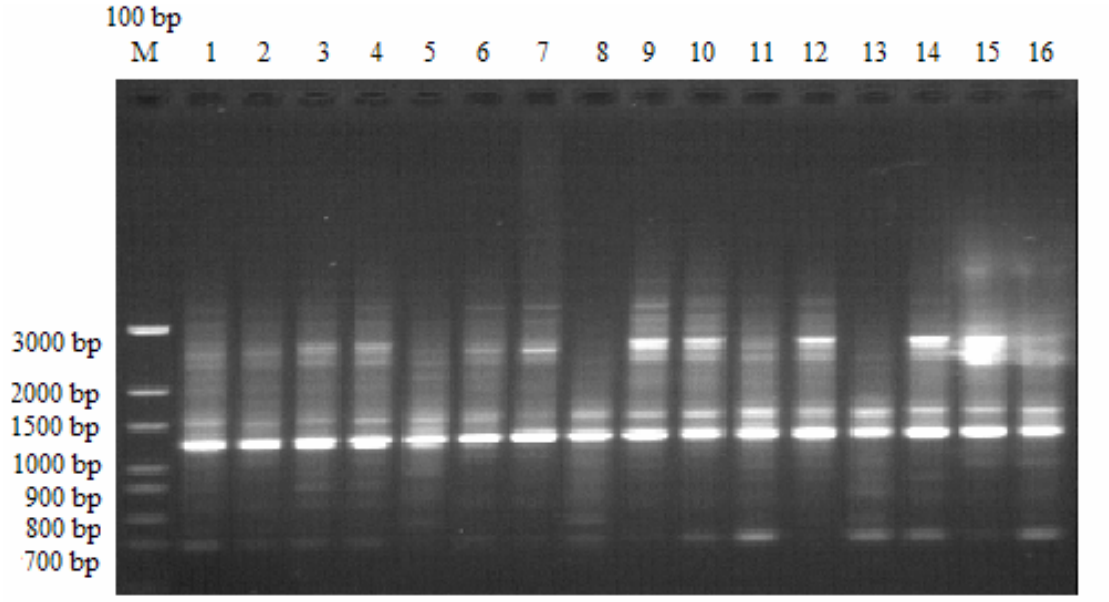
Opm10 primeri kullanılarak 800-3000 bç aralığında toplam 12 bant elde edilmiştir. Bu bantların tümü polimorfik bulunmuştur. En fazla bandı 11 bant sayısı ile 15 nolu birey vermiştir. En az bandı 3 bant sayısı ile 8 nolu birey vermiştir. İki nolu birey ise hiç bant vermemiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek frekans 1. lokusta (0.9682) ve en düşük frekans 7. ve 10. lokusta (0.2500) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı 6. ve 12. lokuslarda (0.5000) belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Sharma ve ark. (2001) 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 kullandığımız Opm10 ile Opp 15 primerleri Sharma ve ark.'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.



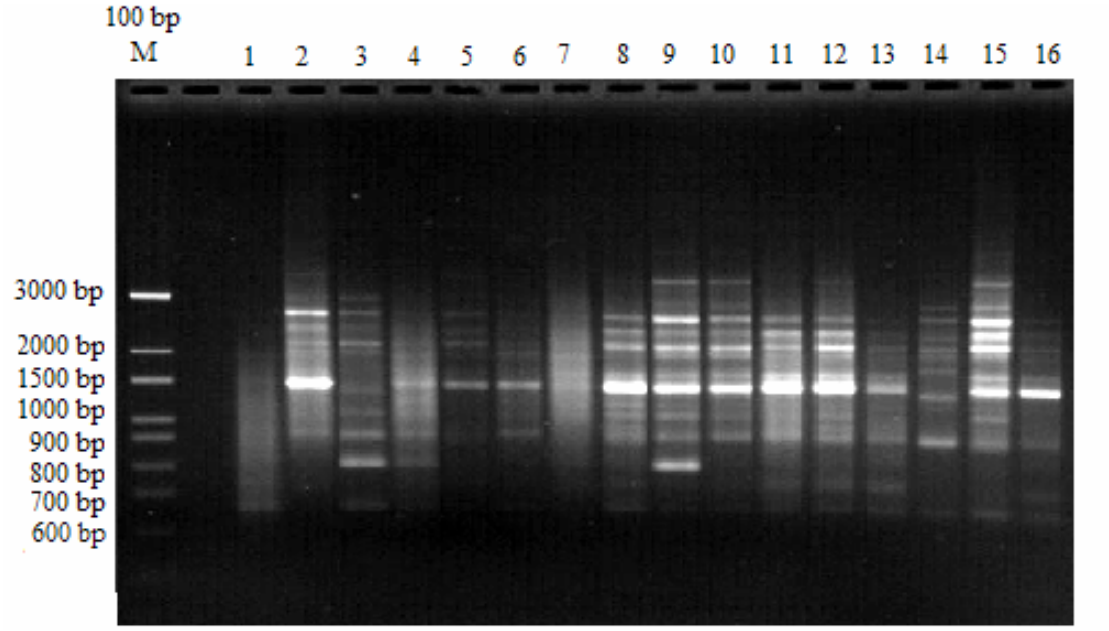
Şekil 4.6. Opp15 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Opp15 primeri ile 600-3000 bç aralığında toplam 15 bant elde edilmiş ve bu bantların hepsi polimorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 14 bant ile 11 ile 15 nolu bireyler sahip olurken, 3 nolu birey hiç bant vermemiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Ayrıca toplamda 11 bant ile 1. ve 4. bireyler aynı lokuslarda benzer bantlar vermişlerdir. Aynı şekilde 12 bant sayısı ile 6. ve 12. bireylerden de aynı lokuslarda benzer bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.6). En yüksek frekans 2. ve 13. lokuslardan (0.9014) elde edilirken, en düşük frekans ise 6. ve 7. lokuslarda (0.2500) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı 3., 4. ve 12. lokuslarda (0.5000) görülmektedir (Çizelge 4.3).



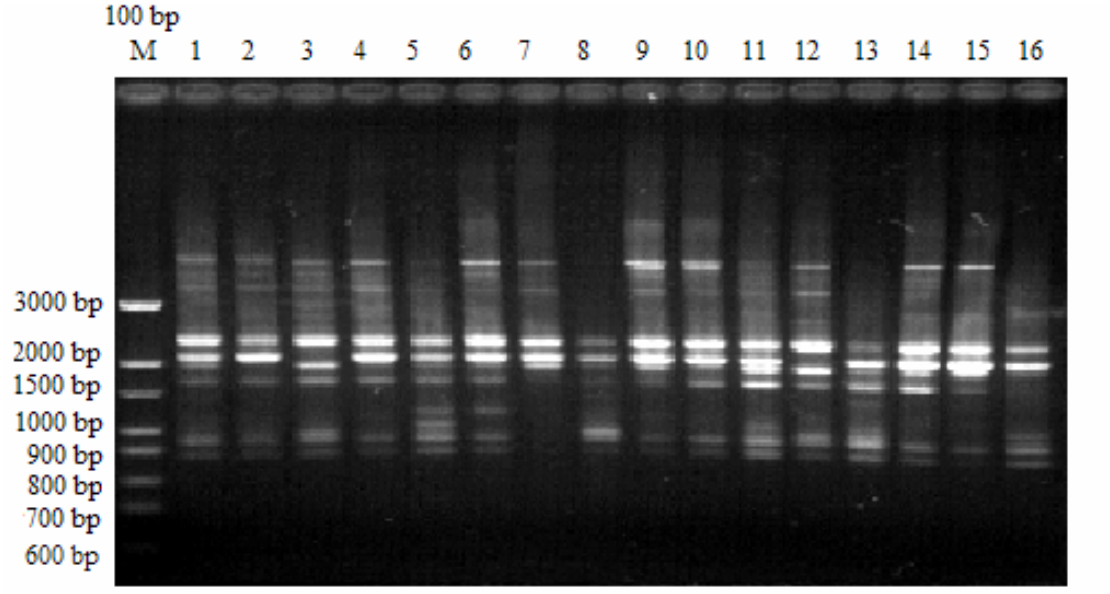
Şekil 4.7. Opq04 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Opq04 primeri ile 700-3000 bç aralığında toplam 18 bant elde edilmiştir. Bu bantların 14 tanesi polimorfik 4 tanesi de monomorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 16 bant ile 1, 9 ve 10 nolu bireyler sahip olurken, 11 bant ile en az bant sayısına 8 nolu birey sahip olmuştur. Ayrıca bütün primerlerin mevcut genotiplerde verdikleri toplam bant sayıları ele alındığında Opq04 primeri 217 bant sayısı ile en çok bant veren primer olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek gen frekansı 1. lokusta (0.9354) ve en düşük frekansı 13., 16. ve 18. lokuslarda (0.2500) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı 15. lokusta (0.5000) görülmektedir (Çizelge 4.3). Şekil 4.7'den de görüleceği gibi 9. ve 10. bireyler (16 bant) benzer lokuslarda aynı bantları vermişlerdir. Şekil 4.7 ve Çizelge 4.3'den de görüldüğü gibi 7., 9., 10. ve 12. lokuslar bütün bireylerde monomorfik bulunmuştur.



