

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
2019-YL-164

**YERLİ KIL KEÇİLERİNDE LEPTİN GEN
POLİMORFİZMİ VE BÜYÜME ÖZELLİKLERİ
İLE İLİŞKİSİ**

Neşe CANKARA

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim CEMAL

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜ DÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Zootekni Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Neşe CANKARA tarafından hazırlanan Yerli Kıl Keçilerinde Leptin Gen Polimorfizmi ve Büyüme Özellikleri ile İlişkisi başlıklı tez 04.12.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Cengiz ELMACI	Bursa Uludağ Ün.	
Üye —:	Prof.Dr. İbrahim CEMAL	ADÜ	
Üye —:	Doç.Dr. Onur YILMAZ	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

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

04/12/2019

Neşe CANKARA

ÖZET

YERLİ KIL KEÇİLERİNDE LEPTİN GEN POLİMORFİZMİ VE BÜYÜME ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİ

Neşe CANKARA

Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim CEMAL

2019, 59 Sayfa

Aydın ve Denizli illerinde, yetiştirici koşullarında bulunan yerli Kıl keçilerinde yapılan bu çalışmada, leptin geni bakımından var olan polimorfizmin tanımlanması ve oğlakların büyüme özellikleri bakımından genotipler arası farklılıkların ortaya konması amaçlanmıştır. Araştırmanın hayvan materyalini farklı işletmelerden örneklenen 155 baş oğlak oluşturmuştur. Doğumu takiben oğlakların gelişme özellikleri 5.5 aylık yaşa kadar izlenmiştir. Oğlaklardan 3.5 aylık yaşta alınan kan örneklerinden DNA elde edilmiştir. Ardından, leptin geninin Exon 1 bölgesindeki 412 bp uzunluğundaki kısım, bu diziyeye özgü primer çifti kullanılarak PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. PCR ile çoğaltılan bölgedeki nükleotid polimorfizmini ortaya koymak için RFLP yöntemi uygulanarak PCR ürünleri *NmuCI* (*Tsp45I*) restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutulmuştur. Enzim kesimi sonunda agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılan DNA bantlarından bireylerin genotipleri tespit edilmiştir. Ardından, genotip bilgileri ile oğlak gelişme özelliklerine ait fenotipik veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek bulgular özetlenmiştir. İncelenen 155 bireylik örnekleme CC genotipine hiç rastlanmamış, 150 birey TT, kalan 5 birey ise TC genotipli olarak tespit edilmiştir. TT, TC ve CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0.967, 0.033 ve 0.000 bulunmuştur. T ve C allellerinin frekansları ise sırasıyla 0.984 ve 0.016 olarak hesaplanmıştır. Aydın ve Denizli illeri için genotip ve allel frekansları benzerlik sergilemiştir. İncelenen SNP bakımından Kıl Keçi popülasyonunun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak önemli çıkmasa da incelenen oğlak büyüme özelliklerinin tamamı (doğum ağırlığı, 3.5 ve 5.5 aylık yaştaki canlı ağırlıklar, iki farklı döneme ait OGCAA) bakımından TT genotipli bireylerin ortalaması TC genotipli bireylerden belirgin derecede yüksektir. Büyüme özellikleri bakımından

TT genotipli bireylerin TC genotipli bireylere nispetle ortaya koyduğu yüksek performans bulgusu, çok daha geniş bir hayvan materyalinde leptin geninin tamamının DNA dizilemesine ve performansla ilişkilendirilmesine dayalı daha detaylı ek çalışmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kıl keçisi, Büyüme özellikleri, Leptin geni, PCR-RFLP



ABSTRACT

LEPTIN GENE POLYMORPHISM AND ITS ASSOCIATION WITH GROWTH TRAITS IN NATIVE KIL GOATS

Neşe CANKARA

Master of Science Thesis, Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim CEMAL

2019, 59 Pages

In this study, it was aimed to identify the polymorphism of leptin gene and to determine whether there is a difference between genotypes in terms of growth characteristics of kids. The animal material of the study consisted of 155 kids sampled from different farms. The growth characteristics of the kids were observed from birth to 5.5 months of age. DNA was obtained from blood samples taken from kids at the age of 3.5 months. Subsequently, the 412 bp length region in the Exon 1 region of the leptin gene was amplified by PCR technique using the primer pair specific for that region. In order to reveal the nucleotide polymorphism in the region amplified by PCR, RFLP method was applied and PCR products were cut with NmuCI (Tsp45I) restriction enzyme. Genotypes of the individuals were determined from the band profiles obtained by separating the DNA fragments formed after enzyme cutting by agarose gel electrophoresis. Then, genotype and growth performance data of kids were analyzed by statistical methods and findings were summarized. In the sample of 155 individuals, no CC genotype was detected, 150 individuals were identified as TT and the remaining 5 individuals were identified as TC genotypes. The frequencies of TT, TC and CC genotypes were 0.967, 0.033 and 0.000, respectively. Allele frequencies for T and C were 0.984 and 0.016, respectively. Genotype and allele frequencies were similar for Aydın and Denizli provinces. In terms of the SNP examined, the Kil goat population was found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. Although not statistically significant, the average of TT genotypes was significantly higher than the TC genotypes in terms of all of the growth characteristics of the kids examined (birth weight, live weights at 3.5 and 5.5 months of age, average daily gain for two different periods). The high performance finding of TT genotypes relative to TC

genotypes in terms of growth characteristics necessitates further detailed studies based on DNA sequencing of the entire leptin gene and its associations with growth data in a much larger animal material.

Key Words: K11 goat, Growth characteristics, leptin gene, PCR-RFLP



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimlerinden yararlandığım her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm, tez çalışmamda beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim CEMAL'e,

Çalışmanın laboratuvar analizlerinde bana özveri ile yardımcı olan ve birçok tekniği öğrenmeme öncü olan, desteğini hiç esirgemeyen Araş. Gör. Neziha ATA'ya,

Çalışma kapsamında elde ettiğim fenotipik ve genetik verilerin istatistiksel analizleri konusunda destek veren, Tez savunma jürimde yer alarak değerli katkılar yapan Doç. Dr. Onur YILMAZ'a,

Değerli görüşleri ve eleştirileri ile son halini almasına katkı sağlayan tez savunma sınavımın jüri başkanı Sayın Prof. Dr. Cengiz ELMACI'ya,

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için her türlü laboratuvar altyapısı sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADÜ-TARBİYOMER)'nin şekillenmesinde emeği geçenlere, birimin yönetimine ve çalışanlarına,

Kan örneklerini ve fenotipik verileri aldığım hayvan materyalinin dahil olduğu "Halk Elinde Hayvan Islahı Ülkesel Projesi"ni koordine eden TAGEM'e, materyal sağlayan Aydın ve Denizli illerindeki keçi yetiştiricilerine ve alt proje çalışanlarına,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için ZRF-15074 nolu proje ile gerekli maddi desteği sağlayan ADÜ-Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinatörlüğüne ve

Yüksek Lisansta dahil olmak üzere tüm eğitim-öğretim sürecinde bana her türlü maddi olanağı ve manevi desteği sağlayan sevgili annem Şerife CANKARA'ya ve rahmetli babam Ali CANKARA'ya

Sonsuz teşekkür ederim.

Neşe CANKARA

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK KURUL KARARI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
EKLER DİZİNİ.....	xxi
1 . GİRİŞ	1
2 . KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 . Keçi Yetiştiriciliği.....	6
2.2 . Kıl Keçisi ve özellikleri.....	8
2.3 . Leptin Geni.....	10
2.3.1 Keçide Leptin Genine Yönelik Yapılan Çalışmalar	12
2.3.2 Farklı Hayvan Türlerinden Leptin Genine Yönelik Yapılan Araştırmalar	13
2.4 Çalışma İle İlgili Moleküler Genetik Teknikler	14
2.4.1 DNA izolasyonu.....	14
2.4.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	14
2.4.3 Restiriksiyon Endonükleazlar.....	15
2.4.4 RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)	15
2.4.5 Agaroz Jel Elektoroforezi.....	16
3 . MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 . Hayvan Materyali.....	17
3.2 . Yöntem.....	18
3.2.1 Çalışma Olanakları.....	18
3.2.2 Kan örneklerinin toplanması ve DNA ekstraksiyonu	18

3.2.3 PCR ile Leptin Genine Ait Bölgenin Çoğaltımı	18
3.2.4 PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesimi	20
3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi	21
3.2.6 Verilere Yönelik İstatistiki Değerlendirmeler	22
4 . BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1 PCR ve PCR-RFLP Ürünlerine Ait Elektroforez Sonuçları.....	23
4.2 Genotipler ve Popülasyon İstatistikleri.....	24
4.3 Oğlak Büyüme Özelliklerinin Leptin Genotiplerine Göre Değişimi.....	26
5 . SONUÇ	29
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	37

KISALTMALAR DİZİNİ

bç	: baz çifti
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
mM	: milimolar
M	: molar
mg	: miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ng	: nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction – Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: piko mol
RE	: restriksiyon Enzimi
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism – Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism – Tek Nükleotid Değişimi
SSCP	: Single Strand Conformational Polymorphism – Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris Borat EDTA
UV	: Ultra violet
V	: Volt
µl	: mikro litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İllere göre keçi sayıları ve keçi yetiştiriciliğinin yoğun olduğu bölgeler

Şekil 2.1. Kıl Keçisi

Şekil 2.2. Leptin geninin yapısı (Taniguchi vd., 2002)

Şekil 2.3. Leptin genindeki mutasyona (g.117 T > C) ait PCR–RFLP jel görüntüsü

Şekil 3.1. Kıl keçisi sürüsü

Şekil 3.2. Kıl keçisi oğlakları

Şekil 3.3. UV ışığının altında safe view ile boyanmış agaroz jelin görüntüsü

Şekil 4.1. 412 bç uzunluğundaki PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı

Şekil 4.2. PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kıl Keçilerinde leptin geni polimorfizminin belirlenmesi için kullanılan primer seti

Çizelge 3.2. Bölgenin çoğaltılması için hazırlanan PCR karışımındaki ürünlerin son konsantrasyonları

Çizelge 3.3. PCR yükseltgenme koşulları

Çizelge 3.4. Leptin Geninin T ve C allellerinin ayrımı için kullanılan bileşenler

Çizelge 4.1. Kıl keçilerinde leptin genotiplerine ilişkin gözlenen sayılar ve genotip frekansları

Çizelge 4.2. Örneklenen tüm bireylerde leptin geni gözlenen allel frekansları

Çizelge 4.3. Aydın ve Denizli illerindeki bireyler için leptin geni gözlenen allel frekansları

Çizelge 4.4. İller ve örneklem geneli için gözlenen ve beklenen genotip sayıları ile Hardy-Weinberg denge kontrolüne yönelik ki-kare analiz sonuçları

Çizelge 4.5. Leptin genotipleri ve diğer etkisi muhtemel faktörlere ait seviyeler bakımından oğlak büyüme özelliklerine ait en küçük kareler ortalama ve standart hataları

