T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARACADAĞ BÖLGESİ ZOM KOYUNLARININ MİTOKONDRİYAL ND4 (NADH DEHİDROGENAZ ALTUNİTE 4) GENİNİN MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

Emine ESER

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2021

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARACADAĞ BÖLGESİ ZOM KOYUNLARININ MİTOKONDRİYAL ND4 (NADH DEHİDROGENAZ ALTUNİTE 4) GENİNİN MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

Emine ESER

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
1. GİRİŞ 1
1.1.Evcil Koyun Genomu 2
1.2. Karacadağ Bölgesi'nin Genel Özellikleri ve Zom Koyunu 2
1.3. NADH dehidrojenazın (Kompleks I) Geni 4
1.4. Çalışmanın Amaçları 5
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 6
2. MATERYAL ve YÖNTEM 13
3.1. Materyal 13
3.2. Moleküler Çalışmalar 13
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu 13
3.2.2. DNA agaroz jel elektroforez 14
3.2.3. Primerler 15
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 15
3.2.5. DNA dizileme 16
3.3. Genetik ve Biyoinformatik Analizler 16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 18
4.1. Genomik DNA İzolasyonu 18
4.1.2. ND4 gen bölgelerinin PCR sonuçları 18
4.2. Biyoinformatik Analizler 19
4.3. Evcil Koyun İle Yabani Koyunlar Arasında Genetik İlişkiler 22
ÖZGEÇMİŞ 28

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARACADAĞ BÖLGESİ ZOM KOYUNLARININ MİTOKONDRİYAL ND4 (NADH DEHİDROGENAZ ALTUNİTE 4) GENİNİN MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

Emine ESER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Selahaddin KİRAZ
Yıl: 2021, Sayfa:28

Bu çalışmada, Diyarbakır Karacadağ yöresinde yetiştirilen ve akrabalık ilişkisi bulunmayan Zom ırkı koyunlarda mitokondriyal ND4 (*NADH dehydrogenase subunit 4*) geninde moleküler analizler yapılmıştır. Koyunlarda mitokondriyal ND4 proteini (NP_008415) 459 amino asitten oluşmaktadır. ND4 proteini, NADH'den elektron transferini katalize eden mitokondriyal membran solunum zinciri NADH dehidrojenazın (Kompleks I) çekirdek alt birimdir. ND4 proteini ND4 geni tarafından kodlanır. Koyun ND4 geni 1377 bp uzunluğundadır (Gen ID: 808257 Lokasyon: 10175-11542). Koyunlardan, kan genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. ND4 geninin PCR çalışmasında 858 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. Mitokondriyal ND4 geninde DNA sekans analizi yapılmıştır. DNA dizi analizine göre, Zom koyun ırkında ND4 geninde polimorfik olduğunu ve bu gen üzerinde A375G, C610T, G678A ve G750A mutasyonları tespit edilmiştir. Koyun mitokondriyal ND4 protein modeli incelendiğinde, mutasyonların (silent) proteininin yapısı ve özelliğinde önemli değişimlere neden olmadığı tespit edilmiştir. Koyunlarda ilgili genomik bölgelere yönelik çalışmalarda mutayonların araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: mtDNA, ND4 geni, Zom Koyunu

ABSTRACT

MSc Thesis

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL ND4 (NADH DEHYDROGENASE SUBUNITE 4) GENE OF ZOM SHEEP IN KARACADAĞ REGION

Emine ESER

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor :Assist. Prof. Dr. Selahaddin KİRAZ
Year: 2021, Page:28

In this study, molecular analyzes of the mitochondrial ND4 (*NADH dehydrogenase subunit 4*) gene were carried out in Zom breed sheep bred in Diyarbakır Karacadağ region. In sheep, the mitochondrial ND4 protein (NP_008415) consists of 459 amino acids. The ND4 protein is the core subunit of the mitochondrial membrane respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I), which catalyzes electron transfer from NADH. The ND4 protein is encoded by the ND4 gene. The sheep ND4 gene is 1377 bp long (Gen ID: 808257 Location: 10175-11542). DNA was isolated from sheep using a blood genomic DNA isolation kit. PCR products of 858 bp length were obtained in the PCR study of the ND4 gene. DNA sequence analysis was performed in the mitochondrial ND4 gene. According to DNA sequence analysis, ND4 gene was polymorphic in Zom sheep breed and A375G, C610T, G678A, G750A mutations on this gene were detected. When the sheep mitochondrial ND4 protein model was examined, it was determined that mutations (silent) did not cause significant changes in the structure and properties of the protein. It is thought that it would be useful to investigate mutations in studies on relevant genomic regions in sheep.

KEY WORDS: mtDNA, ND4 gene, Zom Sheep

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması, sürdürülmesinin her aşamasında tecrübelerini esirgemeyen hocam Dr. Öğr. Üyesi Selahattin Kiraz'a çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Karacadağ Zom koyunu 4
Şekil 1.2. NADH dehidrojenazın (Kompleks I) geni catalysis of the reaction..... 4
Şekil 1.3. NADH dehydrogenase (ubiquinone) aktivitesi 5
Şekil 4.1. Zom koyunu DNA örnekleri (ladder 1 kb, Thermo) 18
Şekil 4.2. Zom Koyunu ND4 (858 bp) geni PCR fragmentleri (Ladder 100 bp, Thermo)..... 19
Şekil 4.3. Evcil koyun ND4 protein modeli 21
Şekil 4.4. ND4 geni evcil koyun ile yabani koyunlar arasındaki filogenetik ağaç..... 23

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. PCR bileşenleri 16
Çizelge 3.2. PCR şartları 16
Çizelge 3.3. T he vertebrate mitochondrial code 17
Çizelge 4.1. Evcil koyun ND4 geni DNA sekans ve aminoasit bilgileri 20
Çizelge 4.2. Zom koyunlarında ND4 geni mutasyon bölgeleri 21
Çizelge 4.3. ND4 genine göre evcil koyun ile yabani koyunlar arasındaki genetik uzaklıklar 22

1. GİRİŞ

Hayvancılık; özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler olmak üzere dünyanın pek çok ülkesinde ekonomik anlamda önemli sektörlerden birisidir. Ülkemizde ise kırsal bölgelerde yaşayan nüfusun büyük bir kısmı hayvancılıkla geçinmesine rağmen hayvancılığın ülke ekonomisine katkısı istenilenin oldukça altındadır. Hayvancılığın Türkiye'de tarımsal üretim değeri içerisindeki tahmini değeri yaklaşık olarak %30 civarında olması bunun en önemli göstergesidir (Akman ve Tatar, 2006).

Hayvansal üretimin amacı, hayvansal ürünleri ekonomik şekilde üretmek ve artırmaktır. Hayvansal üretimi artırmak iki şarta bağlıdır. İlki hayvanların genetik açıdan yüksek verim göstermeleri, ikinci önemli şart ise verim yönlü en uygun rasyonla beslenmeleridir. Karlı bir hayvancılık için bakım beslemenin iyileştirilmesi zorunludur. Çiftlik hayvanlarında verimi etkileyen faktörler genetik ve çevre faktörleridir (Kutlu ve ark., 2004).

Türkiye mevcut koyun varlığı bakımından önemli ülkelerden biri olsa da küçükbaş hayvan yetiştirmede özelliklede koyunculuk alanında edilen verim bakımından diğer ülkelere nazaran geride bulunmaktadır. Türkiye'de koyun yetiştiriciliğinde meraya dayalı sistemle yetiştiricilik yapılmaktadır. Fakat son yıllarda meraların farklı amaçlarla kullanılmasıyla ve ayrıca mera ıslah çalışmalarının istenilen düzeyde yapılmaması dolayısıyla meralardan yeterince faydanılamamaktadır (Akça 2016).

Başarılı bir koyunculuk yapmak için bölgelerin ekonomik şartlarını ve bölgelerin coğrafi yapısının uygunluğuna göre küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yapmak amaca uygun koyun ırklarının veya tiplerinin seçilmesi gerekmektedir (Akçapınar, 1994).

1.1. Evcil Koyun Genomu

Evcil koyun genomu 26 çift otozomal kromozomu ve mitokondriyal genomu, 1 çift cinsiyet kromozomu içermektedir. Ayrıca ökaryotik hücrelerde nükleusta bulunan DNA'nın yanı sıra az miktarda sitoplazma DNA'sına da rastlanılmaktadır. Sitoplazma DNA'sı mitokondri organellerinde olup, halkasal ve çift sarmal yapıdadır (Hiendleder ve ark., 1998). Mitokondriyal DNA; populasyonlardaki genetik farklılıklardan, benzerliklerden yararlanarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesinde moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır (Meadows ve ark., 2007). Koyun mtDNA'sı 16640 bp uzunluktadır. Koyun mitokondri genomu; protein kodlayan 13 bölge (ATPaz kompleksi 6 ve 8 alt birimleri,sitokrom c oksidaz kompleksi I, II ve III alt birimleri, sitokrom b ile NADH dehidrogenez 1, 2, 3, 4L, 4, 5 ve 6), 22 çeşit tRNA (60-75 bp) ve RNA bölgesi (16S rRNA, 12S rRNA), 2 ribosomal D-loop (kontrol) bölgelerinden oluşmaktadır (Hiendleder ve ark., 1998).