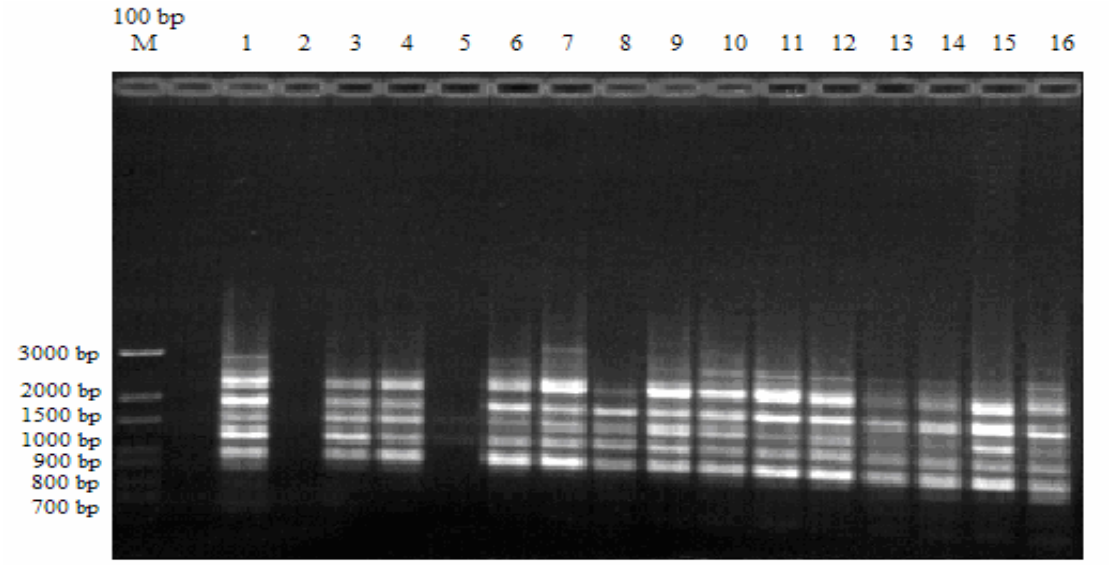
Şekil 4.8. Opq06 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Opq06 primer ile 600-3000 bç aralığında toplam 19 bant elde edilmiştir. Bu bantların hepsi polimorfik bulunmuştur. Ayrıca en fazla polimorfik lokus sayısına sahip primer olmakla birlikte Opm10, Opp15 ve Ra35 primerleri ile polimorfizm %'si en yüksek olan (%100) primerlerdendir. Bütün primerler dikkate alındığında Opq04 primerinden sonra Opp15 ile birlikte mevcut genotiplerde ikinci en fazla toplam bant sayısına sahip (160) primer olmuştur. En fazla bant sayısına 15 bant ile 9 nolu birey sahip olurken, 1 bant ile en az bant sayısına 1 nolu birey sahip olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek frekans 9. lokusta (0.9682) ve en düşük frekans 7. lokusta (0.2500) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı ise 11., 16. ve 19. lokuslarda (0.4910) görülmektedir (Çizelge 4.3). Aynı lokuslarda benzer bantları veren bireyler Şekil 4.8'den incelendiğinde 11, 13 ve 16 nolu bireylerin 9 bant verdikleri görülmektedir.



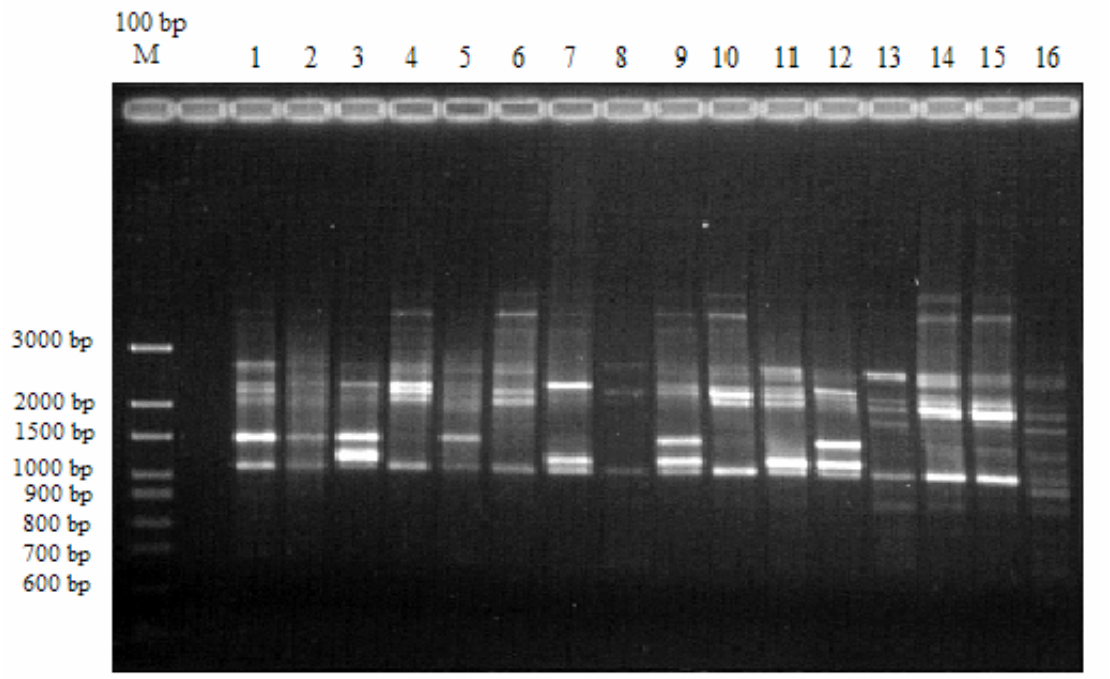
Şekil 4.9. Ra03 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Çalışmada kullanılan Ra03 primeri ile ortalama olarak 800-3000 bç aralığında toplam 16 bant elde edilmiştir. Bu bantların 14 tanesi polimorfik 2 tanesi de monomorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 12 bant ile 6 ve 11 nolu bireyler sahip olurken, 7 bant ile en az bant sayısına 7 ve 8 nolu bireyler sahip olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek frekans 12. lokusta (0.9354) ve en düşük frekans 15. lokusta (0.2500) tespit edilmiştir. En yüksek heterozigotluk oranı 2. ve 5. lokuslarda (0.4910) görülmektedir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.10. Ra35 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Ra35 primeri ile 900-3000 bç aralığında toplam 8 bant elde edilmiş ve bantların hepsi polimorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 8 bant ile 7 nolu birey sahip olmuştur. 2 ve 5 nolu bireylerde ise bu primer ile hiç bant gözlenmemiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Ayrıca 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16 nolu bireyler olan dişilerde bu primer aynı lokuslarda 7 bant ile benzer bant görüntüsü vermiştir. Aynı zamanda 1 ve 6 nolu bireyler (7 bant) ile 3 ve 4 nolu bireyler (6 bant) de benzer bant görüntüsü vermişlerdir (Şekil 4.10). En yüksek frekans 1. lokusta (0.9682) ve en düşük frekans 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. lokuslarda (0.3536) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek heterozigotluk oranı ise 2. lokusta (0.4930) görülmektedir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.11. Ra59 nolu primerin RAPD bant görüntüsü