EKLER DİZİNİ

Ek-1. Keçi leptin geninin tamamına (NCBI Acces no: JQ739233) ve çalışmamızda incelenen exon 1 bölgesinin 412 bç'lik kısmına ait DNA dizi bilgisi

GCCTCTTCCCAGGGAGCCCACTTTGCAATCCTGTGATATCTTGTCTTCTTGCAGAGCTC
 TTTCTTAAAAATATATATATATATATTATTATTCTTAATTGAAGGATAAATTGCTTTACAAT
 ATTGTGTTGGTTTCAGCCATACTTCCAGAGCTCTTTCCTCCTGTATTGATATGGCCTGTT
 AACTATCTTCCCTATTAAACTGTAAACACTTTGAGAGTAAAAACATCCGTTGTTCACTG
 TGGCATCCTTGGTGCCAGCACTGCGTCTGACATTATCAGACCTTCTGTAAGTGGCTGTT
 GGAGTCAGGCTCCCAAAGGGAGAGAAAAGAAGTAATAAAGCCAGTAGTAAATGCCATCACG
 GAGGTATCGGCGTGCTGCTGTGAGAGAGTAATGAAGAGGACAGTCACATAATCTCTAATA
 ATAGGGTAGTAATAGAGAACCCTTTCACAACCTCCTTTAAAGCTCTTTCACGCGCATTATCT
 AATTTGATCCTCATAAAACCCTGCAGATAGGTACATTGCAGGGGATAACAGGGGGAGTTTT
 TAGCGGTTATGGGATATGCCTGAAGTCGTGCAGCTATTTAATGCCTGGATTCAAACCAGA
 CCTTAAAAGCCCCGCTCCATCCGCTCATGCCCTGGCTCACTGCTGTGTGGTCTACAGCA
 CACCTCACTGTGGTTTTCTTGATTCCACCGCACCTCTCTCCAGGGGAATGCATTTCAATTA
 CTGTTATTTCTAGACAATAAATTATCTTTGAGGAGATGATAGCCACGGCAGACAGCAGAT
 CTCGTTGTTATCCGCATCCAAAGACATGG**ATGTGGGTGGTAACGGAGCA**CATGGGTGTT**C**
TCGGAGAGCTGGCGATGTGCCACGTGTGGTTTTCTTCTGTTTTTCAGGCCCCAGAAGCCCAT
CCCGGAAGGAAAATGCGCTGTGGACCCCTGTACCGATTCTGTGGCTTTGGCCCTATCT
CTCCTACGTGGAGGCTGTGCCATCCGCAAGGTCCAGGATGACACCAAACCCTCATCAA
GACGATTTGCACCAGGATCAATGACATCTCACACACGGTAGGGAAGGACTGGAAGATGAG
GTAGAACCCTGGCCATCCCGTGGGGGACCCAGAGGTTGGCAGAGGAGGCTGTGCAGCCT
TGCACAGGGCCCCAGCGGCCTGGATGCCCCACTAGTGACAGACAGCTCCTCTCCTCAT
CCACTTCCCTTGCCCTCCACCTTCTCACTCTCCTCCCTACCAGACCCGAATCCTAGTGCC
 CAGGCCAGAGGGAGTCACAAAGGTCCCGGTGTCCCCTTGGCAGGTGGCCAGAACCCAG
 CAGCACTCCCTCTGGGCTCCATCTCATTCTAGAAATGTTTTAGTCATTAGGCATTCTTC
 CCGGCTGGTAGCTGAGCTCCAACCCTGCGAAGCTTCTCCTCATCACTGCCAGCCCTGCC
 ATCAAGCCCTCTCAGATAACAACCCTCTGTGTTTTTGCAAACAGTTATCAGTGTCTCTTG
 GGGCATTTTTTCTGAGGTCCGCAAGCTCAGACCTGCAACCACAGATGAGGTCTGTATTTA
 GAATGAGGGAGATGAAGTGTGACTTCTCACCCCTTCTGTTCTCTGTCTGTAAAGTCTTAAG
 CTGGTCAGCTTCCACAAAGTCTTTAAACTCCAGTTTTCTCATCTAGAAAATGAAAGTGGG
 AAAGTGTAGTTGCTCAGTCATGTCCAACCTTTTGGAGACTCCATGAACTGTAGTCTACCA
 GGCTCTTCTGTCCATGAAATTCTTCAGGCAAGAATACTGGAGTGGCTTGTCAATTTCTCTT
 CCCCACGAGATCTTCCCAACCCAGGGAATGAACCCAGGTCTTCTGCATTGCAGGCGGAT
 TCTTTACCATCTGAGCCACCAGGGAACCCATAAGACCTTGTGAAGACTATTAAGATAGT
 CATCTAGACAACAGGACTATCTTAATAGTCTTCATAAGGTCTTCATGAGACTAAATTAGA
 TAAAGCAAGTGACCCTCCCTGCATAACCCTTGCAGAACCAGAAGTGTGTATGCCCTCTTTC
 AAGGTTTTTCAGTCATAACTTTTTGATAGCTTCCACCTTAAAAGCCAACCTTGTCTACCTGC
 GTGGAGCAATCTGGAGACTTCCACATCTCCTGACCACTCTATATTTCTAACAGTGGCTTT
 GGGCAGCCAGGGAGAAGTTAGGTGGCCAGAAGCAGGGACAGATCAGAAAATAGACAGCGTC
 TGCATTTCTAGAGAAAAGCCTTTAAATTCTTGTCTTTCAAAACAGTCTTTCAACAAGCT
 GTACACAATAGACCCAGAGGGGTGCGACAGAGTCAGACACGACTGAAGCGACTTAGCAGC
 AGCAGCAGCAGCCCCAACCTGTGTGGTGCCGGGATTGATTGCTGTGGGTGGCGGGGAAAG
 GGAGAACCCTCCTGGTAACCAGGGTTACTTGAGTAGAGCAGTGAAGTGGGGCATCGCTG
 GGGTCATGGCCTGAATCTCTTAGGGATTGAGACTTCTGGAGAATCTGACTGTGAGGGAG
 GAGTCTGCTTGGGGTGAAGAGCTGGGGACGGGAATGTATGGAAGACCTCAGTGCCTGG

GGAAGAGACTCAAGCAGGAAATAGGGAGTCATGGCTTGTTCTATAGCAGAGTCATTTGGA
AAAGGGAACAGCCTGCAAAGGCTGGTCTGGAAGCAAAGGGCAGGGTGGTTTTGGGAAGGGC
AGAAAGATAGGAGCCCAGGACACCAGCTTGGAAGAATGGCGGCCACATGGGCACAAGAAG
TAAGGGTCCAGGGAGGATGGTGTGGAGGGGAGGGGAGGAAGCACCTCTACACTCGAGGGA
AAGGCTGAGTTGGGGAGCTTTGAGGAGCCGCCCTCTCTCCCACTGAGCTCTTGCTGTCCC
CTTCTCCTGCATAGCAGTCCGTCTCCTCCAAACAGAGGGTCACTGGTTTTGGACTTCATC
CCTGGGCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCAATCTACCAA
CAGATCCTCGCCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAATATCTAATGACCTGGAGAAC
CTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCCTCCAAGAGCTGCCCTTACCACAGGTGAGG
GCCCTGGAGAGCTTGAGAGGCCTGGGCGTCGTCTGGAAGCCTCCCTCTACTCCACCAG
GTGGTGGCCCTGAGCCGGCTACAGGGGTCTCTACAGGACATGTTGCGGCAGCTGGACCTC
AGCCCTGGGTGCTGAAGCCTTGAAGGCCTCTCTTCCCAAAGTCCAGGGAAGAAACCTGAG
CTTCTGGCTGTCTGCAGAAGAGAGCCTATGTGGGCATCCTTTATGCAGGCCAGCGGGCCA
TTTCTCTCTTGCTCCTCTCAGCTGCTCTTCCAAAGGCAGAAAACCTGCGAGGCAGGAAACC
AAAGATATAAATACAGGTTCCATGCCACCAGGAAGGGGGGCCATCCAGCAAACAGTAG
ACTGGAGCTGGGATTTTCGCAGCAGTCTTCTCCTGTTCCAGCTCCGTCTCACTGCATG
CTTCAGCATGACCTGGGATGATTTTCAGAGCCTTTGGACCATCAAGCAAGATTCCCTCTGA
GAATCCAGGGAGCATCATGAAGGCTACGGGCACATACAGCTGGATATTCCCACACAACAC
ATGATGGAAGCATTATTTATTTATTAATTATGCATTTTATTCTGAATGGATTTGAAGCAAGAC
ACCAGCTTTTCCAGGCTCTTTGGGGTCACTGGGGTGAAGGATGCTACTGGGGTGCCCAT
CGACAGGCCTCAGCGAGGCAAACCCATTTTGAAGTACTTGAAGGCTCTCAAGTTTGTCT
CCAGGGACTGGCTTTGTTTCTACTGTGACTGACTTTAAATTACAGTGTGGCAATGGCAT
TGCTCTGAATGGATCTCGAAGGACCAAGTTATTTTAAAAAGAAGAAGATTTTGTCAAGT
GTAATATATCGCTGGGTATACCCAGAGGTGGGAAATGTGTTGATGGAGGGTGGGGAGATC
CAGAATGTGTTTTCTGAATAACATTTTTGTGATGGACTCTTTGGATGGGGTGAATCATCT
TCTCATCTTTGCGTTTTTCATGAGGAGATGACTCCTTCGGGGGGGGATGATGTGGGGGTT
TGCTAACCATCCATGGATTGAGTGGTGGGGTACTGAAGCTGAAGGCCATAGGGATAGTG
GTGAGCTCTGGCCTTCTCTGACTGTTAGAGAGTGGTCTTGCTCATCAGGAAGTGAAGACC
CCACTGGAGATGGTATCCCCAGAACAGGGATCCTTGGTGTATGGTCTGGGTGACCC
CACGTTGTATTGATAACATGGTCTGACCTTCTTTGGGATTTGCATGCTCACCCAAAGCA
AGGCCATGCTTCCCATCCATTTGGGAAGGATTTTTATTCCAGTGGGAGGGGGAAGTATTC
CAGCGTGGGCTTCAGTGGATGGTCCCTCGACCTGGGTGAGCAATGGGTGAGTGGAGGCC
GAGACCCAGGACCAGCCCCAGGAGCCTCCTTCTCACTAGTGGTGTATGTGCAGTAGAAC
AAAGGAGGAGGCTTGGGTTTCCCACCATCCTGCCATTGTGATGCAGCCATCACACGACAG
GAGGTGGATCAGTCCAAGGAAATGGAATCTAAGCAACCAATTTTAAGACTGAGCACCTA
CTTGTGCTCAGCCCCAACTGGTGTATGGGCTGAGAAGCTCACCAAATAAATATTTAAAT
GCAAGCCCTGCCCTCAGGGACCTTGCAATCCAGATGGTAGAATCCCCTCACCAGCATGC
AAAGGCTGCCGTTTACCATGGCAACCGAGCAGCTGAGACAG