Mitokondriyal DNA, populasyonlar arası/içi genetik uzaklıkların hesaplanması, populasyonların biyocoğrafik dağılımlarının belirlenmesi, populasyonların ve türlerin orijinlerinin belirlenmesi, anneye ait kalıtım modellerinin izlenmesi, populasyonlarda genetik farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır (Naderi ve ark., 2007).

1.2. Karacadağ Bölgesi'nin Genel Özellikleri ve Zom Koyunu

Karacadağ bölgesinde yapılan hayvancılık faaliyetlerinin büyük bir kısmını koyunculuk oluşturmakta, Ayrıca kıl keçisi, melez sığır yetiştiriciliği, yerli (Yerli Güney Sarısı) ve arıcılıkta yapılmaktadır. Arazinin yaklaşık % 80-85'lik kısmını meralar, geriye kalan bölümünü ise tarla arazileri, ormanlık bölgeler ve tarıma elverişsiz alanlar oluşturmaktadır. Yem bitkisi ekimi yok denecek kadar az yapılmaktadır. Hayvanlara meraya ek olarak, mercimek ve buğday samanı, arpa kırması ile kesif yem verilmektedir. Hayvanların yem ihtiyacı Şanlıurfa, Mardin ve Diyarbakır illerinden karşılanmaktadır. Mera ıslah çalışmalarının eksikliği sebebiyle mera kalitesi düşük olup, kurak geçen zamanlarda bu durum belirginleşmektedir.

Ayrıca Mera alanlarının yetersiz olması, bölgedeki yetiştiricilerin çoğunluk kısmının yaz aylarında Bingöl, Erzurum, Muş ve Van gibi illerdeki yaylalara gitmektedirler.

Karacadağ Zom Koyunu, Hamdani, Morkaraman, Karakaş, İvesi, Koçeri ve Şavak koyunları Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yetiştirilmektedir (Akça 2012). Karacadağ, Şanlıurfa ve Mardin (Derik İlçesi), Diyarbakır (Merkez, Ergani İlçeleri, Çınar) bölgelerinde geniş alana sahip sönmüş volkanik dağ bölgesidir. Karacadağ kademeli yükselmesinden dolayı bir dağ gibi görünmesinden ziyade daha çok yüksek bir yayla alanını andırmaktadır. Bölge volkanik patlamalar neticesinde bazalt taşlarla örtülü kayalık bir bölgedir. Bu bölge taşlık arazi yapısı sebebiyle tarımsal faaliyetler sınırlılık göstermekte ve bu yüzden bölge köylerinde ağırlıklı olarak küçükbaş hayvancılık faaliyetleri sürdürülmektedir (Akça, 2016).

Zom koyunların vücut rengi beyaz veya bejdir. Zom koyunlarının başlıca belirleyici özellikleri, vücudun bazı bölgelerinde özellikle baş, ağız, göz, bacak ve kuyruk kısımlarında siyah lekelerin bulunmasıdır. Zom koyunlarının vücutları genel olarak beyaz-krem veya bejdir Kulaklar, dil ve deri siyah beneklidir. Yapağı kaba karışıktır. Boyun kısmı Yapağılı, bacaklar ise yapağısızdır. Vücut yapıları sağlam ve iri, bacaklarda uzun ve kuvvetlidir. Yağlı kuyruklu koyunlardandır. Gözler bal ve kahverengidir. Zom koyunu kuyruğu üç parça şeklinde ve toplu, yuvarlak bir yapıya sahiptir. En üst kısımdaki parça diğer kısımlardan daha yukardadır. Yetiştirildiği yerin sıcak ve kurak iklimine, taşlık arazi yapısına uyumlu, yaşama gücü yüksek bir ırktır. Kulaklar orta büyüklüktedir. Zom koyunları boynuzsuzdur, genel olarak erkekler boynuzsuz olup, boynuzlu koçlara da rastlanılmaktadır (Akça ve ark., 2012; Koncagul ve ark., 2012a, Koncagul ve ark., 2012b; Koncagul ve ark., 2013).



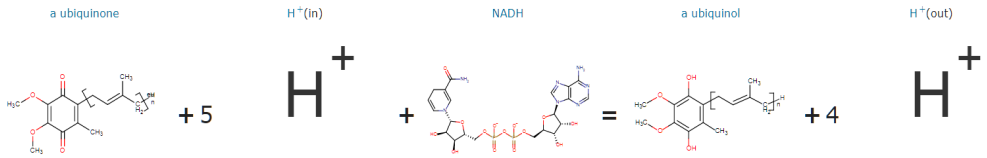
Şekil 1.1. Karacadağ Bölgesi Zom Koyunu

1.3. NADH dehidrojenazın (Kompleks I) Geni

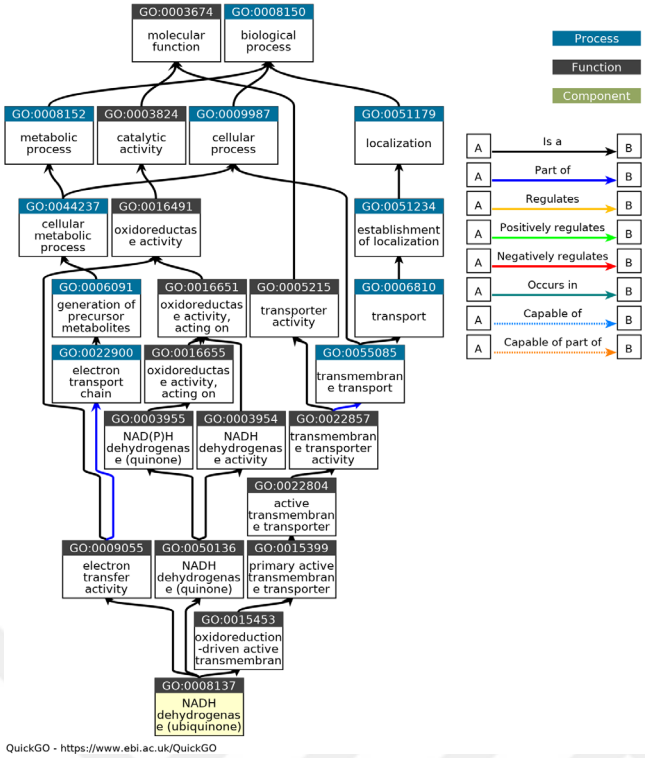
NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity GO:0008137

Mitokondriyal membran solunum zinciri NADH dehidrojenazın (Kompleks I) çekirdek alt biriminin, kataliz için gereken minimum düzeneğe ait olduğuna inanılır. Kompleks I, elektronların NADH'den solunum zincirine transferinde işlev görür. Enzim için ani elektron alıcısının ubiquinone olduğuna inanılmaktadır (Benzerliğe göre).

Catalysis of the reaction: NADH + ubiquinone + 5 H(+)(in) <=> NAD(+) + ubiquinol + 4 H(+)(out).



Şekil 1.2. NADH geni catalysis of the reaction (Anonim, 2006)



Şekil 1.3. NADH dehydrogenase (ubiquinone) aktivitesi (Anonim, 2006)

1.4. Çalışmanın Amaçları

Bu çalışmanın amacı; Karacadağ Bölgesi Zom Koyunlarının mitokondriyal ND4 (NADH dehidrogenaz altunite 4) geninin moleküler genetik analizi incelenerek; DNA mutasyonları belirlenecek, mutasyonların protein sentezinde aminoasit dizilimi incelenecek, protein modeli ortaya konulacak ve genetik uzaklıklar belirlenerek filogenetik ağaçlar oluşturulacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Irwin ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tüm sitokrom b genini (yaklaşık 1140 bp) çoğaltan çok yönlü primerlerle, toynaklı memelilerin (ungulates) ve yunusların (cetacean) üç sırasını temsil eden 17 tam gen dizisi analiz etmişlerdir. Bazı toynaklı soyların fosil kayıtları, sitokrom b DNA ve amino asit dizilerinin çeşitli bileşenleri için çeşitlilik oranlarının tahmin edilmesine izin verdiği, kodonlar içindeki birinci, ikinci ve üçüncü konumlardaki nispi ikame oranları, 10'a 1 ila en az 33 oranında olduğu. derin sapmalar için (5 milyon yıldan fazla), bu mitokondriyal gendeki hem yer değiştirmelerin hem de sessiz transversiyonların, filogenetik çıkarım için kullanılabileceği bildirilmiştir. Filogenetik bulgular arasında, (1) filler ve insanlar hariç tutularak deniz memelileri, artiodaktiller ve perissodactiller, (2) sığırlar (yani, inek, koyun ve keçi) hariç tutulacak şekilde pronghorn ve alageyik, (3) koyunlar arasındaki ilişkili olduğuve diğer pekoranların (yani, inek, zürafa, geyik ve pronghorn) hariç tutulması için keçi ve (4) chevrotain ve diğer artiodaktillerin hariç tutulması için gelişmiş geviş getiren hayvanlar olduğu belirtilmiştir, Bu sitokrom b dizilerinin karşılaştırmaları, bu membranı kapsayan protein için mevcut yapı-fonksiyon modellerini destekler. Dış yüzeyin redoks merkezini içeren kısmı, molekülün geri kalanından, yani transmembran segmentlerinden ve mitokondriyal matrise çıkıntı yapan yüzeyden daha kısıtlıdır. Transmembran segmentlerindeki amino asit değişimlerinin çoğu, hidrofobik kalıntılar (özellikle lösin, izolösin ve valin) arasındaki değişimlerdir. Kodonların birinci ve ikinci konumlarındaki yer değiştirme değişiklikleri, diğer protein kodlayan dizilere benzer şekilde, negatif bir binom dağılımına yaklaşır. Kodonların dört katlı dejenere pozisyonlarında, nükleotid ikameleri, bir Poisson dağılımına yaklaşır, bu da altta yatan mutasyonel spektrumun pozisyona göre rastgele olduğunu gösterir.