Son olarak çalışmada kullanılan Ra59 primeri ile 900-3000 bç aralığında toplam 16 bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 15'i polimorfik 1'i de monomorfik bulunmuştur. En fazla bant sayısına 11 bant ile 4 nolu birey sahip olurken, en az bant sayısına 3 bant ile 8 nolu birey sahip olmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). En yüksek frekans 15. lokusta (0.9682) ve en düşük frekans 9. lokusta (0.2500) görülmektedir (Çizelge 4.2). Onuncu lokus varyasyonun en yüksek olduğu lokustur. Bu sebeple en yüksek heterozigotluk oranı bu lokusta (0.5000) görülmektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. Kullanılan primerlere ait her bir lokus için gen frekansları

Primer Adı	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	*P %	Bant	LOKUSLAR VE GEN FREKANSLARI																	
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
18	10	9	90	0	0.8660	0.6124	0.3536	0.3536	0.2500	0.2500	0.7906		0.2500	0.7500									
				1	0.1340	0.3876	0.6464	0.6464	0.7500	0.7500	0.2094	1.0000	0.7500	0.2500									
19	16	12	75	0	0.9354	0.9354	0.8292	0.5000	0.6614	0.5590	0.5000	0.2500	0.2500				0.8660	0.9682		0.9014			
				1	0.0646	0.0646	0.1708	0.5000	0.3386	0.4410	0.5000	0.7500	0.7500	1.0000	1.0000	1.0000	0.1340	0.0318	1.0000	0.0986			
Op15	17	15	88.23	0	0.9682	0.5590	0.4330	0.8660	0.7071	0.6124		0.3536		0.7500	0.7906	0.6124	0.6124	0.9354	0.7071	0.9682	0.5590		
				1	0.0318	0.4410	0.5670	0.1340	0.2929	0.3876	1.0000	0.6464	1.0000	0.2500	0.2094	0.3876	0.3876	0.0646	0.2929	0.0318	0.4410		
Opm10	12	12	100	0	0.9682	0.5590	0.4330	0.5590	0.7071	0.5000	0.2500	0.9354	0.4330	0.2500	0.5590	0.5000							
				1	0.0318	0.4410	0.5670	0.4410	0.2929	0.5000	0.7500	0.0646	0.5670	0.7500	0.4410	0.5000							
Opp15	15	15	100	0	0.8660	0.9014	0.5000	0.5000	0.4330	0.2500	0.2500	0.7071	0.6124	0.3536	0.3536	0.5000	0.9014	0.5590	0.3536				
				1	0.1340	0.0986	0.5000	0.5000	0.5670	0.7500	0.7500	0.2929	0.3876	0.6464	0.6464	0.5000	0.0986	0.4410	0.6464				
Opq04	18	14	77.77	0	0.9354	0.5590	0.3536	0.6614	0.6124	0.4330		0.3536			0.7906		0.2500	0.3536	0.5000	0.2500	0.8660	0.2500	
				1	0.0646	0.4410	0.6464	0.3386	0.3876	0.5670	1.0000	0.6464	1.0000	1.0000	0.2094	1.0000	0.7500	0.6464	0.5000	0.7500	0.1340	0.7500	
Opq06	19	19	100	0	0.9354	0.6614	0.8660	0.7500	0.3536	0.2500	0.2500	0.3536	0.9682	0.3536	0.4330	0.9354	0.8292	0.7071	0.9014	0.4330	0.9014	0.8292	0.4330
				1	0.0646	0.3386	0.1340	0.2500	0.6464	0.7500	0.7500	0.6464	0.0318	0.6464	0.5670	0.0646	0.1708	0.2929	0.0986	0.5670	0.0986	0.1708	0.5670
Ra03	16	14	87.50	0	0.9014	0.4330	0.6124	0.9014	0.4330	0.7071	0.7500		0.3536	0.3536		0.9354	0.9354	0.8660	0.2500	0.3536			
				1	0.0986	0.5670	0.3876	0.0986	0.5670	0.2929	0.2500	1.0000	0.6464	0.6464	1.0000	0.0646	0.0646	0.1340	0.7500	0.6464			
Ra35	8	8	100	0	0.9682	0.5590	0.3536	0.3536	0.3536	0.3536	0.3536	0.3536											
				1	0.0318	0.4410	0.6464	0.6464	0.6464	0.6464	0.6464	0.6464											
Ra59	16	15	93.75	0	0.8292	0.7500	0.8292	0.9014	0.9014	0.3536	0.6614	0.4330	0.2500	0.5000	0.9354	0.6614	0.8292		0.9682	0.8660			
				1	0.1708	0.2500	0.1708	0.0986	0.0986	0.6464	0.3386	0.5670	0.7500	0.5000	0.0646	0.3386	0.1708	1.0000	0.0318	0.1340			
∑	147	133	90.48																				

*Polimorfizm oranı

Çizelge 4.3. Kullanılan primerlere ait her bir lokus için heterozigotluk oranları

Örnek Büyüklüğü	Lokus	h	Lokus	h	Lokus	h
16	18-1	0.2321	OPM10-8	0.1208	OPQ06-13	0.2833
16	18-2	0.4747	OPM10-9	0.4910	OPQ06-14	0.4142
16	18-3	0.4571	OPM10-10	0.3750	OPQ06-15	0.1778
16	18-4	0.4571	OPM10-11	0.4930	OPQ06-16	0.4910
16	18-5	0.3750	OPM10-12	0.5000	OPQ06-17	0.1778
16	18-6	0.3750	OPP15-1	0.2321	OPQ06-18	0.2833
16	18-7	0.3311	OPP15-2	0.1778	OPQ06-19	0.4910
16	18-8	0.0000	OPP15-3	0.5000	Ra03-1	0.1778
16	18-9	0.3750	OPP15-4	0.5000	Ra03-2	0.4910
16	18-10	0.3750	OPP15-5	0.4910	Ra03-3	0.4747
16	19-1	0.1208	OPP15-6	0.3750	Ra03-4	0.1778
16	19-2	0.1208	OPP15-7	0.3750	Ra03-5	0.4910
16	19-3	0.2833	OPP15-8	0.4142	Ra03-6	0.4142
16	19-4	0.5000	OPP15-9	0.4747	Ra03-7	0.3750
16	19-5	0.4479	OPP15-10	0.4571	Ra03-8	0.0000
16	19-6	0.4930	OPP15-11	0.4571	Ra03-9	0.4571
16	19-7	0.5000	OPP15-12	0.5000	Ra03-10	0.4571
16	19-8	0.3750	OPP15-13	0.1778	Ra03-11	0.0000
16	19-9	0.3750	OPP15-14	0.4930	Ra03-12	0.1208
16	19-10	0.0000	OPP15-15	0.4571	Ra03-13	0.1208
16	19-11	0.0000	OPQ04-1	0.1208	Ra03-14	0.2321
16	19-12	0.0000	OPQ04-2	0.4930	Ra03-15	0.3750
16	19-13	0.2321	OPQ04-3	0.4571	Ra03-16	0.4571
16	19-14	0.0615	OPQ04-4	0.4479	Ra35-1	0.0615
16	19-15	0.0000	OPQ04-5	0.4747	Ra35-2	0.4930
16	19-16	0.1778	OPQ04-6	0.4910	Ra35-3	0.4571
16	OP15-1	0.0615	OPQ04-7	0.0000	Ra35-4	0.4571
16	OP15-2	0.4930	OPQ04-8	0.4571	Ra35-5	0.4571
16	OP15-3	0.4910	OPQ04-9	0.0000	Ra35-6	0.4571
16	OP15-4	0.2321	OPQ04-10	0.0000	Ra35-7	0.4571
16	OP15-5	0.4142	OPQ04-11	0.3311	Ra35-8	0.4571
16	OP15-6	0.4747	OPQ04-12	0.0000	Ra59-1	0.2833
16	OP15-7	0.0000	OPQ04-13	0.3750	Ra59-2	0.3750
16	OP15-8	0.4571	OPQ04-14	0.4571	Ra59-3	0.2833
16	OP15-9	0.0000	OPQ04-15	0.5000	Ra59-4	0.1778
16	OP15-10	0.3750	OPQ04-16	0.3750	Ra59-5	0.1778
16	OP15-11	0.3311	OPQ04-17	0.2321	Ra59-6	0.4571
16	OP15-12	0.4747	OPQ04-18	0.3750	Ra59-7	0.4479
16	OP15-13	0.4747	OPQ06-1	0.1208	Ra59-8	0.4910
16	OP15-14	0.1208	OPQ06-2	0.4479	Ra59-9	0.3750
16	OP15-15	0.4142	OPQ06-3	0.2321	Ra59-10	0.5000
16	OP15-16	0.0615	OPQ06-4	0.3750	Ra59-11	0.1208
16	OP15-17	0.4930	OPQ06-5	0.4571	Ra59-12	0.4479
16	OPM10-1	0.0615	OPQ06-6	0.3750	Ra59-13	0.2833
16	OPM10-2	0.4930	OPQ06-7	0.3750	Ra59-14	0.0000
16	OPM10-3	0.4910	OPQ06-8	0.4571	Ra59-15	0.0615
16	OPM10-4	0.4930	OPQ06-9	0.0615	Ra59-16	0.2321
16	OPM10-5	0.4142	OPQ06-10	0.4571		
16	OPM10-6	0.5000	OPQ06-11	0.4910		
16	OPM10-7	0.3750	OPQ06-12	0.1208		
Ortalama ve standart hata				**0.3273± 0.1697**		