1. GİRİŞ

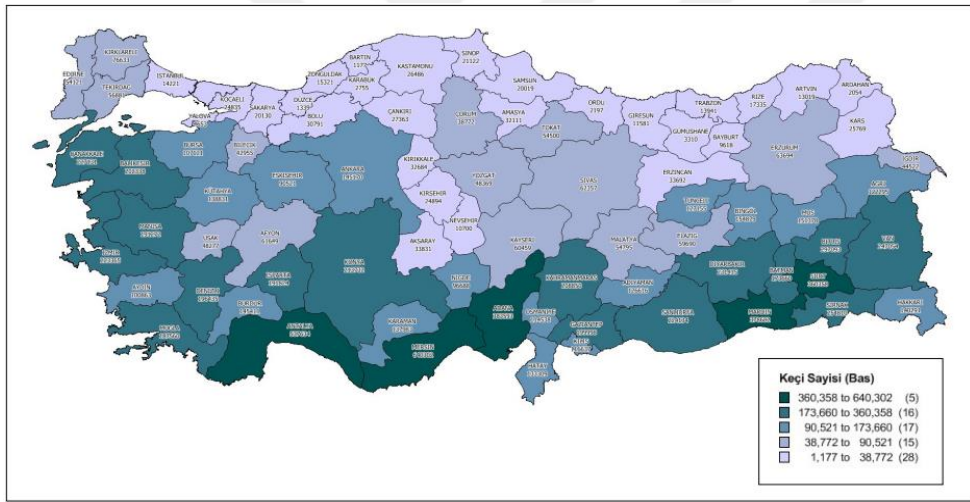
Köklü bir geçmişe sahip şekilde geleneksel olarak yapılan, bölge ve yörelere göre özgünlükler içeren küçükbaş hayvan yetiştiriciliği Türkiye için özel bir öneme sahiptir. Bu hayvanlar verimsiz mera alanlarını, nadasa bırakılan alanları, anız içeren tarlaları, bitkisel üretim için elverişli olmayan alanları, diğer türlerin yararlanamadığı marjinal alanları etkin bir şekilde değerlendirerek, süt, et, yapağı, kıl, ve deri gibi ürünlere dönüştürebilme kabiliyetine sahiptirler. Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin bu önemine karşılık son yıllara kadar koyun ve keçi sayısında önemli ölçülerde gözlemlenen düşüşler üretimde azalmaya neden olmuştur (Kaymakçı vd., 2006).

Halk arasında kara keçi olarak ta anılan Kıl keçisi, Türkiye’de en yaygın olarak yetiştirilen keçi ırkıdır. Kıl keçileri zorlu yetiştirme koşullarına dayanıklı ve kanaatkar hayvanlardır. Sıcak ve soğuğa karşı toleranslı, kötü bakım ve beslenme koşulları ile hastalıklara dayanıklı, sağlam vücut yapısına ve uzun yürüme kabiliyetine sahip, Anadolu’nun her türlü iklim koşulunda, meyilli ve kayalık arazilerde yetiştirilebilen hayvanlardır. Tüm bölgelerde yetiştiriciliği yapılabilen bu ırk sıklıkla, denize yakın ormanlık ve çalılık bölgelerde daha yaygın bulunmaktadır. Geleneksel yapıdaki keçi yetiştiriciliğinin Türkiye ekonomisi içinde de küçümsenemeyecek bir yeri bulunmaktadır. Kültür ırkları için uygun olmayan bölgelerde, sahip oldukları avantajlarla birlikte yetiştirilirken, özellikle orman içi ve kenarı dağ köylerinde yaşayan nüfusun geçim kaynağını ve besin gereksinimlerini karşılayıp bu yörede yaşayan halkın sigortası konumundadırlar. Entansif koşullara ihtiyaç duyan kültür ırklarının, Kıl keçilerinin yetiştirildikleri ekstansif koşullarda yetiştirilmesi durumunda bırakın verim vermeyi yaşamlarını sağlıklı sürdürmeleri olası değildir. Bu sayılan nedenler ile Kıl keçisinin ülke hayvancılığında özel ve sürdürülmesi gereken bir yeri bulunmaktadır.

1960’lı yıllarda 24.632.208 baş olan keçi varlığımız, 2009’lu yıllarda 5.593.561 başa kadar gerilemiş, ancak sonraki yıllarda devlet destekleri ile yetiştiriciler teşvik edilerek 2018 yılı itibarıyla 223.874 baş Tiftik Keçisi ve 10.698.553 baş Kıl Keçisi olarak toplamda 11.367.584 başa kadar yükselmiştir (TUİK, 2019).

Ülkemizdeki keçi varlığının büyük bir kısmını Kıl keçileri oluştururken, az bir kısmını da Tiftik ve Kilis Keçileri oluşturduğu bildirilmektedir (Eker vd., 1975; Tuncel ve Bayındır, 1983). Kıl keçisi her bölgede bulunmakla birlikte en fazla

Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yetiştirilmektedir (Şekil 1.1.). Ege ve Akdeniz bölgelerinde bulunan sürülerin büyük bir çoğunluğu her yıl azalan hatta bazı bölgelerde ortadan kalkmış olan göçebe sürülerden oluşmaktadır (Şengonca ve Koşum 2005; Kaymakçı, 2005; Ertuğrul vd., 2010). Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesindeki Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından koordine edilen genetik kaynak tanımlama ve koruma çalışmaları ile Halk Elinde Hayvan Islahı Ülkesel Projesi kapsamındaki sahada yürütülen son 10-15 yıldaki çalışmalar sonucunda ülkemizde birçok diğer keçi ırkı veya tipinin (Honamlı, Norduz, Mahalli, Kaçkar, Gürcü, Abaza vb) varlığı da ortaya konmuştur.



Şekil 1.1. Türkiye için keçi yetiştiriciliği yoğunluk haritası

Kıl Keçilerinde vücut rengi genellikle siyah olmakla birlikte beyaz, krem, gri tonları, kahverengi ve alaca renklere de rastlanır. Renk dağılımı yetiştirici tercihlerine bağlı olarak sürülere göre büyük değişimler gösterebilmektedir. Keçilerde her iki cinsiyet için, büyük çoğunlukla boynuzluluk ve sakal gözlemlenmektedir. Kıl keçileri kombine verimli olarak nitelenebilir. Belli bir verim yönünde ıslah çalışması son yıllara kadar yapılmamış olmamakla birlikte bölgeler hatta aynı bölgedeki sürüler arasında verim ve morfolojik özellikler yönünde farklılıklar gözlenmektedir. Tekiz doğumlar yoğun olmakla birlikte ikizliğin yüksek olduğu sürülere de rastlanabilmektedir. İyi bakım-besleme koşullarında ikizlikte bir miktar artış görülebilmektedir. Laktasyon süreleri 180-235 gün arası olarak belirlenen keçilerin laktasyondaki süt verimleri 100-130 kg,

sütteki yağ oranları %5-5.5 arasında belirlenmiştir. Dişilerin canlı ağırlıkları 45-65 kg, erkek hayvanların ise 60-90 kg arasındadır. Kıl verimi erkek hayvanlarda 1-2 kg, dişilerde 0.5-1 kg arasındadır (Anonim, 2009).

Ülkemizde geniş bir popülasyona sahip olan Kıl keçilerinin büyük bir bölümü düşük sayılabilecek verim potansiyeline sahiptir. Ancak popülasyondaki çok geniş varyasyon verimlerinin geliştirilebilme olanağına işaret etmektedir. Var olan potansiyelden gereğince yararlanmak için keçi başına verimin, çevre koşulları da dikkate alınarak, yükseltilmesine ihtiyaç vardır. Bunun içinde genetik ıslah çalışmaları ve aynı zamanda iyi bakım ve besleme şartlarının sağlanması gerekmektedir.

Geçtiğimiz son 20 yıla bakıldığında, moleküler genetik alanında yaşanan gelişmeler ile çiftlik hayvanlarının genetiğinin tanımlanmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu teknikler genetik kaynak tanımlama ve koruma yanında ıslah programlarında da etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çiftlik hayvanlarının genetiğine yönelik olarak moleküler markörler (çoğunlukla mikrosatellit ve SNP) kullanılarak yapılan çalışmalarda; DNA seviyesinde genetik varyasyonun ortaya çıkarılması, verimle ilişkili büyük etkili genlerin belirlenmesi, ebeveyn tayinleri ve hatta son yıllarda çip tabanlı SNP markör genotiplemelerine dayalı genomik seleksiyon çalışmaları etkin bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Sığır, koyun, domuz gibi çiftlik hayvanlarında genetik çalışmalar yoğun olarak yapılmakla birlikte, keçiler ile ilgili çalışmalar daha sınırlı olup son yıllarda bir miktar artış göstermiştir.

Son yıllarda insan da dahil olmak üzere birçok türde yoğun araştırmalara konu olan genlerden biri de Leptin (LEP) genidir (obezite geni). Toplam 167 aminoasitten oluşan hormonal bir protein ürünün kodlanmasında sorumlu bölgeye verilen bir isim olup ilk olarak (Zhang vd., 1994) tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu gen bölgesinin kodladığı molekül ağırlığı 16 kilodalton olan polipeptid, tek zincirli yapıda bir hormondur (Christos and Mantzoros, 1999; Meier and Gressner, 2004). Leptin adipoz (yağ) dokulardan sentezlenip kan dolaşımına salınmaktadır (Frederich vd., 1995; Friedman ve Halaa, 1998; Houseknecht vd., 1998). Leptin geni vücut enerji dengesinin düzenlenmesinde, besin alınımında, üremede etkili olan bir proteini kodlar (Houseknecht vd., 1998). Diğer çiftlik hayvanlarında olduğu gibi keçide de leptin geni varyantlarının büyüme özelliklerini etkilemesi olasıdır. Leptin geni polimorfizmi ile keçilerde büyüme özellikleri arası ilişkilerin

tanımlanması keçi yetiştiriciliğine yönelik yapılacak seleksiyon programlarına bu gene yönelik tanımlamaların entegre edilip edilemeyeceği yönünde yol gösterici olabilecektir.

Yapılan ayrıntılı literatür taramasında keçilerde leptin geni ile ilgili yapılan çalışmaların çok sınırlı olduğu görülmüştür. Wang ve ark. (2015) tarafından Çin'deki 5 keçi ırkında yapılan çalışmada LEP geni polimorfizmi DNA dizi analizi ve PCR-RFLP yöntemleri ile tanımlanmış ve yeni SNP'ler belirlenmiştir. Çalışmada, LEP geni polimorfizmi ile Çin Nanjiang Sarı keçisinin büyüme özellikleri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Maitra ve ark. (2014) Hindistan'daki 7 keçi ırkında leptin geninin tamamının DNA dizilimini 13 primer çifti ile çıkartarak 7 yeni SNP tanımlamışlardır. Hindistan'da bulunan Jamunapari ve Barbari keçi ırklarına yönelik bir çalışmada ise (Singh vd., 2009) leptin geninin exon 2 ve intron 2 bölgeleri DNA dizi analizi ile incelenmiş ve incelenen her iki bölgede de birer mutasyon tespit edilmiştir.