Hiendleder ve ark. (1992), yaptıkları çalışmada, Koyunlarda mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) restriksiyon endonükleaz fragman paternleri 11 enzim ile analiz etmişlerdir. Yerli koyun ve Avrupa muflonunun dört ırkı (Merinolandschaf,

Rhoenschaf, Schwarzkoepfiges Fleischschaf ve Skudde) incelemiştir. Yedi enzimin 28 parçalanma bölgesini içeren bir kesim haritası oluşturuldu. KpnI ve PstI, koyun mtDNA'sını kesmediği, Merinolandschaf, Rhoenschaf ve Mouflon'un iki EcoRI fragmanının her biri klonlandı ve kısmen sıralandı. 1.101 kb içindeki spesifik olmayan nükleotid dizi farklılıkları %0.09 ile %0.27 arasında değiştiği belirtilmiştir. Sığır sekansı boyunca kesim haritasının oryantasyonu için klonlanmış parçalardan gelen sekanslama verileriyle birlikte bir domuz mtDNA fragmanı ile hibridizasyon analizinin kullanıldığı belirtilmiştir. Cyt.b-, ND5-, CoIII- ve ATPase6 genlerinin kısımlarını kapsayan koyun mtDNA dizileri, sığır mtDNA'sının karşılık gelen dizileri ile karşılaştırıldığı belirtilmiştir.

Zhang ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada, mtDNA ND5 geninin polimorfizmi araştırmışlardır. altı Çin sığır ırkından 714 bireyde PCR-SSCP ve DNA dizileme yöntemleri ile tespit etmişleridir. Sonuçlar, P2 lokusunda, üç SNP'li (T12900C, A12923T, C12924T) A ve B adlı iki tür haplotip tespit edildiğini göstermişlerdir. Altı ırkta haplotip A sıklığı 0.041-0.167 olarak göstermişlerdir. ND5 geninin polimorfizminin Nanyang ırkında büyüme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Haplotip B'ye sahip bireyler, 6 aylıkken haplotip A'ya sahip olanlardan daha fazla hucklebone genişliğine ($P < 0.01$) ve ayrıca daha iyi vücut yüksekliğine, vücut uzunluğuna, vücut ağırlığına ve 6. ayda daha iyi ortalama günlük kazanıma ($P < 0.05$) değelerine sahip olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, ND5 geninin haplotip B'sinin Nanyang ırkında 6 ayda büyüme özellikleri üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu bildirilmiştir.

Gonçalves ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada, mtDNA'dan ND5 dizileri ve 10 nükleer işaretleyici kullanarak, Güney Brezilya'da tarihsel olarak farklı biyomlarda yetiştirilmiş iki Güney Amerika Creole koyun fenotipinin genetik farklılaşmasını araştırmışlardır. Toplamda, hiçbiri iki fenotip arasında paylaşılmayan 18 benzersiz mtDNA haplotipi tespit etmişlerdir. Böylece bu çeşitlerin genotipik olarak farklı olması desteklenmektedir. Bu durum, ya coğrafi izolasyondan, koyun çiftçilerinin kültürel alışkanlıklarındaki farklılıklardan ve sürülerin yönetilme biçiminden ya da daha büyük olasılıkla dört yüzyıl önce farklı stokların tanıtılmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Meadows ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, Mitokondriyal (mt) dizi varyasyonunun küresel araştırmaları yoluyla evcil koyunlarda beş haplogrup tanımlamıştır. Bu grup sınıflandırmaları genellikle tam mtDNA dizisi yerine küçük kısmi kontrol bölgesi veya sitokrom B geni fragmanlarına dayanmaktadır. Çalışmada, evcil koyunlarda tanımlanan her haplogroup'un temsilcilerinden tam mitogenom ve bunların yabani akrabalarının bir örneğini oluşturmuşlardır. Dizinin karşılaştırılması, her bir haplogrup arasındaki ilişkileri ve yabani koyunlarla olan ilişkiye dair fikir verdiği belirtilmiştir. Beş haplogrup, protein kodlama sekansına dayalı olarak 920.000 ± 190.000 yıl önce ortak bir atayı paylaşan bir dallanma olarak karakterize olduğunu göstermişlerdir. Koyunlar arasındaki gerçek ilişkiyi bildirmek için çeşitli mtDNA bileşenlerinin faydası da Bayesian, maksimum olabilirlik ve bölünmüş Bremmer destek analizleri ile incelemişlerdir. Çalışma, ek mitogenomları değerlendirmek için kullanılabilen bir mtDNA mitogenom panelini oluştumuştur.

Pariset ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, Akdeniz havzasındaki üç ülkenin (Arnavutluk, Yunanistan ve İtalya) koyun ırklarında mtDNA ve nükleer SNP'leri kullanarak genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. mtDNA D-loop bölgesini içeren toplam 313 dizi örneğinde 154 mtDNA haplotip tespit etmişlerdir Yunanistan ve Arnavutluk koyun haplotiplerinin A, B ve C haplogruplarına, İtalya koyun haplotiplerinin ise A ve B haplogruplarına ayrıldığı belirtilmiştir. Tüm populasyonlar için Haplogrup A, B ve C'nin frekanslarını sırasıyla; %8, %89 ve %3 olarak tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, İtalya, Yunanistan ve Arnavutluk koyun haplotiplerinde, haplotip ile nükleotid farklılığı; 0.978, 0.934, 0.979 ve 0.01007, 0.01469, 0.02107 olarak belirlemişlerdir.

Ferencakovic ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, Doğu Adriyatik bölgesinden toplanan dokuz yerli koyun ırkında (159 koç) ve 21 mouflon'da (*Ovis musimon*) mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Y-kromozom haplotipleri arasındaki genetik ilişkileri araştırmışlardır. mtDNA D-loop bölgesini içeren 180 örnek dizi bilgilerine göre 45 polimorfik bölge ve 70 haplotip tespit etmişleridir. Bu haplotiplerde; ortalama haplotip farklılığı 0.924, nükleotid farklılığı ise 0.0249±0.005 olarak hesaplamışlardır. Doğu Adriyatik bölgesi yerli koyunlarda tespit edilen 70 haplotipin

sadece 3'ü Haplogrup A'da yer aldığı, bunun yanı sıra tüm muflon örneklerinin ise Haplogrup B'de yer aldığı belirtilmiştir.

Resende ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada, Kenya koyun ırklarında mtDNA D-loop bölgesi dizi bilgileri ile filogenetik ilişkileri araştırmışlardır. mtDNA D-loop bölgesi bakımından filogenetik ağaçta, 91 koyunun 1'i soy A ve 90'ı B olarak iki ayrı haplogruba ayrıldığını göstermişlerdir.

Resende ve ark. (2016), Kenya'dan 91 evcil koyunun mitokondriyal DNA kontrol bölgesi sekanslarını analiz etmişlerdir ve yaygın haplogrup B'den yüksek çeşitlilikte anasilleri bulmuşlar ancak haplogroup A'dan sadece tek bir birey tespit etmişlerdir. Mevcut 500'den fazla mitokondriyal DNA dizisinin filocoğrafya analizlerini incelemişlerdir. Doğu ve Batı Afrika koyunları arasında bir karışım olduğuna dair hiçbir kanıt bulamamışlardır. Doğu ve eski Güney Afrika koyunlarında paylaşılan haplotiplerin varlığı, koyunların Afrika'nın doğu kısmı boyunca olası güneye doğru hareket ettiğini gösterdiğini bildirmişlerdir. Güney Asya'dan Afrika'ya Hint Okyanusu ticareti yoluyla yaygın bir koyun girişine dair hiçbir kanıt bulamamışlardır.

Gorkhali ve ark. (2016), mtDNA'larda rastgele dizi tekrarları ile uzunluk polimorfizmine bağlı heteroplasminin evcil hayvanlarda pek çalışılmadığını farketmişlerdir. Bu çalışma ile beraber Nepal koyunlarında mtDNA'ların kontrol bölgesindeki bireyler arası uzunluk varyasyonunu moleküler klonlama ve dizileme teknikleri ile belirlemişlerdir. Çin koyununun aksine örneklenen toplam Nepal koyununun %45'inde mtDNA kontrol bölgesindeki 75-bp'lik bir nükleotit sekansının bir ile dört ardışık tekrarı gözlemlenmiş buda heteroplazminin Nepal koyunlarına özgü olduğunu göstermiştir. Nepal koyunlarındaki yüksek heteroplazmi oranı, mtDNA mutasyonunun ve birey içi düzeyde bağımsız ayrışmanın veya replikasyon sırasında bir iplik kayması veya yanlış eşleşmenin bir sonucu olabileceğini bildirmişlerdir.