Çizelge 4.4. Güney Karaman ırkı 16 koyunun 10 adet RAPD markörü (belirteç) bakımından genetik benzerlik değerleri

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16
K1	1.000000															
K2	0.659864	1.000000														
K3	0.680272	0.734694	1.000000													
K4	0.795918	0.687075	0.748299	1.000000												
K5	0.659864	0.741497	0.585034	0.605442	1.000000											
K6	0.768708	0.673469	0.653061	0.85034	0.659864	1.000000										
K7	0.768708	0.605442	0.62585	0.768708	0.564626	0.768708	1.000000									
K8	0.646259	0.632653	0.62585	0.646259	0.673469	0.673469	0.659864	1.000000								
K9	0.755102	0.632653	0.721088	0.823129	0.564626	0.768708	0.782313	0.632653	1.000000							
K10	0.748299	0.639456	0.687075	0.829932	0.59864	0.802721	0.734694	0.639456	0.884354	1.000000						
K11	0.829932	0.639456	0.70068	0.77551	0.693878	0.761905	0.761905	0.666667	0.748299	0.741497	1.000000					
K12	0.741497	0.646259	0.707483	0.768708	0.591837	0.768708	0.809524	0.70068	0.795918	0.734694	0.761905	1.000000				
K13	0.721088	0.59864	0.591837	0.639456	0.707483	0.680272	0.680272	0.816327	0.612245	0.619048	0.795918	0.680272	1.000000			
K14	0.802721	0.666667	0.741497	0.734694	0.653061	0.721088	0.653061	0.639456	0.707483	0.727891	0.768708	0.680272	0.714286	1.000000		
K15	0.70068	0.605442	0.639456	0.755102	0.564626	0.741497	0.714286	0.605442	0.741497	0.734694	0.693878	0.741497	0.653061	0.693878	1.000000	
K16	0.734694	0.62585	0.619048	0.693878	0.62585	0.653061	0.721088	0.693878	0.666667	0.673469	0.782313	0.707483	0.795918	0.714286	0.707483	1.000000

Çizelge 4.4'de Güney Karaman ırkı 16 koyunun 10 adet RAPD markörü (belirteç) bakımından ikili değerlerin basit eşleştirme yöntemi ile genetik benzerlik değerleri verilmiştir. Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi K9 ve K10 koyunları genetik yapı bakımından birbirine en yakın olan (0.8844) bireyler olmuştur. Genetik yapı bakımından birbirine en uzak olan koyunlar ise K5-K7 (0.5646), K5-K9 (0.5646) ile K5-K15 (0.5646) nolu bireyler olmuştur. Bu bakımdan K5 nolu koyunun genetik yapı bakımından diğer koyunlardan farklı olduğu söylenebilir.

Cushwa ve ark., (1996) RAPD yöntemi ile 5 koyun ırkında (Coopworth, Merino, Perendale, Romney ve Texel) ve bu ırkların melezlerinde toplam 53 primer kullanarak polimorfizm oranını %65-%96 arasında ortalama %85 olarak tespit etmişlerdir. Güney Karaman koyun ırkı (%90.48) ile karşılaştırıldığında polimorfizm oranının bu çalışmaya göre daha düşük olduğu söylenebilir.

Diez-Tascón ve ark., (2000) 6 merinos koyun ırkı (Spanish Mutton Merino, French Mutton Merino, German Mutton Merino, Portuguese Black Merino, Portuguese White Merino ve New Zealand Merino) içinde genetik varyasyonu belirlemek için 20 mikrosatelit kullanmışlardır. Spanish Mutton Merino, French Mutton Merino, German Mutton Merino, Portuguese Black Merino, Portuguese White Merino ve New Zealand Merino populasyonlarında heterozigotluk değerlerini sırasıyla 0.712, 0.679, 0.763, 0.703, 0.762, 0.735 olarak tespit etmişlerdir. Genel olarak heterozigotluk oranı 0.679 ile 0.763 değerleri arasında elde edilmiştir. Bu populasyonlarda genetik benzerlik değerleri ise sırasıyla, 0.315, 0.406, 0.386, 0.308, 0.330 ve 0.321 olarak tespit edilmiştir. Genetik benzerlik değerlerinden görüldüğü gibi en yüksek genetik benzerlik gösteren merinos populasyonu French Mutton Merinosu ile German Mutton Merinosu olmuştur. Güney Karaman koyunu ile kıyaslandığında bu populasyonların heterozigotluk bakımından daha yüksek değerlere sahip oldukları, genetik benzerlik bakımından ise daha düşük değerlere sahip oldukları görülmektedir. Heterozigotluk bakımından Güney Karaman koyun ırkı (0.3273) ile kıyaslandığında bu koyun populasyonlarında heterozigotluğun daha yüksek olduğu söylenebilir. Genetik benzerlik bakımından ise Güney Karaman koyun ırkından (0,7009) daha düşük değerlere sahip olmaktadırlar.

Stephen ve ark., (2001) 5 Tanzanya koyun eko-tipi (Arusha, Mwanza, Mtwara, Dodoma ve Coast) arasında genetik ilişkileri tespit etmek için 4 RAPD primeri ve 6 mikrosatelit kullanmışlardır. RAPD ile 30 adet polimorfik bant, mikrosatelit ile 198 adet polimorfik bant elde etmişlerdir. RAPD primerleri ile ortalama heterozigotluk değeri en yüksek olan eko-tip Arusha (0.203), en düşük heterozigotluk değeri ise Dodoma eko-tipinde (0.137) belirlenmiştir. Ortalama heterozigotluk değeri bakımından Güney Karaman koyunu (0.3273) bu koyun eko-tipleri ile kıyaslandığında daha yüksek bir değere sahip olduğu söylenebilir. Dolayısıyla bir populasyonda heterozigotluk değeri ne kadar yüksek bulunursa populasyonun genetik çeşitliliği de o oranda geniş olmaktadır. Bu bakımdan Güney Karaman ırkı 16 koyun 5 Tanzanya koyun ekotiplerinden daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olmaktadır.