Kıl keçisi ıslahına yönelik en etkin çalışma Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından 2005 yılında yerli koyun ırklarının ıslahına yönelik başlatılan ve 2011 yılında değişik illerde devreye sokulan Kıl keçisi tanımlama ve ıslahına yönelik alt projeleri kapsayan "Halk Elinde Hayvan Islahı Ülkesel Projesi"dir. Proje kapsamında Denizli ve Aydın illerinde sırasıyla 2011 ve 2012 yıllarında alt projeler başlatılmış, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümünden araştırmacılar tarafından yürütülen bu alt projeler kapsamında ırkın temel fizyolojik ve morfolojik özelliklerinin tanımlanması yanında büyüme özellikleri bakımından ıslahına yönelik çalışmalar, babalık testlerine yönelik moleküler genetik analizlerin de kullanılmasıyla sürdürülmektedir. Islah etkinliklerini daha da etkin kılacak markör destekli seleksiyon veya nihai olarak genomik seleksiyon çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır.

Ülkemizdeki keçi ırklarında leptin geninin karakterizasyonuna yönelik yapılan tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Bakırcıoğlu ve Özbatak (2016) tarafından yapılan çalışmada; Ankara, Kıl ve Kilis keçilerinde Leptin geni 2. ekzon ve 2. İntronu DNA dizi analizi ile incelenmiş ve haplotipler belirlenmiştir. Çalışmada, hayvanların performans özellikleri ele alınmamıştır. Kıl keçisi başta olmak üzere ülkemizdeki keçi ırklarında leptin geni exon 1 bölgesi polimorfizmini ortaya koyan ve en önemlisi genetik varyantlar ile verim özellikleri arası ilişkisi

tanımlamaya yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu eksikliği gidermek için gerçekleştirilen bu tez çalışması ile Aydın ve/veya Denizli illerinde de yetiştiriciliği yapılan yerli Kıl keçilerinde leptin geni exon 1 bölgesi bakımından polimorfizmin tanımlanması ve oğlakların büyüme özelliklerinin leptin geni genotiplerine göre değişiminin ortaya konması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Keçi Yetiştiriciliği

Keçi (*Capra hircus*) ilk evciltelen hayvanlardan biridir. Yapılan kazılardan elde edilmiş olan arkeolojik bulgulara göre keçiler yaklaşık günümüzden 10-11 bin öncesinden beri insanlarla simbiyotik ilişki içindedir ve ilk çağlardan beri et, lif, deri ve süt ürünleri için insanlar tarafından yetiştirilmektedir. (Ensminger ve Parker, 1986; Naderi vd., 2008).

Dünya keçi popülasyonunun %90'a yakınının gelişmekte olan ülkelerde olmasının temelinde keçi türünün ekstansif yetiştiriciliğe diğer çiftlik hayvanlarına göre daha uyumlu olması yatmaktadır. Orman ve orman içi bölgelerde yaşayan kırsal kesimin, doğal kaynaklarla nispeten masrafsız yetiştirebildikleri keçiler ilk akla gelen hayvan türüdür. Bu faaliyet kırsal alanda yaşayan ailelerin önemli bir geçim ve besin kaynağıdır.

Dünyada var olan diğer hayvan türleri ile karşılaştırıldığında keçilerin yaygın olarak yetiştirilme nedeni; çevre şartlarına olan adaptasyon yeteneği, birçok hastalık ve parazitlere karşı dirençli olmaları, insan elinde yetiştirildikleri şartlarda farklı beslenme ve bakım koşullarına olan uyum yeteneklerinden kaynaklanmaktadır.

Dünya genelinde bakıldığında keçi popülasyonu %63'ü Asya'da, % 29'u Afrika'da ve % 2.3'lük küçük bir kesimi Avrupa kıtasında bulunmaktadır (Anonymous 2004). Asya ve Afrika'da yetiştirilen keçilerin büyük bir çoğunluğu ıslah edilmemiş, geleneksel yetiştirme sistemleri ile yetiştiriciliklerine devam edilen düşük verimli ırklardan oluşmaktadır. Sosyo-ekonomik düzeyin arttığı gelişmiş ülkelerde keçi sayısında bir düşüş gözlemlenmektedir (Yargıcı, 1990).

Türkiye'de çok yönlü tarımsal üretim yapan işletmelerde hayvancılık önemli bir yere sahiptir. Fakat Türkiye'de daha çok küçük işletmelerden oluşan bir tarımsal yapılanma gözlemlenmekte ve bu işletmelerde hayvancılık kolu ekstansif bir görünüm sergilemektedir. Dağlık alanlarda bu görünüm daha da yaygın gözlenmekte ve bunun sonucunda doğal kaynaklara bağımlılık zorunlu hale

gelmektedir. Bu bölgelerde keçi yetiştiriciliği sahip olduğu avantajlar ile ön plana çıkmaktadır.

Ülkemizde doğal kaynaklar ve ekonomik koşullar göz önüne alındığında, keçi yetiştiriciliği, önemli bir yer tutmaktadır (Anonim, 2001). Türkiye’de keçi yetiştiriciliği doğaya bağlı ve daha çok ilkel koşullar ile yürütülen bir hayvansal üretim dalıdır. Ülkemizde yapılan keçi yetiştiriciliği faaliyetleri başka hiçbir şekilde değerlendirilemeyecek dağlık, fundalık, taşlık arazi gibi bölgelerde yoğunluk kazanmıştır. Çeşitli yem maddelerine karşı seçici olmaması, oransal süt veriminin, ekstansif koşullarda yetiştirilen diğer çiftlik hayvanlarından daha yüksek olması gibi faktörler keçinin önemli özelliklerindedir (Şengonca, 1989).

Keçi yetiştiriciliği, elde edilen ürünlerle beslenme, giyinme barınma ihtiyaçlarının giderilmesi gibi benzeri konularda ekonomik bir unsur olduğu kadar, manevi olarak da tarihi süreç içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye’de keçi yetiştiriciliği; yaylacılık veya göçer sürüler olarak, tarım işletmesi içinde, köy sürülerinde hala daha devam etmektedir (Kaymakçı ve Dellal, 2006; Kaymakçı ve Taşkın, 2006b).

Keçi yetiştiriciliğinin genel görünümü gelişmekte olan ülkelerde, şehir dışında yaşayan düşük gelirli ailelerin, küçük ölçekli işletmelerin veya hiç toprağı olmayan yetiştiricilerin gerçekleştirdikleri bir üretim dalı olarak karşımıza çıkmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde keçi varlığı yerli ırklardan oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde yapılan keçi yetiştiriciliği daha çok uygun olmayan çevre koşullarında gerçekleştirildiğinden, gelişmiş ülkelerde elde edilen keçi başına düşen verim ile kıyaslandığında oldukça geri düzeydedir (Kaymakçı, 2006). Keçilerin yayılım alanlarındaki bitki örtüsü keçilerin beslenmesine uygun olan maki ve çalımı bitkilerdir.

Ülkemizde sürdürülmekte olan keçi yetiştiriciliğine bakıldığında, ilki Akdeniz ve Orta Anadolu’da hala daha günümüze kadar gelmiş ama sayıları azalmakta olan tam göçebelik şeklinde, ikincisi kimi yerlerde yarı göçebelik şeklinde ve son olarak toprağı bağımlılığın söz konusu olduğu yerleşik aile işletmeleri olmak üzere üç farklı yetiştirme sistemi gözlemlenmektedir. Üç yönetim biçiminin de ortak özellikleri keçilerin bakım ve beslenme şekilleri ilkel ve yetersizdir. Bu yöntemler masraf hemen hemen hiç yapılmadan doğa koşullarına bağımlı bir

şekilde sürdürülmektedir. Bunun sonucu olarak keçilerin verimleri kalıtsal potansiyellerinin çok altında olmaktadır.

Türkiye koşullarına bakıldığında kıl keçisinin istihdama ve ekonomiye olan katkısı azımsanamayacak düzeydedir. Özellikle kırsal alanda yaşayan nüfusun başlıca geçim kaynağını ve beslenme gereksinimlerini Kıl keçilerinden sağladıkları bilinmektedir.

Keçilerin biyolojik ve fizyolojik özelliklerinin zorlu koşullara dayanımını sağlaması sayesinde, Türkiye’de keçi yetiştiriciliği yoğun olarak Akdeniz, Güney Ege, Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgeleri ile Orta Anadolu’da ki dağlık bölgelerde yapılmaktadır.

2.2. Kıl Keçisi ve Özellikleri

Kıl keçisi her bölgede bulunmakla birlikte özellikle yaygın olarak Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ndeki illerde yetiştiriciliği yapılmaktadır Kıl keçileri diğer hayvanlar tarafından değerlendirilemeyen doğal kaynakları, özellikle marjinal alanları minimum masrafla hayvansal ürünlere dönüştürmektedirler.

Kıl Keçisi kombine verim yönlü, döl verimi yüksek olmayan bir ırktır. Kıl keçilerimizin et verimleri ekstansif üretim koşullarında bakım ve beslenmelerinden dolayı gelişmiş ülkelerdeki keçiler kadar yüksek olmamasına rağmen, ülkemiz için birincil verim olarak kullanılmaktadır. Yerli keçilerimizin verimleri düşük olmasına rağmen birçok yetiştirici için başlıca geçim kaynağı ve onların sigortası konumundadırlar (Tuncel ve Bayındır, 1983)

Keçiler uzun yürüyüş kabiliyetinde meyilli ve kayalık arazilere iyi tırmanabilme kabiliyetine sahip hayvanlardır, merada günde 14-15 km yol yürüyebilirler. Bu özellikleri sayesinde diğer çiftlik hayvanlarına göre daha fazla bitki çeşidiyle karşılaşmaktadırlar. Sığır ile oranlandığında keçiler 1/10 kadar canlı ağırlıkta olduklarından dolayı ülkemiz çayır-mera alanlarında hareket kabiliyetleri daha yüksektir.

Türkiye keçi varlığının önemli bir kısmını, yaklaşık olarak %98’ini Kıl keçisi oluşturmaktadır (TUİK, 2019). Kıl keçilerinde kıl rengi varyetesi oldukça fazladır. Genellikle siyah kıllarla kaplı olmakla birlikte (Şekil 2.1.) bu ırk hayvanlar beyaz, gri, kahverengi ve alaca renkli de olabilmektedirler. Kötü bakım ve besleme

koşullarında dahi verim verebilen, soğuk ve sıcağa karşı toleranslı, Anadolu'nun her türlü iklim ve toprak koşullarına iyi adapte olmuş, hastalıklara dayanıklı, sağlam vücut yapılı, uzun yürüyüş kabiliyetine sahip, fundalık ve makiliklerden iyi faydalanabilen, meyilli ve kayalık araziye tırmanabilen bu hayvanlar sert iklim koşullarına dayanıklıdırlar (Anonim, 2004).