Guangxin ve ark. (2017), yaptıkları çalışmalarında 12 dağınık popülasyonundan 156 Çin Tibet koyununun mtDNA D-loop bölgesi dizilerini incelemişlerdir. Filogenetik incelemeler sonucunda bu cinste üç ana soyun (haplogruplar A, B ve C) bulunduğunu ve Ovis ammonun ve Ovis vignei orijinal Tibet koyunlarına katkıda bulunduğunu ve Tibet koyunlarında D ve E haplogruplarının yokluğunu ise bu cinsin Orta Doğu Çin'de ortaya çıkmadığının kanısına varışmışlardır.

Resende ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada Kenya'dan bulunan 91 evcil koyunun mitokondriyal DNA d-loop bölgesini sekans analizi ile incelemişlerdir ve yaygın haplogrup B'den yüksek çeşitlilikte anasilleri bulmuşlardır ancak haplogroup A'dan sadece tek bir hayvan olduğunu tespit etmişlerdir. 500'den fazla mitokondriyal DNA dizisinin filocoğrafya analizlerini incelemişlerdir. Doğu ve Batı Afrika koyunları arasında etkileşim olduğuna dair kanıt bulamamışlardır. Doğu ve eski Güney Afrika koyunlarında paylaşılan haplotiplerin varlığı, koyunların Afrika'nın doğu kısmı boyunca güneye doğru hareket ettiğini gösterdiği kanısına varmışlardır. Güney Asya'dan Afrika'ya Hint Okyanusu ticareti yoluyla yaygın bir şekilde koyun girişine dair kanıt bulamamışlardır.

Wang ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada, ATP sentaz 8 (ATP8) ve ATPsentaz 6 (ATP6) mitokondriyal ATPaz düzeneğinde önemli bir rol oynadıklarını belirterek, bu birimlerin herhangi birindeki mutasyonlar, ATP işlemeyi ve mitokondrideki solunum zincirini etkilerini araştırmıştır. Tibet yakları ile evcil sığırlar arasında gen çeşitliliği açısından farklılıklar olup olmadığını bulmak için 66 Tibet yakı ve 81 evcil sığırda ATP8 ve ATP6 genlerini sekanslamışlardır. ATP8 geninde 20 SNP ve ATP6 geninde 60 SNP tanımlamışlar, ATP8'de tespit ettikleri 10 SNP, muhtemelen yüksek irtifa adaptasyonu ile pozitif olarak ilişkili; bu SNP'ler m.8164 G > A, m.8210 G > A, m.8231 C > T ve m 8249 C > T, amino asit değişikliklerine neden olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, ATP6'nın m.8308A>G, m.8370A>C, ve m.8514G >A SNP'lerinin de yüksek irtifa adaptasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Spesifik olarak, overlap bölgesinde yer alan m.8308 A>G, demir regülasyonunda önemli bir rol oynayan sitokrom b561'de bulunan korunmuş bir bölge varlığı, böylece bu

mutasyona sahip Tibet yaklarının nadir oksijeni verimli bir şekilde kullanmalarına yardımcı olma ihtimali üzerinde durmuşlardır. Tüm mutasyonlar göz önüne alındığında, ATP8 geninde tanımlanan sekiz haplotipten üçü yalnızca Tibet yaklarında mevcut olduğu ve ATP6 genindeki 21 haplotipten (H1 ila H21) altısı (H3 ila H8) Tibet yaklarıyla sınırlı olduğu, bununla birlikte sadece Tibet yaklarında bulunan haplotipler, yüksek irtifa adaptasyonu ile olumlu bir şekilde ilişkilendirilebileceği bildirilmiştir.

Yağcı ve ark. (2020), çalışmasında Erzincan ilinde yetiştirilen Şavak Akkaraman koyunlarında mtDNA D-loop bölgesi 842 baz çifti (bp) kullanılarak maternal genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Şavak Akkaraman ırkının mtDNA D-loop'un da 27 polimorfik bölge ve 20 haplotip belirlemişlerdir. Ayrıca Şavak' ta tespit edilen 20 haplotipin 11'i koyun haplogroup B'de (% 55), haplogroup A'da 6 (% 30) ve haplogroup C'de 3 (% 15) olarak belirlemişlerdir. Haplogrup B, Şavak Akkaraman koyunlarında en sık görülen haplogrup olduğunu belirtmişlerdir. nükleotid ve Haplotip çeşitliliklerinin sırasıyla 0.0146 ± 0.0003 ve 0.995 ± 0.004 olduğu tahmin etmişlerdir. Akkaraman ırkı, farklı cinsler ve yaban koyunlarının mtDNA sekanslaması ile karşılaştırılmışlar ve cinsin biyolojik çeşitliliğe katkı sağladığını belirtmişlerdir.

Revelo ve ark. (2020), Kolombiya'nın beş bölgesinden Creole koyunlarının genetik kökenleri ve çeşitliliği, beş cinsin 89 sekansındaki mitokondriyal DNA varyasyonlarına dayanarak araştırmışlardır. Creole koyunu ve Etiyopya Sudan dahil olmak üzere dört kıl Creol koyunu, Pelibuey ve Wayúu. GenBank'tan alınan sekanslara dayalı olarak İber, Afrika, Hint, Karayip, Kafkas, Meksika ve Avrupa koyunlarından 62 haplotip kullanılarak karşılaştırma yapmışlardır. Çalışma sonucunda Kolombiya Kreol koyunlarından 31 farklı haplotip olduğunu, Avrupa koyun ırklarında bulunan en yaygın soy ve büyük olasılıkla katılan birkaç İber ırkında (örneğin, İspanyol Merinos, Churra) bulunan anne soyu B'ye ait olduğunu tespit etmişlerdir. Filogenetik analiz sonucuna göre Kolombiya Creol koyununun, İberya kökenli ekotiplerle kurucu etkisinin ve ardından yabancı ırkların ortaya çıkmasının sonucu olan ve farklı bir genetik soya ait olduğunu belirlemişlerdir.

Dotsev ve ark. (2021), yaptıkları bu çalışmada, tartışmalı olan kar koyununun (Ovis nivicola) mitokondriyal sitokrom b geni kullanılarak Kharaulakh kar koyunlarının taksonomik durumunun netleştirilmesini amaçlamıştır. Tüm genom tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizini kullandıkları önceki çalışmalarında, Kharaulakh Sırtı'nda yaşayan popülasyonun, genellikle atıfta bulunulan Yakut alt türlerinin diğer popülasyonlarından genetik olarak farklı olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada, Yakut kar koyununun beş farklı coğrafi konumundan toplam 87 örnek ve diğer tanınan alt türlerden 20 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. İkisi Kharaulakh Sırtı popülasyonuna ait olan 19 haplotip belirlenmiştir. Medyan birleştirme ağı ve Bayes ağacı analizleri, Kharaulakh popülasyonunun diğer tüm Yakut kar koyunlarından ayrı olarak kümelendiğini ortaya koymuştur. Kharaulakh popülasyonu ile Yakut kar koyunu arasındaki sapma süresi 0,48 +/- 0,19 MYA olarak tahmin edilmiştir. Böylece, mtDNA cytb dizilerinin incelenmesi, genom çapında SNP analizinin sonuçlarını doğrulamıştır. Kharaulakh kar koyunlarının hem nükleer hem de mitokondriyal DNA belirteçleri tarafından tanımlanan diğer gruplardan yüksek derecede farklılığını dikkate alarak, Kharaulakh popülasyonunu ayrı bir alt tür olarak sınıflandırılması önermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın hayvan materyalini Karacadağ bölgesi yetiştirilen koyunlar oluşturmuştur. Zom sürülerinden DNA izolasyonu için koyunlardan kan örnekleri toplanmıştır Kan örnekleri alma işlemlerinde seçilen koyunların birbirine akraba olmamalarına dikkat edilmiş olup, her koyun sürüsünden birer örnek alınmıştır. Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınmıştır. Her hayvan için alınan kan tüplerini etiketleyip laboratuvara ulaştırılıncaya kadar soğuk zincirde muhafaza edilmiştir.

3.2. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalar, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji laboratuarında yapılmıştır.

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Koyunlarda alınan kan örnekleri genomik DNA izolasyonu için kit kullanarak koyunlardan alınan kan örneğinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerini görüntülemek amacıyla agaroz jel (%1'lik) kullanılmıştır.

Kan Örneklerinden DNA İzolasyonun Aşamaları:

1) EDTA'lı tüpler içerisinde bulunan kan örneklerinin temasını önlemek amacıyla her kan örneğinde eldiven değiştirilmiştir.
2) 2 ml kolon içeren tüpler içerisine Column preparation Solution'dan 500 µl eklenip 12000 rpm de 60 saniye santrüfüj edilip altta kalan kısmı atılır.
3) Yeni tüp içerisine 20 µl proteinase K, 200 µl örnekler ve 20 µl RNase eklenip 120 saniye bekletilip içine 200 µl Lysis Solution eklenip 15 saniye vorteks yapılıp 10 dakika 55 ºC'de inkübe edilmiştir.