Arranz ve ark., (2001) İspanya koyun ırkları içindeki ve arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla 18 mikrosatelit kullanmışlardır. Çalışmada İspanya koyun ırklarından Churra, Latxa, Castellana, Rasa-Aragonesa ve Merino ırkları ile referans olarak İvesi koyun ırkı üzerinde durulmuştur. Beş İspanya koyun ırkında ortalama lokus heterozigotluğu 0.63–0.86 değerleri arasında ortalama 0.77 olarak, İvesi koyun ırkında ise ortalama 0.75 olarak tespit etmişlerdir. Güney Karaman koyun ırkı (0.3273) ile kıyaslandığında çalışmada kullanılan 6 koyun ırkının heterozigotluk değerleri daha yüksek tespit edilmiştir.

Arora ve ark., (2001) Hindistan'ın koyun ırklarından en yüksek canlı ağırlığına sahip olan Muzzafarnagri ırkı koyunların genetik yapısını belirlemek amacıyla 25 mikrosatelit kullanarak çeşitli genetik çeşitlilik parametrelerinden yüksek oranda genetik varyasyon belirlediklerini bildirmişlerdir. Bu parametrelerden Muzzafarnagri ırkı koyunların ortalama gözlemlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk değerlerini sırasıyla 0.6523 ve 0.6973 olarak tespit etmişlerdir. Ortalama polimorfizm oranını ise 0.6364 olarak bildirmişlerdir. Bu değerler Güney Karaman koyun ırkı ile kıyaslandığında heterozigotluk bakımından Güney Karaman ırkı

(0.3273) daha düşük bir değere, polimorfizm oranı bakımından ise (0.9048) daha yüksek bir değere sahip olmaktadır.

Stahlberger-Saitbekova ve ark., (2001) 7 İsviçre koyun ırkı (White Alpine, Oxford Down, Black-Brown Mountain, Valais Blacknose, Valis Red, Spiegel Sheep ve Engadine) ile İsviçre koyun ırklarının yabani tipi olan Mouflon populasyonlarında 16 adet koyun, 9 adet sığır ve 6 adet keçi türüne özgü toplam 31 mikrosatellit belirteci (markör) kullanarak genetik ilişkileri belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada ele alınan koyun ırklarının ortalama heterozigotluk değerleri (He) 0.60-0.71 arasında değişiklik göstermekte olup, yabani koyun tipi olan Mouflon koyununda ise bu değer 0.45 olarak tespit edilmiştir. Bu koyun ırklarının tümünde ortalama heterozigotluk değeri ise 0.63 olarak bildirmişlerdir. Bu bakımdan Güney Karaman ırkı (0.3273) ile kıyaslandığında 7 İsviçre koyun ırkı ile Mouflon populasyonunun daha yüksek heterozigotluk değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Ahmed Ali (2003) Mısır'da yetiştirilen 4 koyun ırkında (Barki, Rahmani, Baladi ve Suffolk) toplam 19 RAPD primeri denemiş ve bu primerlerden 5'inin polimorfik bant verdiği bildirilmiştir. Mısır'daki 4 koyun ırkı arasındaki genetik benzerlik ise 0,8190–0,9570 değerleri arasında bulunmuştur. Bu ırklardan Barki ve Rahmani (% 95,7) diğer ırklara nazaran genetik yakınlığı en fazla olan ırklar olmuştur. Genetik yakınlığı en az olan ırklar ise Baladi ve Saffolk (% 81,9) ırkları olmuştur. Bunun sebebi de Sufflok ırkının kültür olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Güney Karaman koyun ırkı (0,7009) ile karşılaştırıldığında Mısır'daki 4 koyun ırkı arasındaki genetik benzerliğin daha yüksek olduğu açıklanabilir.

Banabazi ve ark., (2003) 5 İran koyun populasyonu (Sanjabi, Kordi Kordistan, Kordi Khorasan, Merhaban ve Moghani) arasında ve içinde genetik varyasyonu ve populasyonlar arası evrimsel ilişkiyi tespit etmek için 6 mikrosatelit markörü (McMA2, McMA26, MAF64, OarAE64, OarCP26 ve OarFCB304) denemişler ve OarAE64 dışındaki mikrosatelitler çalışmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Koyun populasyonları arasında genetik uzaklığı en düşük olan Sanjabi ve Kordi Kordistan populasyonları (0.246) olurken, en yüksek genetik uzaklık gösteren koyun

populasyonları Sanjabi ve Moghani (0.388) olmuştur. Populasyonlar arası genetik farklılık ise 0.506–0.915 değerleri arasında bulunmuştur. Dolayısıyla Güney Karaman koyun ırkı (0.2991) ile kıyaslandığında çalışmada kullanılan 5 İran koyun populasyonundaki genetik farklılığın daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Tahmoorespur ve ark., (2003) 5 İran koyun ırkında (Arman, Balouchi, Iranblack, Kordi ve Karakol) 17 RAPD primeri kullanmışlar ve bu primerlerden sadece 3 tanesinden (Moh-4, Moh-13 ve Moh-21) 10 adet polimorfik bant elde etmişlerdir. Çalışmada kullanılan markörler ile 5 İran koyun ırkı arasında ve içinde çeşitliliği çok düşük bulduklarını ve koyun ırkları arasındaki ve içindeki genetik ilişkiyi ayrıntılı bir şekilde belirlemek için daha çok primer ile daha çok çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmektedirler. Bu tez çalışmamızda ise, Güney Karaman koyun ırkında kullanılan RAPD primerleri bireylerin genotiplerini ayrıntılı bir şekilde değerlendirmeye tutabilecek sayıda polimorfik bant (133 adet) üretilmiştir.

Wafula ve ark., (2005) Batı Afrika Djallanke koyun ırkının genetik karakterini belirlemek için 11 Djallanke koyun populasyonu ile referans olarak 3 ırk (Macina, Uda ve Black Merino) üzerinde 15 mikrosatelit markörü kullanmışlardır. On bir Djallanke koyun populasyonunun beklenen heterozigotluk değerlerini (He) 0.656-0.678 arasında ve gözlenen heterozigotluk değerlerini ise (Ho) 0.630-0.703 arasında tespit etmişlerdir. Referans olarak çalışmada kullandıkları Macina, Uda ve Black Merino ırklarında ise sırasıyla bu değerler 0.751, 0.745, ve 0.754 ile 0.659, 0.653 ve 0.759 olarak tespit edilmiştir. Güney Karaman koyun ırkı (0.3273) ile bu ırklar heterozigotluk değeri bakımından kıyaslandığında çalışmada kullanılan bu ırkların daha yüksek bir değere sahip oldukları görülmektedir.