Şekil 2.1. Yaygın renk olan siyah renge sahip bir Kıl keçisi

Derileri koyu renkli olan bu ırka ait hayvanların vücutlarını kaplayan kıllar, kısa ya da uzun olabilmektedir. Dişi ve erkek hayvanlar genellikle boynuzludur ve her iki cinsiyette de sakal görünür. Kıl keçilerinde vücut oldukça dayanıklıdır. Baş orta büyüklükte ve düzgün profile sahiptir. Genellikle iri ve sarkık kulakları vardır. Fakat ırk içerisinde kısa kulaklı olanlara da rastlamak mümkündür. Vücudu kaplayan kıl örtüsü üstte kaba ve uzun örtücü kıllar, altta ise ince yumuşak alt kıllardan oluşur. İlkbaharda taranarak toplanabilen bu ince alt kıllar kaşmir yünü tipindedir (Anonim, 2015). Şengonca vd., (2003) tarafından Kıl keçileri için laktasyon süresi 143.7 gün, laktasyon süt verimi ise 80.4 kg olarak bildirilmiştir.

Türkiye küçükbaş hayvancılığında, büyük oranda düşük verimli olan yerli ırklarımızdan meydana gelen populasyon, ekstansif koşullarda neredeyse masrafsız, doğal kaynaklardan faydalanarak, tamamiyle olatmaya dayalı besleme koşulları ile üretim hedeflenmektedir. Ürün pazarlama ve değerlendirme olanaklarının yetersizliğinden dolayı üretici kazancının çok küçük bir paya denk gelmesi, işletmelerin küçük ve yetersiz olması, üretimin büyük oranda geçimlik

olarak yapılması gibi nedenlerle sektörde ekstansif yetiştiricilik zorunlu hale gelmektedir (Ertuğrul vd., 2010).

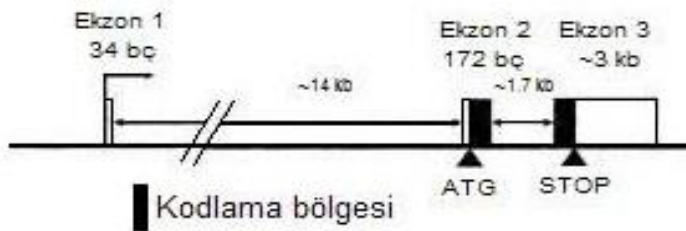
2.3. Leptin Geni

Latince leptos kelimesinden tüeyen, adipoz hücrelerde ve diğer birçok dokuda obezite (ob) geni tarafından üretilip plazmaya salınan hormon yakın zamanda keşfedilmiş ve hala daha araştırılmaktadır. Zhang ve ark. (1994) tarafından keşfedilen leptin, adipositlerden salınan 16 kDA molekül ağırlığında ve 167 aminoasitten meydana gelen, vücuttaki enerji dengesini düzenleyen protein yapısında bir hormon olarak tanımlanmıştır. İnsandaki leptin geni 7. kromozomun uzun kolunun 3,1 bölgesinde bulunur ve diziliminde 15000'den fazla baz çifti bulunmaktadır (Auwerx and Stael, 1998).

Leptinin vücuttaki öncelikli üretim yeri beyaz adipoz doku ve az miktarda kahverengi adipoz dokudur. Bu dokulardan üretildikten sonra, kan dolaşımına salınması için, 21 aminoasitlik sinyal peptidin molekülden ayrılması gereklidir.

Leptin hayvanların yetersiz beslenmeye karşı adaptasyonunda etkili olarak, iştahın düzenlenmesi yanında enerjinin depolanması ve kullanımı ile üreme ve bağışıklık sistemi için gerekli bir protein niteliği göstermektedir (Mantzoros et al., 1998; Garcia et al., 2004). Metabolizmayı ve tüm vücut sistemlerini düzenleyen bir hormondur.

Leptin geni insanlarda 7. kromozomda, farelerde 6. kromozomda (He vd., 1995; Isse vd., 1995; Zhang vd., 1994), sığır, koyun ve keçilerde 4. kromozomda bulunmaktadır (Stone vd., 1996). Sığırdaki leptin geninin yapısı (Taniguchi vd., 2002) Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Sığırlarda Leptin geninin yapısı

Leptinin, adipoz dokulardan sitümüle bir faktör olarak salgılanıp hipotalamusu uyurarak merkezi sinir sistemi üzerinden immün sistem, endokrin sistem ve üreme sisteminde başta enerji dengesi olmakla birlikte birçok metabolik süreci düzenleyen bir antiobezite faktörü olduğu ortaya çıkarılmıştır (Aslan vd., 2004).

Leptinin sistemik etkisini göstermesine yardımcı olan en kritik organ uyardığı hipotalamus bezidir (Alver, 2003). Leptin adipoz dokuda sentezlenip kan dolaşımına aktarıldıktan sonra beyne ulaşmaktadır. Metabolizmada etkisi besin alımında azalmaya neden olurken enerji tüketiminde artışa sebep olmaktadır. Hayvanlarda farklı dozlarda yapılan leptin tedavisi iştahla birlikte besin alımına, ve vücut ağırlığında azalmaya, devamında yağ depolarında kayba ve enerji metabolizmasında artışa yol açmaktadır (Kirel ve Doğruel, 1998).

Leptin vücut ağırlığını ve enerji metabolizmasını düzenleyen ve kanda bulunan bir hormon olduğu ortaya çıktıktan sonra, başlarda yalnızca yağ dokudan sentezlendiği düşünülmekteydi fakat yakın zamanda yapılan araştırmalar ile plasenta, mide mukozası ve karaciğer stellat hücrelerinde de sentezlendiği ortaya çıkmıştır.

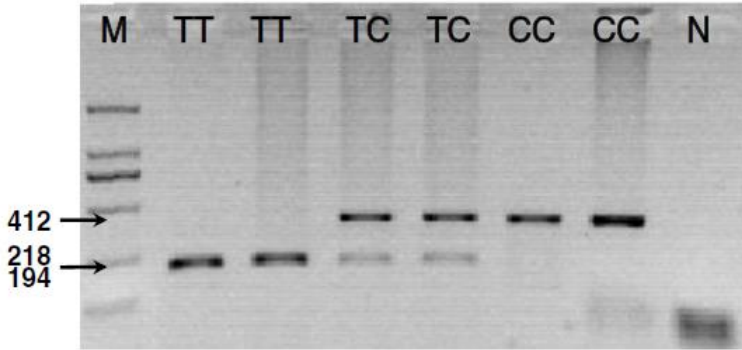
Leptin, fonksiyonlarını göstermek için nöropeptid olan Y nöronlarına lokalize olan bir reseptöre bağlanmaktadır (Komisarek vd., 2005) ve metabolizma düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (Houseknecht vd., 1998).

Hayvanlarda leptin üretimi ve plazma leptin düzeyleri fizyolojik ve çevresel etmenlere bağlı olarak değişmektedir. Bu etmenler tür, ırk gibi genetik ve yaş, gebelik, laktasyon, beslenme alışkanlıkları gibi fizyolojik faktörler ile ısı, ışık gibi çevresel şartlardan oluşmaktadır (Andrews, 1998, Chilliard vd., 1999, Williams vd., 2002).

Leifers vd. (2003) yaptıkları bir çalışmada Leptin geni normal olarak kabul edilen memelilerde, vücut yağ miktarı ile plazma leptin seviyesi arasında bir ilişki ortaya çıkarmışlardır. Bu yolağı vücut yağ miktarı arttığında vücuttaki plazma leptin seviyesi de artarak enerji dengesinin ayarlanması için hipotalamustaki reseptörlere sinyal vermekte ve iştah baskılanması şeklinde açıklamışlardır.

2.3.1. Keçide Leptin Genine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Wang ve ark. (2015) tarafından Çin'deki 5 keçi ırkından toplam 411 bireyde yapılan çalışmada leptin geni polimorfizmi DNA dizi analizi ile tanımlanmış ve 6 yeni yeni SNP (g.117 T > C, g.1642G > A, g.2883G > A, g.3053 T > C, g.3190G > A, and g.3314 T > C) belirlenmiştir. İncelenen 5 keçi ırkında frekansları 0.083 ile 0.244 arasında değişen 6 ortak haplotip ortaya konmuştur. İstatistiksel analizler sonucunda leptin geni kapsamında belirlenen altı SNP'in hepsinin büyüme özellikleri ile ilişkili bulunduğu rapor edilmiştir. PCR-RFLP yöntemi ile yapılan tanımlamada restriksiyon enzimleri kullanımı sonrası belirlenen DNA fragmanlarına ait jel görüntüsü Şekil 2.3.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Leptin genindeki mutasyona (g.117 T > C) ait PCR-RFLP jel görüntüsü

Maitra ve ark. (2014) Hindistan'daki 7 keçi ırkında leptin geninin tamamının (4.8 kb) DNA dizilimini 13 primer çifti ile çıkartıkları çalışma sonucunda 7 yeni SNP tanımlamışlardır.

Hindistanda bulunan Jamunapari (n=41) ve Barbari (n=70) keçi ırklarının oğlaklarına yönelik bir çalışmada ise (Singh et al., 2009) LEP geninin exon 2 ve intron 2 bölgelerindeki polimorfizm hem DNA dizi analizi hemde PCR-RFLP tekniği ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda, exon 2 bölgesinde 5 ve intron 2 bölgesinde 6 haplotip belirlenmiştir.

Ülkemizdeki keçi ırklarında leptin geninin karakterizasyonuna yönelik tek bir çalışma (Bakırcıoğlu ve Özbatak, 2016) yapılmıştır. Ankara, Kıl ve Kilis keçilerinde performans verileri ile ilişkilendirme yapılmadan sadece Leptin geni 2. ekzon ve 2. intronun DNA dizi analizi ile incelenerek haplotipler belirlenmiştir.

2.3.2 Farklı Hayvan Türlerinden Leptin Genine Yönelik Yapılan Araştırmalar

Zhang ve ark. (1994) tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada leptin geni üzerinde gerçekleşen bir mutasyonun, ob/ob genotipli farelerde leptinin yeteri kadar üretilmemesi nedeni ile yağ depolanmasının fazla olduğunu bulmuşlardır. Bu genin obeziteden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Madeja vd. (2004), leptin geni Hph I polimorfizminin Polonya Siyah Alaca suni tohumlama boğalarının süt ve protein verim özelliği üzerine etkisini önemli bulmuşlardır. Çalışmada TT genotipli boğaların süt ve protein verimi bakımından yaklaşık iki kat daha fazla damızlık değerine sahip oldukları bildirilmiştir.

Haegeman vd., (2000), yaptıkları çalışmada leptin geni ekzon 3 bölgesindeki HphI restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda oluşan polimorfizmi (C → T baz değişikliği ile bir alanin amino asidinin valine dönüşümü (A59V)) bildirmişlerdir. Bu polimorfizm sonucunda oluşan T ve C allellerini belirlemişlerdir. T allelinin mutant allel olduğunu, HphI enzim kesimi ile oluşan genotiplerdeki deseni CC genotipi için 331 bç'nde tek bant görüntüsü, mutant allelden kaynaklanan TT genotipli hayvanların ise 311 bç ve 20 bç'nde 2 bant verdiklerini bildirmişlerdir.

Koyunlarda yapılan çalışmalarda, besin alımı, vücut yağ kitlesi artışı, glikokortikoidler ve insülin seviyesindeki artışların ob gen mRNA'sının ve plazma leptin seviyesinin arttığı bildirilmiştir. Diğer bir ifade ile plazma leptin düzeyinin ve mRNA ekspresyonunun vücut yağ kitlesiyle pozitif ilişkide olduğu bildirilmiştir (Ergün, 1998; Maffei M. vd., 1995.)