4) Tüplerin içine 200 µl (%99) ethanol ekleyip 5-10 saniye vorteks edilerek içerik kolonlu tüp içerisine aktarılarak 6500 rpm de 60 saniye santrüfüj edilerek altta kalan kısmı dökülür.
5) Sonraki aşama olarak tüp içine 500 µl prewash solution ekleyerek 6500 rpm de 60 saniye santrüfüj edilip altta kalan kısmı atılır.
6) Sonrasında tüplerin içine 500 µl wash solution eklenerek 3 dk boyunca 12000 rpm 'de santrifüj edilmiştir.
7) Yeni kolon tüpler içerisine alınıp 200 µl elution solution ekleyip 5 dk bekletilip 6500 rpm de 60 saniye santrifüj edildi.
8) Tüpler içersindeki kolonlar atılarak alt kısmında var olan sıvılarda DNA'ların varlığını agaroz jel elektroforezde görüntülenmektedir.

3.2.2. DNA agaroz jel elektroforez

Erlenmayerin içine 100 ml 1XTBE çözelti ile 1g agaroz hassas terazide tartılıp konularak mikrodalga fırın içerisinde eritildi. Mikro dalga fırınında çıkarılan agaroz jeli yaklaşık 20-25 dakika soğuması için bekletildi. Küvet içerisine dökülerek taraklar yerleştirilip jelin kalıplaşması beklenmektedir. Sonrasında ise, 1XTBE içerikli elektroforez tankının içine küvet yerleştirilip, tarak yavaş bir şekilde çıkarılmıştır. Jel kuyularının ilk sıralarına molekül ağırlık markerleri yüklenmektedir. Markerlar DNA'lar için 1 kb ladder, PCR için 100 bp'lık ladder kullanılmıştır (Thermo). Diğer kuyulara ise 4 µl DNA örnekleri 1 µl yükleme tamponu (%40 sükroz, %0.25 bromofenol mavisi, 100 mM ETDA) yüklenmiştir (PCR ürünleri 5 µl + 1 µl yükleme tamponu). Yüklemeden hemen sonra güç kaynağında (Biolab), jelin bulunduğu tanka 90 V akım verilip jeller 35-40 dk yürütülmüştür. Sonrasında jeli, etidyum bromür (0,5 µg/ml) bulunan ortam içine konulup 10 dakika bekletip DNA'lar boyanmaya bırakılmıştır. Boyanan jel, ultraviyole ışın ile DNA'ların varlıkları görüntülenebilmiş olup fotoğrafı çekilip bilgisayarda değerlendirilmiştir.

3.2.3. Primerler

Koyun DNA örneklerinde mitokondriyal ND4 bölgelerini çoğaltmak amacıyla aşağıda belirtilen ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Bu primerler ile mtDNA ND4 bölgesinin 858 bp'lik bölgesinin çoğaltılması hedeflenmiştir.

ND 4 geni primerleri:
İleri (Foward Primer): 5'-CATATCAAGCCTAGCCGTATAC'-3
Geri (Reverse Primer): 5'-CTATGAATCCGAGCATCCTACC'-3

```
>RefSeq ND4
ATGCTAAAATACATTATCCCCACAATAATACTTATACCCCTAACCTGACTATCAAAAAATAGCATAATCT
GAATCAACACCACACTTCACAGCTTGCTAATCAGCCTCACAAGCCTTCTCCTCCTAAATCAATTCGGTGA
TAATAGCCTCAACTTCTCATTAACTTTTTTCTCCGACTCCTTATCTACACCATTACTAATTCTAACCATA
TGACTTCTACCCCTAATACTCATAGCTAGCCAACATCATCTATCAAAAGAAAATCTAGCCCGAAAAAAAC
TCTTCATCTCAATGCTAATTCTACTACAACTATTTCTGATTATAACATTCACTGCCACAGAACTAATCTT
TTTCTATATCATGTTTGAAGCAACACTAGTCCCCACACTTATCATTATTACTCGATGAGGAAATCAAACA
GAACGCCTAAACGCCGGTCTCTATTTCTTGTTTTACACACTAGCAGGATCCCTGCCCCTATTAGTCGCAC
TGATTTATATTCAAAACACAATAGGATCACTAAATTTCCTTATTCTCCAGTACTGAGTTCAACCAATACC
TAACTCATGATCCAACACTTTCATATGACTAGCATGCATAATAGCTTTCATAGTAAAGATACCACTATAT
GGACTCCACCTCTGACTTCCCAAAGCCCATGTAGAAGCTCCAATTGCGGGCTCCATGGTCCTTGCAGCAA
TCCTACTTAAACTAGGAGGATATGGCATGATACGGATTACATTACTTCTGAATCCAATCACCGACTTTAT
AGCATACCCATTCATTATATTATCATTATGAGGCATAATCATAACCAGCTCAATTTGCCTTCGCCAAACG
GACCTAAAGTCACTCATTGCATATTCTTCCGTTAGCCACATAGCACTTGTCATTGTTGCCATTCTCATTC
AAACACCCTGAAGCTACATAGGAGCCACCGCCCTAATAATTGCTCATGGTCTCACATCTTCCATACTTTT
CTGCCTAGCAAACTCCAACTATGAACGAGTTCACAGCCGAACAATAATCCTAGCCCGCGGCCTACAAACA
CTCCTTCCACTAATGGCTGCCTGATGACTCCTAGCAAGTCTAACTAATCTAGCTCTACCCCCATCAATCA
ACCTAATCGGAGAACTATTTGTAGTAATATCAACCTTTTCATGATCTAACATCACAATCATTCTAATAGG
ACTTAATATGGTAATTACTGCTCTATATTCCCTCTACATACTAATCACAACACAACGAGGTAAACATACT
CACCACATCAATAATATTTTACCCTCCTTCACACGAGAAAATGCACTTATATCACTGCATATACTACCAC
TCCTACTTCTATCCCTAAACCCGAAAATTATCCTAGGCCCCCTATACT
```

3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Koyun ND4 gen bölgesinin PCR teknikleriyle çoğaltılması için yapılan bileşenleri (Çizelge 3.1.) gösterilmiştir. Bileşenler belirlenen miktarda buz kasetleri üzerinde, PCR tüpleri (0.2 ml) içerisinde hazırladıktan sonra, PCR şartları (Çizelge 3.2) önceden programlanmış olan *Boeco* marka PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR için *Taq* polimeraz, dNTP mix ve dH_2O *Sigma* marka kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. PCR bileşenleri

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar
Kalıp DNA	20-30 ng/µl	1.0 µl
PCR Buffer	10X	4.0 µl
İleri Primer	20 pmol/µl	1.0 µl
Geri Primer	20 pmol/µl	1.0 µl
dNTP mix	1.0 nM	1.0 µl
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0.5 µl
dH_2O		32.0 µl
Toplam		40.0 µl

Çizelge 3.2. PCR Şartları

Döngü işlemi	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
Ön denaturasyon	95	1	4 dk
Denatürasyon	94	30	45 sn
Yapışma (T_m)	55		45 sn
Sentez	72		60 sn
Son uzama	72	1	5 dk
Bekleme	4	∞	∞

Çoğaltılan PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla agaroz jel (%1'lik) kullanılmıştır. PCR jelinin yürütülmesinde 100 bp'lik ladder (*Thermo*) kullanılmıştır.

3.2.5. DNA dizileme

ND4 gen bölgesi PCR amlifkasyonu gerçekleştirilmiş olan örneklerde dizileme işlemleri yapılmıştır (İontek, İstanbul). Gen dizileme amacıyla örnekler 40 µl olarak (20 µl water +20 µl PCR ürünü) hazırlanmıştır.

3.3. Genetik ve Biyoinformatik Analizler

Mitokonriyal ND4 proteini (GeneID:808257) için referans proteom bilgileri *NCBI* veri tabanından temin edildi (NCBI, 2021). Dizi verileri, çoklu dizi hizalama programı *MAFFT (v7.467)* FFT-NS-1 algoritmasıyla hizalanmıştır (Katoh ve ark., 2019). Proteinlerin özellikleri *Expasy* programı ile analiz edilmiştir (Wilkins ve ark.,

1999). Proteinlerin üç boyutlu yapılarının görüntülenmesi ve aminoasitlerin düzlemsel değişimlerinin analizleri SWISS-MODEL programı ile belirlenmiştir.

Koyunlarda ND4 bölgesi DNA dizi bilgilerine göre biyoinformatik analizler yapıldı. Yabani koyunlar mtDNA ND4 gen dizi bilgisi Genbank'tan (NCBI) temin edilerek genetik analizler yapılmıştır. Genetik ağaçlar, Neighbour-Joining (NJ) (Saitou ve Nei, 1987) metodu kullanılarak MEGA5 programında (Tamura ve ark., 2011) yapılmıştır.