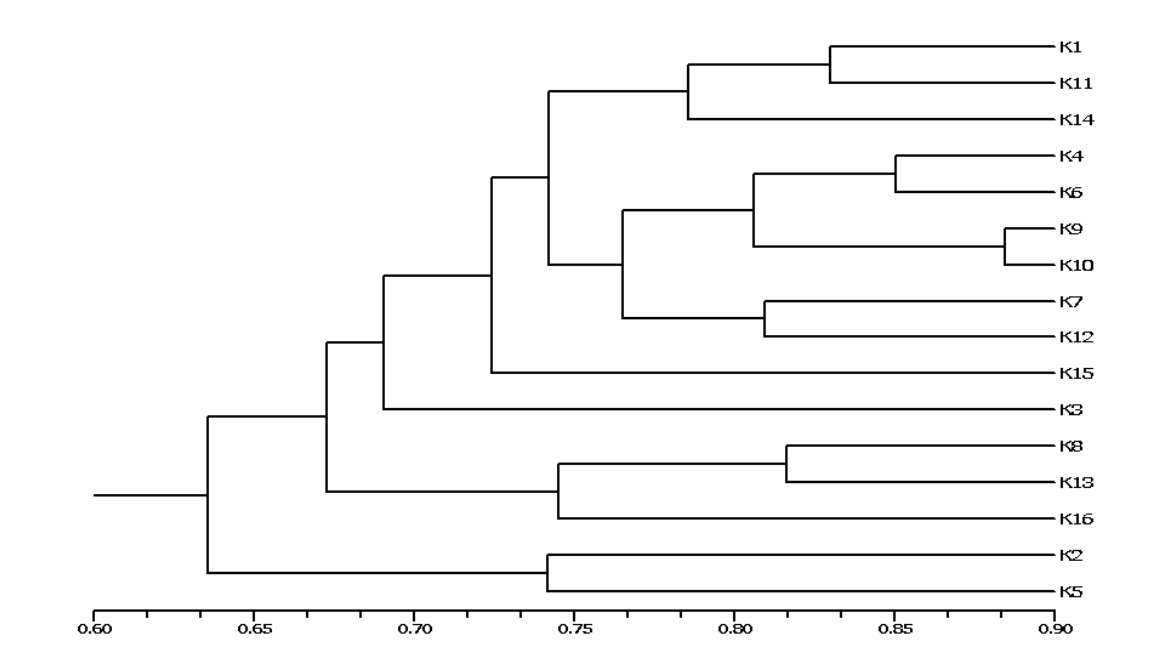
Paiva ve ark., (2005a) 5 Brezilya kıl koyun ırkında (Santa Ines, Rabo Largo, Somali, Morada Nova ve Bergamasca) toplam 140 primer denemişler ve polimorfik bant veren 19 adet RAPD primerini çalışmada kullanmışlardır. Kıl koyunları arasında genetik farklılığı 0,0512-0,1492 değerleri arasında ortalama ırklar arasında genetik varyansı 0,1492 olarak tespit etmişlerdir. Güney Karaman ile genetik uzaklık bakımından kıyaslandığında (0,2991) Brezilya kıl koyunları arasındaki genetik

farklılığın daha düşük olduğu söylenebilir. Ayrıca 5 kıl koyununun da kendi içlerindeki heterozigotluk ve polimorfizm oranlarını da hesaplamışlardır. Snata Inés, Rabo Largo, Somali, Morada Nova ve Bergamasca kıl koyun ırklarında heterozigotluğu ve polimorfizm oranını (%) sırasıyla 0.3881, 0.3857, 0.4050, 0.3929, 0.3229 ve 100, 98.15, 98.15, 94.44, 90.74 olarak tespit etmişlerdir. Heterozigotluk ve polimorfizm oranı (%) bakımından Güney Karaman koyunu (0.3273 ve 90.48) ile kıyaslandığında Bergamasca kıl koyunundan biraz yüksek bir heterozigotluk değerine sahip olup, diğer ırklara göre daha düşük değere sahiptir. Polimorfizm oranı bakımından ise Bergamasca kıl koyununa kısmen yakın bir oran göstermiş olup Brezilya kıl koyun ırklarının tümünden düşük oranda bir değere sahip olmuştur.

Paiva ve ark., (2005b) 5 Brezilya ırkı (Santa Inés, Bergamácia, Rabo Largo, Morada Nova ve Somalis) ile 3 kültür koyunu (Ile de France, Corriedale ve Hampshire) arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla 18 mikrosatelit markeri kullanmışlardır. Çalışmada en yüksek heterozigotluk değerini (He) Santa Inés koyun ırkında (0.7580) ve en düşük heterozigotluk değerini (He) ise Somali koyun ırkında (0.5752) bulmuşlardır. Çalışmada kullanılan 8 koyun ırkının ırk içi beklenen heterozigotluk değerlerini (He) 0.5752-0.7580 olarak, gözlenen heterozigotluk değerlerini (Ho) ise 0.5687-0.7203 olarak tespit etmişlerdir. Güney Karaman koyun ırkı ile kıyaslandığında (0.3273) bu koyun ırklarında heterozigotluğun daha yüksek olduğu söylenebilir.

Sodhi ve ark., (2005) Hindistan koyun ırklarından Nali ve Chokla ırkları içindeki ve arasındaki genetik farklılığı belirlemek amacıyla 25 mikrosatelit lokusunda çalışma yapmışlardır. Nali koyun ırkında heterozigotluk (He) 0.225–0.849 değerleri arasında ortalama olarak 0.651 ve polimorfizmi 0.210–0.810 değerleri arasında ortalama olarak 0.613 olarak tespit etmişlerdir. Chokla koyun ırkında ise heterozigotluk (He) 0.385–0.828 değerleri arasında ortalama olarak 0.657 ve polimorfizm 0.359–0.768 değerleri arasında ortalama olarak 0.6056 olarak tespit edilmiştir. Heterozigotluk değerleri bakımından Güney Karaman koyun ırkı (0.3273) ile kıyaslandığında Nali ve Chokla koyun ırklarının daha yüksek bir değere sahip

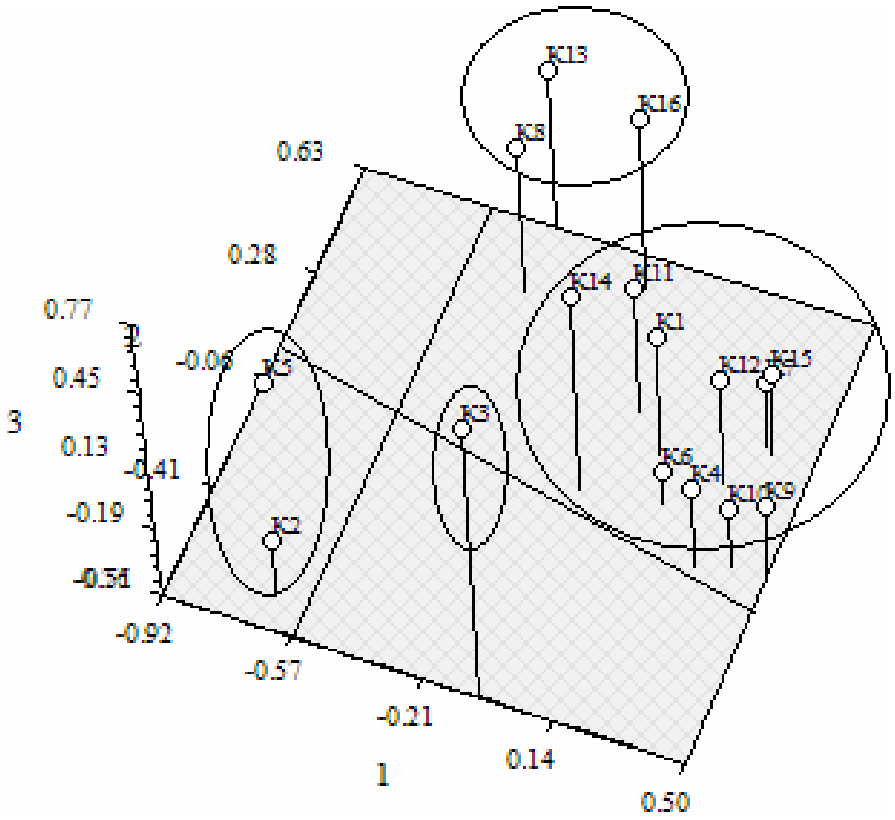
olduğu görülmektedir. Polimorfizm bakımından ise Güney Karaman koyun ırkından (% 90.48) daha düşük değerlere sahip olmaktadırlar.