Vücut yağ kitlesi fazla olan hayvanların, yağsız olan hayvanlara göre plazma leptin düzeylerinin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Fakat yerli ırklarımızdan yağlı kuyruklu olan Akkaraman ırkı koyunlarda, kuyrukta depo edilen yağın genel leptin düzeyi bakımından herhangi bir farklılığa neden olmadığı bildirilmiştir. Bu durumun değişik yağ depo bölgelerindeki insülin hormonuna karşı duyarlılığın farklı oluşuna ya da yağ dokusundaki miktarlarının farklı oluşuna bağlanmaktadır (Eryavuz vd., 2007; Fonfara vd., 2011)

Fruhbeck vd., (1998.) laboratuvar hayvanlarında yaptıkları enjeksiyon ile leptin ilavesi sonucunda glikoz homeostazisinin iyileştiğini bildirmişlerdir. Kim, (1996), ob/ob genotipli farelere günlük olarak enjeksiyon ile leptin verdiği çalışmasında, enerji tüketiminin arttığını, gıda alımının azaldığını ve bunun sonucunda

hayvanlarda belirgin bir kilo kaybının gözleendiğini ve ayrıca glukoz intoleransının yok olarak diyabetin düzeldiğini bildirmiştir.

İnfertil ve doğuştan leptin eksikliği bulunan obez fareler üzerinde leptinin üreme üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada 2 hafta boyunca iki cinsiyete ait farelere günde 50 µg'lık iki doz halinde leptin uygulaması yapılmıştır. Leptin uygulanan dişi fareler kontrol grubundaki dişilere göre serum LH seviyelerinde, yumurtalık ve uteruslarında ağırlık artışlarının olduğu tespit edilmiştir. Erkeklerde ise, kontrol grubuna göre serum FSH düzeylerinin, testis ve seminal vezikül ağırlıklarının, vezikül epitel hücreleri ve sperm sayılarında artışların olduğu bildirilmiştir (Barash, 1996).

2.4 Çalışma İle İlgili Moleküler Genetik Teknikler

2.4.1 DNA izolasyonu

Hücre içerisinde bulunan nüklear/mitokondriyal/kromoplast DNA'sının araştırılan materyale uygun kimyasal bileşiklerin ve farklı tekniklerin kullanılarak hücre içerisinde bulunan diğer materyallerden ayırarak elde etme işlemidir.

2.4.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR tekniği ile hücre içerisinde bulunan replikasyon mekanizmasının in-vivo olarak DNA üzerinde hedeflenen bölgenin sıcaklık döngüleyici cihazlar yardımı ile çok sayıda kopyasını elde etmeye dayanan tekniktir. Çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) haline getirildikten sonra istenilen bölgeye özgü primerlerin spesifik bölgelerine bağlanarak, çoğaltılır ve tekrar bağlanır. Bu basamaklar şu şekildedir;

Ayrılma (Denaturation): Kalıp DNA'yı çift zincirli formundan tek zincirli formuna getirmek için 92-95 °C arasında 1-5 dk süre ile bekletilir. Bu sayede bir sonraki basamakta gerçekleşecek işlemlere hazırlanır. Bazı durumlarda PCR işleminde çift zincirli DNA'yı ayırmak için bir ön ayırma işlemi olan pre-denaturasyon için süre 5-10 dk arasında değişen daha uzun süre sıcaklığa maruz bırakılan işlem uygulanabilmektedir (Watson vd., 1992).

Yapışma (Annealing): Bu basamakta genellikle 55-72 °C' de 30-60 sn süre ile denatürasyon basamağında ayrılan tek zincirli forma gelen DNA üzerinde

istediğimiz bölgeye özgü sentezlettirilen primerler kendilerine ait bölgeleri tanıyıp bu bölgelere yapışırlar (Innis ve Gelfand, 1990). Bu basamakta sentezlettirilen primere ait bağlanma sıcaklığını belirlemek oldukça önemlidir. Bu sıcaklığı hesaplarken kabaca primerde bulunan sitozin ve guanin bazlarının toplamının dört katı ile adenin ve timin bazlarının iki katlarının toplamı hesaplanır. Literatürde bazen primerlerin Tm sıcaklıklarının bu belirlenen sıcaklığın 5 °C altındaki değerlerin daha uygun olacağını söylemektedir (Innis ve Gelfand, 1990). Primerleri sentezletirken uzunluklarına bağlı oluşacak sıcaklığa, son üç bazının durumuna ve en önemlisi dimer oluşumunun önüne geçmek için birbirlerine tamamlayıcı olmamalarına dikkat edilmelidir.

Uzama (Extension): Bu basamakta primerlerin kendilerine özgü olan bölgelerinin karşılıklarına yapışması ile, 72 °C'de 1-5 dk sürede, Taq polimeraz enzimiyle hazırlanan karışım içerisinde serbest halde bulunan dNTP bazlarını ekleyerek ilgilendiğimiz bölgenin tamamlanmasını sağlamaktadır. Bu işlemin genel olarak 72 °C'de yapılmasının sebebi PCR karışımına eklediğimiz DNA'nın uzamasını sağlayan Taq DNA polimeraz'ın bu sıcaklıkta en iyi çalışmasıdır (Erlich vd., 1991). Fakat günümüzde kullanılan Taq Polimerazların ihtiyaç duydukları sıcaklıklarda değişiklikler olmaktadır.

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

2.4.3 Restiriksiyon Endonükleazlar

Büyük bir çoğunluğu bakterilerden, az bir kısmının virüsler ve ökaryotlardan izole edilen Restiriksiyon Endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden ya da bu dizilimler içindeki özgül bölgelerden DNA'yı her iki ipliğinden kesen yapılarıdır.

2.4.4 Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

Bu teknik, hedeflenen çoğaltılmış DNA bölgesinin restriksiyon endonükleaz enzimler ile kendilerine özgül bölgelerden tanıyıp kesmesi ile farklı fragmanlar ile yeni desenlerin oluşması esasına dayanmaktadır. Bu işlem, firmalardan elde edilen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin firmanın bildirimleri doğrultusunda belirli

sıcaklıklarda belirli süreler ile inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmektedir. Genellikle PCR ürünleri 10 U/l ile 37 °C'de 1-3 saat arasında inkübasyon ile gerçekleştirilmektedir. Kullanılan enzime göre süreler ve sıcaklıklar değişebilmektedir.

PCR ürünlerinin RE'ler ile inkübasyonları sonucunda farklı fragmanların oluşması ve bu oluşan fragmanların baz uzunluklarına göre sıralanması sonucunda kıyaslama esasına dayanarak yapılan genotipleme tekniğine Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) denilmektedir.

2.4.5 Agaroz Jel Elektoroforezi

Agaroz jel elektroforezi tekniği, negatif yüklü DNA'ların jel matrisinde bir yük alanı içerisinde boyutları, şekilleri ve ağırlıklarına göre belirli hızlarda pozitif kutuba doğru göç etmesi esasına dayanmaktadır. Daha basit bir ifade ile Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniklerinde olduğu gibi farklı uzunluklarda ve ağırlıklarda oluşan DNA fragmanları veya Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) tekniğinde oluşan farklı şekillerdeki DNA'ların agaroz jelde oluşan porlarda ilerleme hızlarına göre ayırlama yapan bir tekniktir. Kısa uzunluktaki veya hafif olan DNA'lar veya daha düz şekilli olan DNA'lar oluşan porlarda uzun ağır veya farklı şekillerdeki DNA'lara göre daha hızlı ilerlemektedirler. Farklı DNA boylarına göre farklı yoğunluklarda agaroz jel konsantrasyonları hazırlanmaktadır. Agaroz jelde okumalar DNA'nın koyuldukları kuyucuğa en uzak bölgeden başlayarak yapılmaktadır. Okumalar veya kontroller, molekül ağırlıkları ya da uzunlukları bilinen DNA parçaları (ladder, boy markörü) referans alınarak gerçekleştirilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Çalışmanın hayvan materyalini Aydın ve/veya Denizli illerindeki Kıl Keçisi yetiştirilen özel yetiştirici işletmelerindeki Kıl keçisi oğlakları oluşturmuştur. Farklı işletmelerden birbiri ile akraba olmayan 155 baş oğlak örneklenerek yürütülen çalışma kapsamında doğumdan itibaren 3-3,5 aylık yaşa kadar oğlakların büyüme özellikleri izlenmiştir. Büyüme özellikleri olarak; oğlak doğum ağırlığı, süttten kesim canlı ağırlığı ve doğumdan süttten kesime kadar geçen süreçteki günlük ortalama canlı ağırlık artışı dikkate alınmıştır.



Şekil 3.1. Kıl keçisi sürüsüne ait bir görsel



Şekil 3.2. Kıl keçisi oğlaklarına ait bir görsel

3.2. Yöntem

3.2.1 Çalışma Olanakları

Çalışma kapsamındaki gerçekleştirilen tüm laboratuvar analizleri (DNA ekstraksiyonu, PCR, PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesimi, agaroz jel elektroforezi ve jel görüntüleme), Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü bünyesinde TÜBİTAK KAMAG 1007 projesi ile oluşturulan Moleküler Genetik laboratuvarı ile Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliđi Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADÜ-TARBİYOMER) kapsamındaki laboratuvarlarda yürütülmüştür.

3.2.2 Kan örneklerinin toplanması ve DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için süttten kesim döneminde her bir oğlağın boyun toplardamarından (vena jugularis) pıhtılaşmayı önleyen kimyasal ajan K3EDTA içeren vakumlu tüplere 9 ml kan örneği alınmıştır. Bu örnekler izolasyonlar gerçekleştirilene kadar derin dondurucularda muhafaza edilmiştir. Kan örneklerinden ticari kit veya manuel ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen DNA örneklerinin yoğunluk ve kalite ölçümleri spektrofotometrik olarak NanoDrop cihazında ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda DNA miktarı (260nm) olarak 50 ng/µl ve saflık bakımından (260nm/280nm) 1.8 değerini sağlamayan örneklerin DNA izolasyonları bu değerlere ulaşana kadar tekrarlanmıştır.