Ovis nivicola lydekkeri NC_039431
Ovis aries NC_001941
Ovis dalli NC_039432
Ovis ammon ammon NC_047196
Ovis vignei breed Urial NC_026064
Ovis orientalis breed Asian mouflon NC_026063
Ovis ammon NC_020656
Ovis canadensis NC_015889

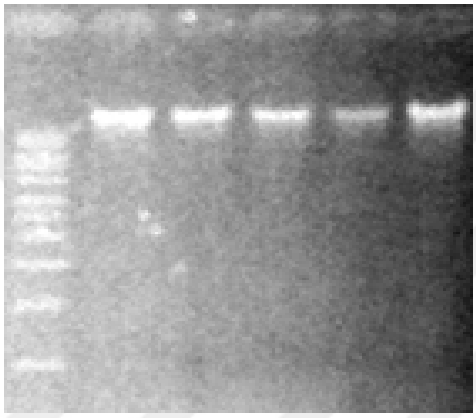
Çizelge 3.3.T he vertebrate mitochondrial code

TTT F Phe	TCT S Ser	TAT Y Tyr	TGT C Cys
TTC F Phe	TCC S Ser	TAC Y Tyr	TGC C Cys
TTA L Leu	TCA S Ser	TAA * Ter	TGA W Trp
TTG L Leu	TCG S Ser	TAG * Ter	TGG W Trp
CTT L Leu	CCT P Pro	CAT H His	CGT R Arg
CTC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CTA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CTG L Leu	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
ATT I Ile i	ACT T Thr	AAT N Asn	AGT S Ser
ATC I Ile i	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
ATA M Met i	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA * Ter
ATG M Met i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG * Ter
GTT V Val	GCT A Ala	GAT D Asp	GGT G Gly
GTC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GTA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GTG V Val i	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Genomik DNA İzolasyonu

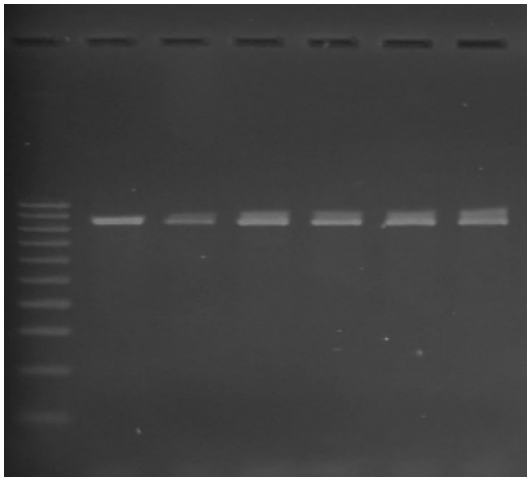
İvesi koyunlarından alınan kan örnekleri ile genomik DNA izole işlemi yapılmış olup koyunlarından izole ettiğimiz DNA örnekleri %1'lik agaroz jel görüntü resimleri gösterilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Zom koyun DNA örnekleri (ladder 1 kb, Thermo)

4.1.2. ND4 gen bölgelerinin PCR sonuçları

İzole edilen DNA örneklerinin, ND4 gen bölgelerine tasarlanmış olan primerler kullanılarak PCR amlifikasyonu çalışması yapılmış ve örneklerden PCR ürünleri alınmıştır. Tasarlanmış olan OVS ND4 (F) ve OVS ND4 (R) primerler ile genin 858 bp'lık kısmı zom koyunlarında PCR ile çoğaltılmış bulunmaktadır (Şekil 4.2.). PCR çalışmaları sonucunda elde edilmiş tüm PCR ürünlerini, PCR tüpleri içinde -20 ºC'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.2. Zom Koyunu ND4 (858 bp) geni PCR fragmentleri (Ladder 100 bp, Thermo)

Koyunların ND4 gen bölgeleri PCR ürünlerin DNA sekans analizi sonuçları elde edilmiştir

4.2. Biyoinformatik Analizler

İvesi koyunlarında ND4 bölgesinin dizi bilgisi belirlenmiştir. ND4 gen bölgesinin primerler ile 858 bp'lik kısmı çoğaltılmıştır. Gen dizisi analizi ve düzenleme sonucu örneklerin tümü için 630 bp dizi bilgisi elde edilmiştir. Koyunlarda ND4 gen dizi bilgisi analizi edilerek, koyunlarda 4 polimorfik bölge tespit edilmiştir.

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

RefSeq      CAACATCATCTATCAAAAGAAAATCTAGCCCGAAAAAAACTCTTCATCTCAATGCTAATT    300
Zom         CAACATCATCTATCAAAAGAAAATCTAGCCCGAAAAAAACTCTTCATCTCAATGCTAATT    90
            ************************************************************

RefSeq      CTACTACAACTATTTCTGATTATAACATTCACTGCCACAGAACTAATCTTTTTCTATATC    360
Zom         CTACTACAACTATTTCTGATTATAACATTCACTGCCACAGAACTAATCTTTTTCTATATC    150
            ************************************************************

RefSeq      ATGTTTGAAGCAACACTAGTCCCCACACTTATCATTATTACTCGATGAGGAAATCAAACA    420
Zom         ATGTTTGAAGCAACGCTAGTCCCCACACTTATCATTATTACTCGATGAGGAAATCAAACA    210
            ************** ********************************************

RefSeq      GAACGCCTAAACGCCGGTCTCTATTTCTTGTTTTACACACTAGCAGGATCCCTGCCCCTA    480
Zom         GAACGCCTAAACGCCGGTCTCTATTTCTTGTTTTACACACTAGCAGGATCCCTGCCCCTA    270
            ************************************************************

RefSeq      TTAGTCGCACTGATTTATATTCAAAACACAATAGGATCACTAAATTTCCTTATTCTCCAG    540
Zom         TTAGTCGCACTGATTTATATTCAAAACACAATAGGATCACTAAATTTCCTTATTCTCCAG    330
            ************************************************************
```

```
RefSeq      TACTGAGTTCAACCAATACCTAACTCATGATCCAACACTTTCATATGACTAGCATGCATA    600
Zom         TACTGAGTTCAACCAATACCTAACTCATGATCCAACACTTTCATATGACTAGCATGCATA    390
            ************************************************************

RefSeq      ATAGCTTTCATAGTAAAGATACCACTATATGGACTCCACCTCTGACTTCCCAAAGCCCAT    660
Zom         ATAGCTTTTATAGTAAAGATACCACTATATGGACTCCACCTCTGACTTCCCAAAGCCCAT    450
            ******** ***************************************************

RefSeq      GTAGAAGCTCCAATTGCGGGCTCCATGGTCCTTGCAGCAATCCTACTTAAACTAGGAGGA    720
Zom         GTAGAAGCTCCAATTGCAGGCTCCATGGTCCTTGCAGCAATCCTACTTAAACTAGGAGGA    510
            ***************** *****************************************

RefSeq      TATGGCATGATACGGATTACATTACTTCTGAATCCAATCACCGACTTTATAGCATACCCA    780
Zom         TATGGCATGATACGGATTACATTACTTCTAAATCCAATCACCGACTTTATAGCATACCCA    570
            ***************************** ******************************

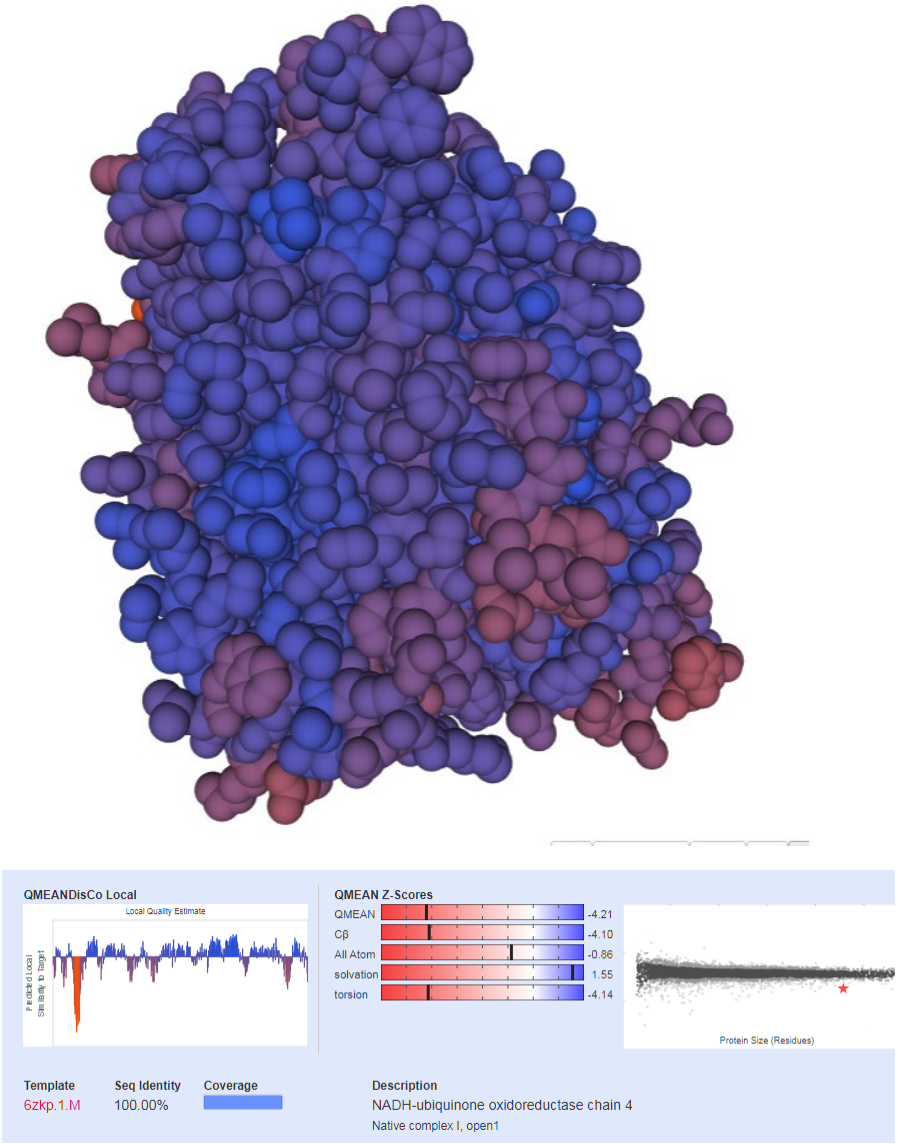
RefSeq      TTCATTATATTATCATTATGAGGCATAATCATAACCAGCTCAATTTGCCTTCGCCAAACG    840
Zom         TTCATTATATTATCATTATGAGGCATAATCATAACCAGCTCAATTTGCCTTCGCCAAACG    630
            ************************************************************
```

Çizelge 4.1. Evcil koyun ND4 geni DNA sekans ve aminoasit bilgileri