Şekil 4.12. Güney Karaman ırkı 16 koyunun 10 RAPD markörü bakımından UPGMA dendogramı

Araştırma sonucunda skorlanabilen RAPD bantlarından NTSYS-pc ile genotipik varyasyonun gösterildiği genetik ilişki dendogramı UPGMA yöntemine göre oluşturulmuştur. Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi 16 koyun K2 ve K5 bireylerinin yer aldığı grup ile diğer tüm bireylerin yer aldığı iki ana gruba ayrılmıştır. K2 ve K5'in dışındaki diğer grubu oluşturan bireyler yine kendi içinde K8, K13 ve K16 bireyleri ile geri kalan bireylerin oluşturduğu başka bir alt grup oluşturmuştur. Yine bu alt gruplar da kendi içlerinde farklı alt gruplara sahip olmuşlardır. Dendogramdan K9 ve K10 nolu bireylerin genetik yapı bakımından birbirine en yakın olan genotipler olduğu görülmektedir. Çizelge 4.4 ve Şekil 4.12'den görüldüğü gibi K2 ve K5 nolu bireylerin, özellikle K5 nolu bireyin genetik yapı bakımından diğer koyunlardan farklı olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak Güney Karaman koyun ırkını temsil eden bu 16 bireyin heterojen bir yapıda olduğu ve bu genetik çeşitliliğin ıslah amaçlı kullanım potansiyeline sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.13. Güney Karaman Koyun Irkında RAPD Markörleri Bakımından PCO Analizi

Dendogramda genetik yapı bakımından birbirine en yakın olan K9 ve K10 nolu bireylerin üç boyutlu vektörel analiz olan *principal component* analizinde (PCO) de genetik yakınlığı görülebilmektedir. Bireyler arasında genetik yapı bakımından en uzak olan birey ise K2 ve K5 nolu bireyler olmuştur. Yine bireylerin PCO analizinde K2 ve K5'in dışındaki diğer grubu oluşturan bireylerden farklı olarak K8, K13 ve K16 bireyleri ile K3 nolu bireyin farklı bir alt grup oluşturduğu dendogramda ve PCO analizinde görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'de hayvan türleri içerisinde koyunun özel bir yeri ve önemi vardır. Sayısal varlık bakımından birçok Avrupa ülkesinden daha fazla olan koyun varlığımız genetik çeşitlilik bakımından da oldukça zengindir. Bu sebeple koyun türünü oluşturan ırklarımızın genetik varyasyonunun bir an önce belirlenmesi önem taşımaktadır. Hayvan türlerinin morfolojik olarak sınıflandırılması özellikle genotip karmaşası olan populayonlarda son derece zordur. Ayrıca bu türlü sınıflandırma populasyonların genetik yapıları hakkında da ayrıntılı bir bilgi vermemektedir. Bundan dolayı gen kaynaklarını oluşturan populasyonlar hakkında daha kesin bilgilere ulaşmada ve genetik varyasyonun tespit edilmesi ile yapılacak seleksiyonun şeklinin belirlenmesinde moleküler tekniklerden faydalanılması amaca ulaşmada fayda sağlayacaktır**.**

Ülkemiz gen kaynaklarını oluşturan ve gen kaynaklarının korunması kapsamına alınan koyun ırklarımızdan biri olan Güney Karaman ırkı 16 koyunda 10 RAPD markörü kullanarak bireysel genotiplerden DNA düzeyinde elde edilen bilgiler ile hem birey bazında hem de populasyona ait polimorfizm, genetik benzerlik, genetik uzaklık ve heterozigotluk gibi bazı genetik parametreler başarılı bir şekilde hesaplanmıştır. Bu açıdan RAPD-PCR metodunun populasyona ait genetik parametrelerin belirlenmesinde etkinliği ortaya çıkmıştır.

Güney Karaman ırkı koyun populasyonuna ait bu parametrelerin hesaplanmasında kullanılan 10 RAPD primerinin tümü polimorfik bulunmuştur. Bütün primerler göz önüne alındığında bant sayısı en fazla olan primer Opq04 (AGT GCG CTG A) primeri (18 banttan 14'ü polimorfik) olurken polimorfizm oranı %77.77 olarak belirlenmiştir. Ra35 (AAG CTC CCC G) primeri (8 bant ve tümü polimorfik) bant sayısı en az olan primer olmasına karşılık Opm10, Opp15 ve Opq06 primerleri en yüksek polimorfizm oranına (%100) sahip primerler olmuştur. Genel olarak kullanılan bütün primerlerden ortalama polimorfizm oranı %90.48 gibi yüksek bir oranda belirlenmiştir. Populasyon içi ortalama heterozigotluk oranı ise 0.3273±1697 olarak tahmin edilmiştir. Dolayısıyla bu değerler genetik varyasyonun

ıslah amaçlı kullanım için yüksek bir seviyede olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada bireyler arasında tespit edilen genetik benzerlik ve uzaklık değerleri ile genotipik varyasyonun gösterildiği genetik ilişki dendogramı ve PCO analizi bireysel bazda genotipik varyasyonun RAPD-PCR metodu ile tespit edilebildiğini göstermiştir.

Türkiye yerli koyun ırklarının tümünü kapsayan daha ayrıntılı bir çalışma ile populasyonları oluşturan koyun ırkları içinde ve arasında bazı genetik parametrelerin belirlenmesi daha bilgi verici olacaktır. Hatta endemik olan mevcut gen kaynaklarının da bu çalışmalara dahil edilmesi yararlı sonuçlar sağlayacaktır. Bu sadece yerli gen kaynaklarımızla da sınırlı kalmayıp kültür ırklarını da kapsayan geniş bir çalışma ortamının oluşturulması ile daha çok fayda sağlanacaktır. Ayrıca tespit edilen genetik varyasyondan yararlanılarak kötü çevre şartlarına ve hastalıklara dayanıklılık gibi özellikleri olan populasyonlardan yararlanma yoluna da gidilmesi önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

Ahmed Ali, B. 2003. Genetics similarity among four breeds of sheep in Egypt detected by RAPD markers. African Journal of Biotecnology, 2 (7): 194–197.

Ahmed Ali, B., Mohamed Ahmed, M. M. and Mahmoud Aly, O. M. 2003. Relationship between genetic similarity and some productive traits in local chicken strains. African Journal of Biotechnology, 2 (2): 46–47.

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

Akçapınar, H., 1994. Koyun Yetiştiriciliği. Medisan Yayınevi, Ankara.

Akhan, S. ve Canyurt, M. A. 2005. Üç Farklı Kuluçkahanedeki Damızlık Gökkuşağı Alabalığı (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1972) Stokları Arasında Genetik Çeşitliliğin RAPD-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. E. Ü. Su Ürünleri Dergisi. 22(1-2): 25-30.

Akman N., Meftune, E. ve Tavmen, A. 2001. Koyunculuk Dünya'da-Avrupa Birliği'nde- Türkiye'de Hayvansal Üretim ve Ticareti. Çamlıca Kültür ve Yardım Vakfı. İstanbul.

Anonim, 2006a. Hayvancılığın Desteklenmesi Hakkında Uygulama Esasları Tebliği (Tebliğ No: 2006/9). 29.06.2006. http://rega.basbakanlik.gov.tr/Eskiler/ 2006/03/ 20060308-7.htm

Anonim, 2006b. Biyoçeşitlilik nedir?http://www.tagem.gov.tr/hgk/biyoceşitlilik.htlm

Anonymous, 2006a. Principle of the PCR. http://users.ugent.be/~avierstr/principles/ pcr.html

Anonymous, 2006b. Technical Resources-Quantitation of Nucleic Acids Using a Spectrophotometer. www.norgenbiotek.com/index.php?id=techdocs_002

Apostolidis, A.P., Mamuris, Z., Karkavelia, E., Alifakiotis, T. 2001. Comparison of Greek breeds of horses using RAPD markers. J. Animal Breed. Genet. 118: 45–46.

Arı, Ş. 2004. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri. Temizkan, G. ve Arda, N. (ed).101–117.

Arora, R. and Bhatia, S. 2001. Genetic structure of Muzzafarnagri sheep based on microsatellite analysis. Small Ruminant Research. 54: 227–230.

Arranz, J.J., Bayón, Y. and San Primitivo, F. 2001. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. Genet. Sel. Evol. 33: 529–542.

Asal, S., Dellal, G. ve Kocabaş, Ş. 1996. Akkaraman ve Anadolu merinoslarında hemoglobin ve arilesteraz tipleri. Tr. J. Vet. Anim. Sci. 20: 215–217.