3.2.3 PCR ile Leptin Genine Ait Bölgenin Çoğaltımı

Keçi leptin geninin DNA dizilimi (NCBI Acces no: JQ739233) ekte (Ek-1) verilmiştir. Leptin geninin Exon 1 bölgesinin 412 bç uzunluğundaki kısmında polimorfizmi ve genotipleri belirlemek amacıyla PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. PCR-RFLP analizleri için Wang vd. (2015) tarafından bildirilen ve ayrıntıları Çizelge 1'de verilen primer çifti sentezlettilererek kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Kıl Keçilerinde leptin geni polimorfizminin belirlenmesi için kullanılan primer seti

Primer adı	Primer dizilimi (5'-3')	Lokasyon	Hedef Bölge	PCR ürünü (bp)	Tm (°C)
LEP-F	ATGTGGGTGGTAACGGAGCA	810-829	Exon 1	412	58.0
LEP-R	GGTGGGAGGCAAGGGAAGT	1204-1222			

Tüplerdeki toplam hacim 25 µl olacak şekilde 10X PCR buffer, MgCl₂, dNTP karışımı (ATP, GTP, CTP, TTP), ileri (Forward) ve geri (Reverse) olmak üzere iki primer, *Taq* DNA polimeraz enzimi, genomik DNA ve steril ddH₂O içeren PCR karışımı oluşturulmuştur. Yapılan optimizasyon denemeleri ile PCR karışımını oluşturan bileşenlerin en uygun miktarları belirlenmiştir. Her bir DNA örneği için PCR karışımına katılan hacim ve son konsantrasyonlarına ait ayrıntılar Çizelge 2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Bölgenin çoğaltılması için hazırlanan PCR karışımındaki ürünlerin son konsantrasyonları

Bileşen adı	1 Örnek için
ddH ₂ O	-
10X PCR Buffer	X
MgCl ₂ (25 mM)	2,00
dNTP Karışımı* (3 mM)	1,67
Forward Primer (10 µM)	10 pmol
Reverse Primer (10 µM)	10 pmol
<i>Taq</i> DNA Polimeraz Enzimi (5 U/µl)	1.25 U/µl
Genomik DNA (~25 ng/µl)	~50 ng/µl

Anılan PCR primerleri kullanılarak çoğaltılacak hedef DNA bölgesi aşağıda verilen PCR koşullarında 36 döngüde çoğaltılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR yükseltgenme koşulları

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
İlk Ayrım	95 °C	5 dk.
Ayrım	95 °C	30 sn.
Bağlanma	58 °C	30 sn.
Uzama	72 °C	60 sn.
Son Uzama	72 °C	10 dk.
Bekleme	4 °C	∞

3.2.4 PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesimi

Leptin geninde, SNP sonucunda oluşan, T ve C allellerinin ayrımını yapabilmek amacı ile PCR tabanlı DNA çoğaltımı işlemi tamamlanmıştır. Fakat oluşan bölgenin uzunluğu her birey için aynı olduğundan bireyler arasında bir ayrım yapmak söz konusu değildir. Bu ayrımı yapabilmek için Restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile farklı parçaların oluşmasını sağlayan RFLP tekniğinden faydalanılmıştır. T ve C allelleri sonucunda oluşacak genotipleri belirleyebilmek için *NmuCI* (*Tsp45I*) enzimini kullanılmıştır.

Çoğaltılan toplam 15 µl PCR ürünü üzerine toplamda 30 µl olacak şekilde Çizelge 4.'de hacimleri verilen bileşenler eklenmiştir. Karışımlar hazırlandıktan sonra Restriksiyon enzimlerinin aktifleşerek bölgeyi tanıyıp kemesi için 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.4. Leptin Geninin T ve C allellerinin ayrımı için kullanılan bileşenler

Bileşenler	1 örnek için (µl)
ddH ₂ O	11,25
Green buffer	3,00
<i>NmuCI</i> (<i>Tsp45I</i>) enzimi (10U/µl)	0,75
Toplam	15,00

İnkübasyon sonucu oluşan PCR-RFLP ürünleri Safe View ile boyanıp agaroz jel elektroforezinde boyutlarına göre ayrıştırıldıktan sonra jel görüntüleme sisteminde fotoğraflanmıştır. Görüntülenen bantlar incelenerek oluşan bantlara göre genotipler belirlenerek analiz için kaydedilmiştir. Elde edilecek genotiplere ait jelde görüntülenecek DNA fragman uzunlukları aşağıdaki şekilde olacaktır.

- TT: 218 bç ve 194 bç
- TC: 412 bç, 218 bç ve 194 bç
- CC: 412 bç

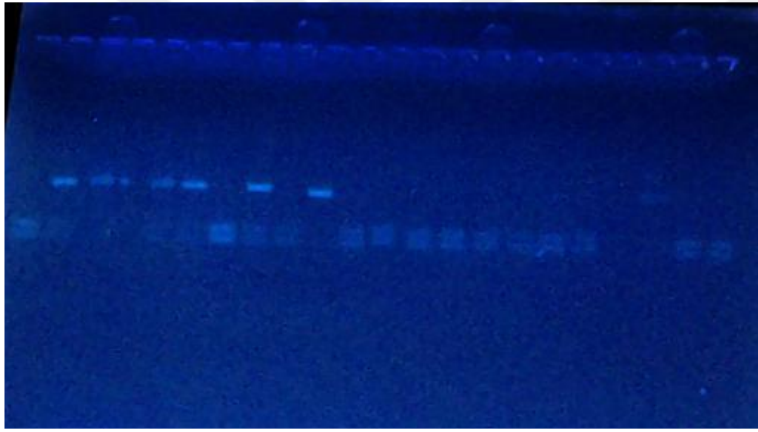
3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Negatif yüklü DNA fragmanlarını agaroz jel içerisinde büyüklüklerine ağırlıklarına ve oluşan konformasyonlarına göre pozitif yüklü uca doğru belirli bir elektriksel yük içerisinde ayırmayı sağlayan teknikten faydalanılmıştır.

Restriksiyon enzimleri ile inkübasyondan sonra oluşan DNA fragmanlarını ayırt etmek için %2 konsantrasyonunda agaroz jel hazırlanmıştır. Erlenmayer içerisine 1gr ağırlığında hassas terazi ile tartılan agaroz, 50 ml 0.5X TBE çözeltisi (pH 8.3) içine eklenmiş ve erlenmayer mikrodalga fırına yerleştirilmiştir. Agarozun çözelti içinde tamamen çözünüp çözünmediğini kontrol etmek için kaynama süresi boyunca erlenmayer birkaç defa fırından çıkarılmış ve gözle kontrol edilmiştir. Agaroz tamamen çözüldükten sonra oda sıcaklığına kısa bir süre bırakılarak 50-60 °C sıcaklığa gelmesi beklenmiştir. İstenilen sıcaklığa gelen çözeltinin içine DNA'ların UV ışığı altında görünmelerini sağlayan ethidium bromür türevi SafeView'dan 2.5µl eklenip güzelce karıştırılmıştır. Elde edilen PCR-RFLP ürünlerinin yüklenmesi için gerekli olan kuyucukların jel donduktan oluşması için yatay elektroforez küvetine jeli dökmeden önce taraklar yerleştirilmiştir. Hazır olan küvetin içerisine agaroz solüsyonu dikkatlice dökülerek gözle durumu kontrol edilmiştir. Oda sıcaklığına geldiğinde katılaştıran agaroz jelin üzerinden taraklar jele zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve kuyucukların formları kontrol edilmiştir. Elektroforez tanının içerisi küvette bulunan jeli hafif geçecek şekilde 0.5X TBE solüsyonu ile doldurulmuştur. Kuyucuklara PCR-RFLP ürünleri yükleme boyası (Loading Dye) ile karıştırılarak her bir örnek farklı kuyulara yüklenmiştir. Bu çalışma için 10 µl PCR-RFLP ürünü ve 2 µl 6X Loading Dye

karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. İlk kuyucuklara elde ettiğimiz fragmanların boylarının doğrulanmasını sağlayacak DNA ladder yüklenmiştir.

Ladder ve bütün örneklerin kuyucuklara yükleme işlemleri tamamlandıktan sonra, elektroforez tankı güç ünitesine bağlanmıştır. 10 cm uzunluğunda ki elektroforez küveti için 80V uygulanmış süre olarak da 30 dakika fragmanların birbirlerinden ayrılması için yeterli olmuştur. Yürütme işlemi tamamlanan agaroz jel görüntüleme ve dökümantasyon sisteminde UV ışığı altında görüntülenip kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.3. UV ışığının altında safe view ile boyanmış agaroz jelin görüntüsü

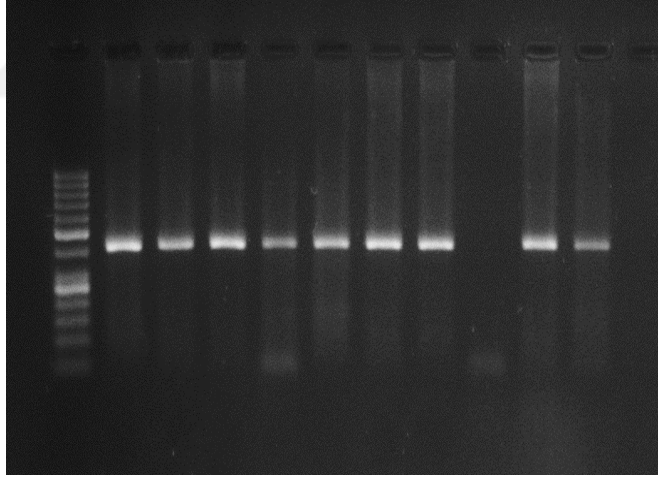
3.2.6 Verilere Yönelik İstatistikî Değerlendirmeler

Kayıtlar daha sonra incelenerek gözle sayım tekniği ile her bir örneğe ait leptin genine ait oluşan genotipler belirlenerek, çalışılan örnekler için genotip dosyası oluşturulmuştur. Bu dosya üzerinde belirlenen genotipler ile populasyonlarda bulunan allel ve genotip frekansları, populasyonun Hardy-Weinberg dengesi gibi parametreler PopGene32 programı (Yeh vd., 1997) ile belirlenmiştir. Ardından genotipler oluşturulan matematiksel modelde kesikli etmen olarak yer alacak şekilde çalışılan populasyonda leptin geni oğlak gelişme özellikleri SAS (1999) istatistik paket programında bulunan GLM prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

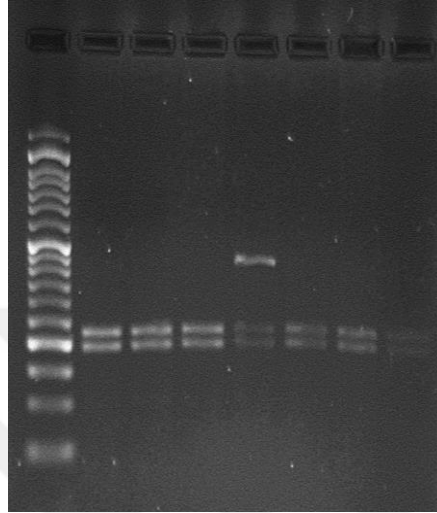
4.1 PCR ve PCR-RFLP Ürünlerine Ait Elektroforez Sonuçları

PCR sonucunda Leptin geni için oluşan bölgenin uzunluğu 412 bç olarak bildirilmiştir (Wang vd. 2015). Çalışmamızdaki Kıl keçisi oğlaklarına ait DNA örneklerinden spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan bölgeye ait agaroz jelde elektroforez ile görüntülenen bantlara bakıldığında (Şekil 4.1.) çoğaltılan ürünlerin ladder üzerinde 400 bç ile 500 bç uzunluklarındaki bantlar arasında 400 bç'ine yakın bir bölgede bulunduğu, dolayısıyla hedeflenen 412 bç'lik bölgenin sorunsuz bir şekilde çoğaltıldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. 412 bç uzunluğundaki PCR ürünlerine ait jel fotoğrafı

Leptin genine ait primer çifti ile çoğaltılan 412 bç uzunluğundaki PCR ürünlerinden bireylere ait genotipleri belirleyebilmek için *NmuCI* (*Tsp45I*) restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılması sonucunda (Şekil 4.2.) iki farklı tipte bant profili gözlemlenmiştir. Jel görüntüsünde 218 ve 194 bç uzunluğunda iki bant veren bireyler homozigot TT genotipli olarak belirlenirken, 412, 218 ve 194 bç uzunluğunda 3 bant gözlenen bireyler heterozigot TC genotipli olarak belirlenmiştir. Homozigot CC genotipli (412bç uzunluğunda tek banta sahip) bireylere ise rastlanmamıştır.