```
atg cta aaa tac att atc ccc aca ata ata ctt ata ccc cta acc tga cta tca aaa aat
 M   L   K   Y   I   I   P   T   M   M   L   M   P   L   T   W   L   S   K   N
agc ata atc tga atc aac acc aca ctt cac agc ttg cta atc agc ctc aca agc ctt ctc
 S   M   I   W   I   N   T   T   L   H   S   L   L   I   S   L   T   S   L   L
ctc cta aat caa ttc ggt gat aat agc ctc aac ttc tca tta act ttt ttc tcc gac tcc
 L   L   N   Q   F   G   D   N   S   L   N   F   S   L   T   F   F   S   D   S
tta tct aca cca tta cta att cta acc ata tga ctt cta ccc cta ata ctc ata gct agc
 L   S   T   P   L   L   I   L   T   M   W   L   L   P   L   M   L   M   A   S
caa cat cat cta tca aaa gaa aat cta gcc cga aaa aaa ctc ttc atc tca atg cta att
 Q   H   H   L   S   K   E   N   L   A   R   K   K   L   F   I   S   M   L   I
cta cta caa cta ttt ctg att ata aca ttc act gcc aca gaa cta atc ttt ttc tat atc
 L   L   Q   L   F   L   I   M   T   F   T   A   T   E   L   I   F   F   Y   I
atg ttt gaa gca aca cta gtc ccc aca ctt atc att att act cga tga gga aat caa aca
 M   F   E   A   T   L   V   P   T   L   I   I   I   T   R   W   G   N   Q   T
gaa cgc cta aac gcc ggt ctc tat ttc ttg ttt tac aca cta gca gga tcc ctg ccc cta
 E   R   L   N   A   G   L   Y   F   L   F   Y   T   L   A   G   S   L   P   L
tta gtc gca ctg att tat att caa aac aca ata gga tca cta aat ttc ctt att ctc cag
 L   V   A   L   I   Y   I   Q   N   T   M   G   S   L   N   F   L   I   L   Q
tac tga gtt caa cca ata cct aac tca tga tcc aac act ttc ata tga cta gca tgc ata
 Y   W   V   Q   P   M   P   N   S   W   S   N   T   F   M   W   L   A   C   M
ata gct ttc ata gta aag ata cca cta tat gga ctc cac ctc tga ctt ccc aaa gcc cat
 M   A   F   M   V   K   M   P   L   Y   G   L   H   L   W   L   P   K   A   H
gta gaa gct cca att gcg ggc tcc atg gtc ctt gca gca atc cta ctt aaa cta gga gga
 V   E   A   P   I   A   G   S   M   V   L   A   A   I   L   L   K   L   G   G
tat ggc atg ata cgg att aca tta ctt ctg aat cca atc acc gac ttt ata gca tac cca
 Y   G   M   M   R   I   T   L   L   L   N   P   I   T   D   F   M   A   Y   P
ttc att ata tta tca tta tga ggc ata atc ata acc agc tca att tgc ctt cgc caa acg
 F   I   M   L   S   L   W   G   M   I   M   T   S   S   I   C   L   R   Q   T
gac cta aag tca ctc att gca tat tct tcc gtt agc cac ata gca ctt gtc att gtt gcc
 D   L   K   S   L   I   A   Y   S   S   V   S   H   M   A   L   V   I   V   A
att ctc att caa aca ccc tga agc tac ata gga gcc acc gcc cta ata att gct cat ggt
 I   L   I   Q   T   P   W   S   Y   M   G   A   T   A   L   M   I   A   H   G
ctc aca tct tcc ata ctt ttc tgc cta gca aac tcc aac tat gaa cga gtt cac agc cga
 L   T   S   S   M   L   F   C   L   A   N   S   N   Y   E   R   V   H   S   R
aca ata atc cta gcc cgc ggc cta caa aca ctc ctt cca cta atg gct gcc tga tga ctc
 T   M   I   L   A   R   G   L   Q   T   L   L   P   L   M   A   A   W   W   L
cta gca agt cta act aat cta gct cta ccc cca tca atc aac cta atc gga gaa cta ttt
 L   A   S   L   T   N   L   A   L   P   P   S   I   N   L   I   G   E   L   F
gta gta ata tca acc ttt tca tga tct aac atc aca atc att cta ata gga ctt aat atg
 V   V   M   S   T   F   S   W   S   N   I   T   I   I   L   M   G   L   N   M
gta att act gct cta tat tcc ctc tac ata cta atc aca aca caa cga ggt aaa cat act
 V   I   T   A   L   Y   S   L   Y   M   L   I   T   T   Q   R   G   K   H   T
cac cac atc aat aat att tta ccc tcc ttc aca cga gaa aat gca ctt ata tca ctg cat
 H   H   I   N   N   I   L   P   S   F   T   R   E   N   A   L   M   S   L   H
ata cta cca ctc cta ctt cta tcc cta aac ccg aaa att atc cta ggc ccc cta tac
 M   L   P   L   L   L   L   S   L   N   P   K   I   I   L   G   P   L   Y
```

Çizelge 4.2. Zom koyunlarında ND4 geni mutasyon bölgeleri

Sample	Mutasyon	Sekans	Aminoasit
ND4-RefSeq	A375G	GCA ACA CTA	Thr
ND4-Zom		GCA ACG CTA	Thr
ND4-RefSeq	C610T	GCT TTC ATA	Phe
ND4-Zom		GCT TTT ATA	Phe
ND4-RefSeq	G678A	ATT GCG GGC	Ala
ND4-Zom		ATT GCA GGC	Ala
ND4-RefSeq	G750A	CTT CTG AAT	Leu
ND4-Zom		CTT CTA AAT	Leu



Şekil 4.3. Evcil koyun ND4 protein modeli

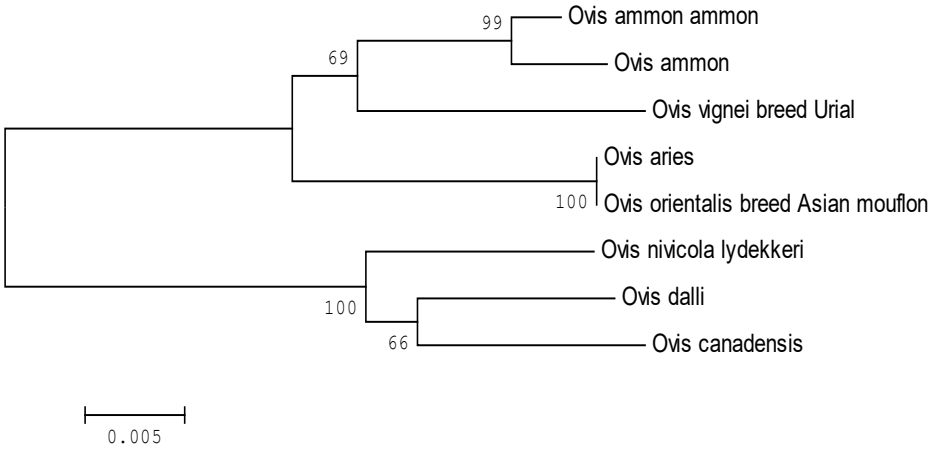
4.3. Evcil Koyun İle Yabani Koyunlar Arasında Genetik İlişkiler

Evcil koyun ile yabani koyunlar arasında dizi bilgileri (*Ovis nivicola lydekkeri* NC_039431, *Ovis aries* NC_001941, *Ovis dalli* NC_039432, *Ovis ammon ammon* NC_047196, *Ovis vignei* breed Urial NC_026064, *Ovis orientalis* breed Asian mouflon NC_026063, *Ovis ammon* NC_020656, *Ovis canadensis* NC_015889) birlikte değerlendirilerek filogenetik analizler yapılmıştır.

Mitokondriyal ND4 bölgesi DNA sekans bilgisine göre evcil koyun ile yabani koyunları arasındaki genetik uzaklıklar (Çizelge 4.3) ve filogenetik ağaç verilmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.3. ND4 genine göre evcil koyun ile yabani koyunlar arasındaki genetik uzaklıklar

Species 1	*Species 2*	Dist
Ovis aries	*Ovis orientalis breed Asian mouflon*	0,0000
Ovis ammon ammon	*Ovis ammon*	0,0073
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis dalli*	0,0213
Ovis dalli	*Ovis canadensis*	0,0213
Ovis ammon ammon	*Ovis vignei breed Urial*	0,0251
Ovis ammon	*Ovis vignei breed Urial*	0,0266
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis canadensis*	0,0281
Ovis aries	*Ovis ammon ammon*	0,0311
Ovis orientalis breed Asian mouflon	*Ovis ammon ammon*	0,0311
Ovis aries	*Ovis vignei breed Urial*	0,0311
Ovis orientalis breed Asian mouflon	*Ovis vignei breed Urial*	0,0311
Ovis aries	*Ovis ammon*	0,0326
Ovis orientalis breed Asian mouflon	*Ovis ammon*	0,0326
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis ammon ammon*	0,0542
Ovis dalli	*Ovis ammon ammon*	0,0573
Ovis canadensis	*Ovis ammon ammon*	0,0573
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis aries*	0,0589
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis orientalis breed Asian mouflon*	0,0589
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis ammon*	0,0589
Ovis dalli	*Ovis aries*	0,0604
Ovis dalli	*Ovis orientalis breed Asian mouflon*	0,0604
Ovis dalli	*Ovis ammon*	0,0604
Ovis canadensis	*Ovis ammon*	0,0604
Ovis canadensis	*Ovis aries*	0,0628
Ovis canadensis	*Ovis orientalis breed Asian mouflon*	0,0628
Ovis canadensis	*Ovis vignei breed Urial*	0,0628
Ovis nivicola lydekkeri	*Ovis vignei breed Urial*	0,0652
Ovis dalli	*Ovis vignei breed Urial*	0,0652



Şekil 4.4. ND4 geni evcil koyun ile yabani koyunlar arasındaki filogenetik ağaç

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