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

Banabazi, M. H., Esmaeelkhanian, S., Asthtiani, S. R. M. and Shahrbabak, M. M. 2003. Genetic variation within and between five Iranian sheep populations using microsatellite. Proceeding of British Society of Animal Science, 140. http://www.bsas.org.uk/downloads/annlproc/Pdf2003/140.pdf

Barker, J.S.F., Tan, S.G., Moore, S.S., Mukherjee, T.K., Matheson, J.L., Selvaraj, O.S. 2001. Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (Capra hircus). J. Anim. Breed. Genet. 118: 213–233.

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.

Boztepe, S., Özbayat. H.İ. ve Kayış, S.A., 1993. Kıl Keçilerinde Kan Potasyum ve Hemoglobin Polimorfizmi, S.Ü. Zir. Fak. Derg., 3 (5): 89-96.

Bowditch, B.M., Albright, D.G., Williams, J.G.K. and Braun, M.J. 1993. Use of RAPD markers in comparative genome studies. Methods in Enzymology. 224:294–309.

Cerit, H. 2001. Bir Holştayn Sığır Populasyonunda Bazı Genomik Lokusların Allel Frekanslarının Belirlenmesi ve Birey Tanımlanmasındaki Önemi. Turk J. Vet. Anim. Sci. 27: 81-91.

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.

Davis, G. P. and DeNise, S. K. 1998. The Impact of Genetic Markers on Selection. J. Anim. Sci. 76: 2331–2339.

Diez-Tascón, C., Littlejohn, R. P., Almeida, P. A. R. and Crowford, A. M. 2000. Genetic variation within the merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. Animal Genetics. 31: 243–251.

Elmacı, C., Koyuncu, M. ve Tuncel, E. 2001. Bursa Yöresi Kıl Keçilerinde Transferin Polimorfizmi. Turk J. Vet. Anim. Sci., 25: 131-134.

Ertuğrul M. ,Dellal G. ,Elmacı C. ,Akın O. ,Karaca O. ,Altın T. ,Cemal İ. 2005. Hayvansal Gen Kaynaklarının Koruma ve Kullanımı, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Ankara, Cilt I, s.275-290

Güneren, G., 1999. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Parmakizi Yönteminin (RAPD-PCR) Türkiye Yerli Sığır Irklarında 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.

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.

Kantanen, J., Vilkki, J., Elo, K. and Mäki-Tanila, A. 1995. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. Animal Genetics. 26: 315–320.

Karabağ, K., Balcıoğlu, M. S., Fırat, M. Z. ve Yolcu, H. İ. 2002. Antalya İlinde Yetiştirilen Kıl Keçilerinde Potasyum ve Hemoglobin Polimorfizmi. Turk J Vet Anim Sci. 26, 761–764.

Kaymakçı, M, Eliçin, A., Işın, F., Taşkın, T., Karaca, O., Tuncel, E., Ertuğrul, M., Özder, M., Güney, O., Gürsoy, O., Torun, O., Altını T., Emsen, H., Seymen, S., Geren, H., Odabaşı, A. ve Sönmez, R. 2005. Türkiye Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliği Üzerine Teknik ve Ekonomik Yaklaşımlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, (2):707-727, Ankara.

Kaymakçı, M. ve Sönmez, R. 1996. İleri Koyun Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova. İzmir.

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.Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.

MacHugh, D. E., Loftus, R. T., Cunningham, P. and Bradley, D. G. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. Animal Genetics, 19: 333-340.

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

Meghen, C.,Machugh, D.E. and Bradley, D.G. 1994. Genetic characterization of West African cattle. World Animal Review-FAO, 78: 59–66.

Mert, N., Gündüz, H., Gündüz, V. ve Akgündüz, M. 2003. Merinos Melezi Koyunlarda Bazı Biyokimyasal Kan Parametreleri ile Verim Arasındaki İlişkiler III-Glikoz, Alkali Fosfataz, Seruloplazmin. Turk J Vet Anim Sci. 27, 583-588.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.

Öztürk, A. 2000. Koyunculuk ve Yapağı. Selçuk Üniversitesi Zootekni Bölümü Ders notları. Konya.

Öz Aydın, S. 2004. RAPD Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 6: 116–129.

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. 2005a. Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.40, n.9, p.887-893.

Paiva, S.R., Faria D.A., Silvério V.C., McManus C., Egito A.A., Dergam J.A., Guimarães S.E.F., Castro S.R., Albuquerque M.S.M. and Mariante A.S. 2005b. Genetic variability among Brazilian sheep using microsatellites. The Role of Bıotechnology, Villa Gualino, Turin, Italy. http://www.fao.org/biotech/docs/paivagen.pdf

Schnabel, R. D., Sonstegard, T. S., Taylor, J. F. and Ashwell, M. S. 2005. Whole-genome scan to detect QTL for milk production, conformation, fertility and functional traits in two US Holstein families. International Society for Animal Genetics, Animal Genetics, doi:10.1111/j.1365-2052.2005.01337.x http://animalgenomics.missouri.edu/Schnabel_Anim_Genet_2005.pdf

Sharma, D., Appa Rao, K. B. C., Singh, R. V. and Totey, S. M. 2001. 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. 2000. 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.

Sodhi, M., Mukesh, M. and Bhatia, S. 2005. Characterizing Nali and Chockla sheep differentiation with microsatellite markers. Small Ruminant Research. *Article In Pres*. xxx: xxx-xxx.

Soysal, M. İ., Özkan, E., Kök, S., Tuna, Y. T. ve Gürcan, E. K. 2005. Genetic Characterization of Indigenous Anatolian Water Buffalo Breed Using Microsatellite DNA Markers. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2(3): 204-244.

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

Stephen, J., Wollny, C.B.A and Gwakisa P.S. 2001. Genetic relationships among five ecotypes of sheep in Tanzania. Workshop on Community based management of animal genetic resources, A Tool for Rural Development and Food

Security. SWAZILAND. http://www.ilri.cgiar.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/AnGenResCD/docs/Workshop_on_Comm_Man_AGR/Poster%20stephen/posterStephen.htm

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.

Suazo, A., McTiernan, R. and Hall, H. G. 1998. Differences between African and European Honey Bees (Apis mellifera L.) in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Journal of Heredity. 89: 32-36.

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.

Tahmoorespur, M., Nassiry, M. R. and Mohammady, A. 2003. The use of 17 RAPD primers in some of Iranian sheep breeds. Proceeding of British Society of Animal Science, 144.
http://www.bsas.org.uk/downloads/annlproc/Pdf2003/ 144.pdf

Tingey, S. V. and Tufo, J. P. 1993. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Plant Physiol. 1001: 349–352.

Vanhala, T., Tuiskula-Haavisto, M., Elo, K., Vilkki, J. and Mäki-Tanila, A. 1998. Evaluation of Genetic Variability and Genetic Distances Between Eight Chicken Lines Using Microsatellite Markers. Poultry Science, 77: 783-790.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reıjans, M., van deLee, T., Hornes, M., Frijters, A. Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407–4414.

Yeğenoğlu, E.D. 1999. Japon bıldırcınlarında (Coturnix Coturnix Japonica) DNA izolasyonu ve DNA parmakizlerinin çıkarılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı. İzmir.

Yen, N. T., Huang, M. C. And Taı, C. 2001. Genetic Variations of Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymorphisms in Taoyuan and Duroc Pigs. J. Anim. Breed. Genet. 118: 111–118.

Yıldırım, A. ve Kandemir, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metotları. Bitki Biyoteknolojisi-II, 334–363.

Wafula, P. O., Jianlin, H., Sangare, N., Sowe, J. M., Coly, R., Diallo, B. and Honette, O. 2005. Genetic characterization of West African Djallonke sheep using microsatellite markers. The Role of Biotechnology. Poster Presentation Villa Gualino, Turin, Italy.

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.

Welsh, J. and McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213–7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amlified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Research, 18: (22) 6531–6535.

Williams, J.G., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Method Enzymol. 218: 704–740.