İvesi koyunlarında, mitokondriyal ND4 geni DNA sekansında tespit edilen mutasyonlar; A375G, C610T, G678A ve G750A şeklinde görülmüştür. Bu mutasyonların protein sentezinde aminoasit dizilimine etkili olmadığı (silent) tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, İvesi koyunların ND4 gen bölgesi dizileri tespit edilmiştir. Gen dizi bilgilerine göre koyunların ile yabani ırklar arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenmiştir. Evcil koyunlar ve yabani koyunlar arasında genetik uzaklıklar 0.0000-0.0652 arasında hesaplanmıştır.

Bu çalışmada gen dizi bilgisinin, koyun genetik çalışmalarına, hayvanların ıslah çalışmasına, biyoçeşitlilik ve gen koruma çalışmasına katkı sağlayacaktır.

Türkiye'de bulunan koyun varlığımızın son çeyrek yılda yarısından daha fazlası azalmıştır. Bu nedenlerden dolayı gen kaynaklarını korumamız gerekmektedir. Türkiye yerli hayvan kaynakları bakımından zengin çeşitliliğe sahiptir. Gen kaynaklarımızı korumak amacıyla önemli olan yerli ırklarımızın genetik yapılarının moleküler açıdan tanımlanması, ırklar içi ve ırklar arasında bulunan farklılıkların belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

AKÇA, N., 2016. Halk Elinde Yetiştirilen Karacadağ Zom Koyununun Süt Bileşimi ve Süt Verim Özellikleri. Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.1-46.

AKÇA, N., VURAL, M.E., KARATAŞ, A., İPEK, P., KONCAGÜL, S. ve BİNGÖL, M., 2012. Halk Elinde Yetiştirilen Karacadağ Zom Koyununun Döl ve Süt Verimi ile Büyüme, Gelişme ve Dış Yapı Özelliklerinin Belirlenmesi. Sonuç Raporu. TAGEM/ HAYSÜD/ 10/08/01/04, Diyarbakır

AKÇAPINAR, H., 1994. Koyun Yetiştiriciliği. Medisan Yayın Serisi, Ankara, s1-4

AKMAN, N., ve TATAR, A., 2006. Türkiye ve AB'nde Hayvancılık, Pankobirlik Dergisi, Sayı: 85, Ankara

ANONİM, 2006. https://www.uniprot.org/

DOTSEV, A. V., KUNZ, E., KHARZINOVA, V. R., OKHLOPKOV, I. M., LV, F. H., LI, M. H. and ZINOVIEVA, N. A., 2021. Mitochondrial DNA Analysis Clarifies Taxonomic Status of the Northernmost Snow Sheep (Ovis nivicola) Population. Life, 11(3): 252.

ENDRE, K., AKOS, M. A., LEVENTE, H., KATA, A., PETRA, Z., KAROLYN, T., and ANDRAS, G., 2020. Characterisation of Hungarian Cikta sheep based on the control region of mtDNA. Magyar Allatorvosok Lapja,*142*(7): 421-428.

GONÇALVES, G. L., MOREIRA, G. R., FREITAS, T. R., HEPP, D., PASSOS, D. T. and WEIMER, T. A. 2010. Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. Animal genetics, 41(3): 308–310.

GORKHALI, N. A., JIANG, L., SHRESTHA, B. S., HE, X. H., JUNZHAO, Q., HAN, J. L. and MA, Y. H., 2016. High occurrence of mitochondrial heteroplasmy in nepalese indigenous sheep (Ovis aries) compared to chinese sheep.Mitochondrial DNA Part A, 27(4): 2645-2647.

GUANGXIN, E., YONG, JU. Z., RI, SU. N., YUE, HUI. M. and JIA, HUA. Z., 2016. Meta-analysis evidence of maternal lineages in Chinese Tibetan sheep using mtDNA D - loop panel. Mitochondrial DNA Cilt 28(4): 579–583.

HIENDLEDER, S., MAINZ, K., PLANTE, Y. and LEWALSKI, H., 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources. No evidence for contributions from Urial and Argali sheep. J Hered., 89:113–120.

HİENDLEDER, S., HECHT, W., DZAPO, V. and WASSMUTH, R. 1992. Ovine mitochondrial DNA: restriction enzyme analysis, mapping and sequencing data. Animal genetics, 23(2): 151–160.

HUSSAIN K., ROZEWICKI, J., and YAMADA, K. D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in bioinformatics, 20(4), 1160-1166.

IRWIN, D. M., KOCHER, T. D. and WıLSON, A. C. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. Journal of molecular evolution, 32(2): 128–144.

KONCAGÜL, S., AKÇA, N., VURAL, M.E., KARATAŞ, A. ve BİNGOL, M., 2012b. Zom Koyunlarının Morfolojik Özellikleri. Kafkas Univ. Vet.Fak.Derg., 18(5):829-837

KONCAGÜL, S., KARATAŞ, A., AKÇA, N., VURAL, M.E.ve BİNGOL, M., 2012a. Factor Affecting Lactation Milk Yield and Some Lactation Characteristics of Zom Sheep in Farmer Conditions. Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech. 2 (4): 87-93

KONCAGÜL, S., VURAL, M.E., KARATAŞ, A., AKÇA, N. ve BİNGOL, M., 2013. Reproductive Performance Ewes and Growth Characteristics of Lambs in Zom Sheep Reared in Karacadağ District. Kafkas Univ. Vet.Fak.Derg., 19(1):63-68

KUTLU, H.R., GÜL, A. ve GÖRGÜLÜ, M., 2004. Türkiye Hayvancılığının Sorunları ve Çözüm Yolları. Yem Magazin Dergisi, 35:36-37.

MEADOWS, J. R., HIENDLEDER, S. and KIJAS, J. W. 2011. Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. Heredity, 106(4): 700–706.

MEADOWS, J.R., CEMAL, I., KARACA, O., GOOTWINE, E. and KIJAS, J.W., 2007. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. Genetics, 175(3):1371-1379.

NADERI, S., REZAEI, H. R., TABERLET, P., ZUNDEL, S., RAFAT, S.A., NAGHASH, H. R., EL-BARODY, M. A., ERTUGRUL, O. and POMPANON, F., 2007. Econogene Consortium. Large-scale mitochondrial DNAanalysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity. PLoS ONE, 2(10):1012.

RESENDE, A., GONÇALVES, J., MUIGAI A.W.T. and PEREIRA, F., 2016. Mitochondrial DNA variation of domestic sheep (Ovis aries) in Kenya. Animal genetics, 47(3): 377-81.

REVELO, H.A., LÓPEZ-ALVAREZ, D., LANDI, V., RİZZO, L. and ANGELA, L. 2020 Alvarez. Mitochondrial DNA Variations in Colombian Creole Sheep Confirm an Iberian Origin and Shed Light on the Dynamics of Introduction Events of African Genotypes. Journals Animals, 10(9):1594.

SAITOU, N. and NEI, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution,4(4):406-425.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. and KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, 28(10), 2731-2739.

WANG, J., SHI, Y., ELZO, M. A., DANG, S., JIA, X. and LAI, S. 2018. Genetic diversity of ATP8 and ATP6 genes is associated with high-altitude adaptation in yak. Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis, 29(3): 385–393.

WILKINS, L., WOTTON, S.B., PARKMAN, I.D., KETTLEWELL, P.J. and GRIFFITHS, P., 1999. Constant current stunning effect on bird welfare and carcass quality. Journal of Applied Animal Welfare Science 8: 465-471.

YAĞCI, S., BAŞ, S. ve KİRAZ, S., 2020. Study of mitochondrial DNA (mtDNA) D -loop region polymorphism in Şavak Akkaraman sheep. Turk J Vet Anim Sci., 44: 323-330.

ZHANG, B., CHEN, H., HUA, L., ZHANG, C., KANG, X., WANG, X., PAN, C., LAN, X. and LEİ, C. 2008. Novel SNPs of the mtDNA ND5 gene and their associations with several growth traits in the Nanyang cattle breed. Biochemical genetics, 46(5-6): 362–368.