Şekil 4.2. PCR-RFLP ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı

4.2 Genotipler ve Popülasyon İstatistikleri

Restriksiyon enzim kesimi sonrası elde edilen ürünlere ait agaroz jel görüntülerindeki bantlar incelenerek bireylere ait belirlenen genotipler kaydedilmiştir. Genotiplenen 155 bireyin 150'sinde TT, kalan 5'inde ise TC genotipi tespit edilmiştir. CC genotipine ise rastlanmamıştır. Leptin genotiplerine ilişkin gözlenen sayılar ve genotip frekansları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Aydın ve Denizli illerindeki Kıl keçisi popülasyonunda TT genotipinin yaklaşık %97 gibi çok yüksek bir frekansa sahip olduğu, geriye kalan yaklaşık %3'lük orandaki bireyin ise TC genotipinde olduğu görülmektedir. Popülasyonda gözlenmediği için CC genotipinin frekansı sıfırdır.

Çizelge 4.1. Kıl keçilerinde leptin genotiplerine ilişkin gözlenen sayılar ve genotip frekansları

Genotipler	Genotip sayıları	Genotip frekansları
TT	150	0.9677
TC	5	0.0333
CC	0	0.0000
Genel	155	1.0000

Aydın ve Denizli illerinden alınan örneklerin geneli için elde edilen genotip sayıları kullanılarak T ve C allelleri için hesaplanan allel frekansları Çizelge 4.2.'de, iki il için ayrıştırılmış sonuçlar ise Çizelge 4.3.'te özetlenmiştir. Örneklemin geneli için T alleli 0.984'lük frekans değeri ile oldukça yüksek bir

frekansa sahiptir. İllerin özelinde de baktığımızda frekanslar birbirine oldukça yakındır.

Çizelge 4.2. Örneklenen tüm bireylerde leptin geni gözlenen allel frekansları

Alleller	Allel frekansları
T	0.984
C	0.016
Genel	1.000

Çizelge 4.3. Aydın ve Denizli illerindeki bireyler için leptin geni gözlenen allel frekansları

Alleller	Allel frekansları	
	Aydın (n=74)	Denizli (n=81)
T	0.986	0.981
C	0.014	0.019
Genel	1.000	1.000

Genotip sayılarına dayalı olarak yapılan ki-kare analizi sonuçları (Çizelge 4.4.), hem iller hem de heriki ilin geneli bakımından popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.4. İller ve örneklem geneli için gözlenen ve beklenen genotip sayıları ile Hardy-Weinberg denge kontrolüne yönelik ki-kare analiz sonuçları

İller	N	Gözlenen			Beklenen			X ²	p
		TT	TC	CC	TT	TC	CC		
Aydın	74	72	2	0	72,014	1,973	0,014	0,014	0,906ös
Denizli	81	78	3	0	78,028	2,944	0,028	0,029	0,865ös
Genel	155	150	5	0	150,040	4,919	0,040	0,042	0,838ös

Ös: Önemsiz (p>0.05)

4.3. Oğlak Büyüme Özelliklerinin Leptin Genotiplerine Göre Değişimi

Kıl keçisi oğlaklarının büyüme özelliklerine (doğum ağırlığı, 3.5 ve 5.5 aylık yaşta canlı ağırlıklar) yönelik varyans analiz sonuçları ile çeşitli faktörlerin seviyelerine ait en küçük kareler ortalama ve standart hataları Çizelge 4.5.'te özetlenmiştir.

Oğlak doğum ağırlığının genel ortalaması 2.95 kg bulunmuştur. TT genotipindeki kuzuların doğum ağırlığı TC genotipli olanlardan 0.35 kg daha yüksek olmasına karşın iki genotip arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Dikkate değer olan bu farkın önemli bulunmaması TC genotipli birey sayısının sınırlı olmasına dayalıdır. İller arasındaki fark önemli bulunmazken Aydın ilindeki oğlakların doğum ağırlıkları daha yüksektir. Doğum tipi doğum ağırlığında istatistiki olarak önemli fark yaratmıştır ($p<0.05$). Tekizlerin doğum ağırlığı ortalaması ikizlerden 0.71 kg daha yüksektir. Cinsiyet bakımından doğum ağırlığı ortalamaları her iki cinsiyet için oldukça benzerdir.

Yaklaşık 3.5 aylık yaşa (ortalama 106.2 gün) denk gelen 1. tartımda oğlak canlı ağırlığının genel ortalaması 18.78 kg, doğumdan bu tartıma kadar geçen süredeki ortalama günlük canlı ağırlık artışı (OGCAA) ise 143.23 g'dır. Hem 3.5 aylık yaş canlı ağırlıkları hem de OGCAA bakımından genotipler, iller, doğum tipleri ve cinsiyetler arası farklar istatistiki olarak önemsizdir. Her iki özellik bakımından genotipler arası fark önemsiz olmasına karşın, TT genotipli kuzular TC genotipliler göre oldukça yüksek ortalamaya sahiptirler. TC genotipli birey sayısının 5 bireyle sınırlı olmasının yarattığı yüksek standart hata, genotipler arası farkın önemsiz çıkmasında ana etkindir. Analiz modelinde yer alan sürekli etmenlerden doğum ağırlığının 3.5 aylık yaş canlı ağırlığı ile doğumdan 3.5 aylık yaşa kadar olan OGCAA üzerine regresyonları pozitif yönlü ve çok önemli ($p<0.01$) bulunmuştur. Diğer sürekli faktör olan oğlak yaşının (gün olarak) 3.5 aylık yaşta oğlak ağırlığına regresyonu pozitif yönlü ve önemli ($p<0.01$) iken OGCAA üzerine regresyonu negative ve önemsizdir.

Yaklaşık 5.5 aylık yaşa (ortalama 171 gün) denk gelen 2. ağırlık tartımında oğlak canlı ağırlığının genel ortalaması 26.89 kg, 1. tartım ile 2. tartım arası süreçteki OGCAA ise 136.46 g'dır. Oğlakların bu dönemdeki canlı ağırlık artış hızları ilk döneme göre biraz gerileme göstermiştir (143.23 g'a karşı 136.46 g). Her iki büyüme özelliği bakımından da genotipler arası fark istatistiki olarak önemli

bulunmazken TT genotipli bireylerin ortalaması TC genotiplilere göre belirgin düzeyde yüksektir. Kesikli sistematik çevre etmenlerinden iller, doğum tipleri ve cinsiyetler her iki büyüme özelliği bakımından da önemli fark yaratmamıştır. Sürekli etmen olarak tesiri incelenen doğum ağırlığının her iki büyüme özelliği üzerine regresyonu pozitif ve önemli ($p<0.01$) iken oğlak yaşının etkisi bu dönemdeki canlı ağırlık üzerine pozitif ve çok önemli, OGCAA üzerine ise pozitif ve önemsizdir.

Kıl keçisinde leptin geninin exon 1 bölgesine yönelik PCR-RFLP tekniği ile yaptığımız tanımlama çalışmasının keçilerde benzeri olan tek çalışma Wang ve ark. (2015) tarafından Çin'deki 5 farklı keçi ırkında yapılan çalışmadır. Anılan çalışmada incelenen Meigu, Jianyang Daer, Chinese Tibetan, Chuannan Black ve Chinese Nanjiang Yellow ırkı keçilerde T allelinin frekansı sırasıyla 0.839, 0.847, 0.986, 0.963 ve 1.000 bulunmuştur. İncelenen 5 ırktan sadece 1 ırkta (Chinese Nanjiang Yellow) CC genotipli bireye rastlanmıştır, diğer 4 ırkta ise rastlanmamıştır. Kıl keçisi için elde ettiğimiz genotip ve allel frekansları Çin'deki keçi ırklarına ait sonuçlarla çok büyük paralellik sergilemektedir.

Çizelge 4.5. Leptin genotipleri ve diğer etkisi muhtemel faktörlere ait seviyeler bakımından oğlak büyüme özelliklerine ait en küçük kareler ortalama ve standart hataları

Faktörler	N	Doğ. Ağ	~3.5 ay (106.2 gün)		~5.5 ay (171 gün)		
			Canlı Ağ.	OGCAA	Canlı Ağ.	OGCAA	
Genotip		P=0,258	P=0,067	P=0,074	P=0,416	P=0,418	
TT	142	3,12±0,088	20,66±0,60	161,20± 5,883	100	27,94±0,916	142,799± 5,531
TC	5	2,77±0,298	16,9±2,011	125,25±19,707	4	25,83±2,591	130,129±15,653
İl		P=0,058	P=0,656	P=0,570	P=0,085	P=0,087	
Aydın	74	3,05±0,168	18,56±1,154	140,42±11,312	33	25,86±1,63	130,277±9,847
Denizli	73	2,84±0,167	19,01±1,228	146,04±12,035	71	27,92±1,506	142,651±9,098
Doğum Tipi		P=0,000	P=0,056	P=0,089	P=0,241	P=0,285	
1	129	3,30±0,158	17,64±1,052	133,27±10,307	94	25,83±1,33	130,644±8,032
≥2	18	2,59±0,198	19,92±1,389	153,19±13,616	10	27,94±2,015	142,284±12,171
Cinsiyet		P=0,611	P=0,618	P=0,238	P=0,823	P=0,968	
Erkek	96	2,92±0,159	18,97±1,083	147,71±10,619	64	27,01±1,501	136,592±9,067
Dişi	51	2,97±0,178	18,59±1,206	138,74±11,825	40	26,77±1,593	136,336±9,623
Reg Linear			P=0,000	P=0,001	P=0,000	P=0,000	
Dog. Ag.			3,235±0,575	20,003±5,631	5,19±0,781	23,942±4,716	
Yaş			P=0,000	P=0,843	P=0,000	P=0,779	
			0,156±0,022	-0,043±0,215	0,142±0,031	0,053±0,188	
Genel		2,95±0,158	18,78±1,08	143,23±10,583		26,89±1,453	136,464±8,778

5. SONUÇ

Çiftlik hayvanlarında verim özellikleri üzerine büyük etkili genlerin moleküler genetik teknikler kullanılarak belirlenmesi ve pratik genotipleme yöntemlerinin geliştirilmesi sonucunda bu genotiplere ait bilgilerin de damızlık seçiminde kullanılması daha isabetli damızlık değer tahminine ve dolayısıyla seleksiyonda daha fazla ilerleme elde edilmesine olanak tanıyabilecektir. Özellikle çok erken yaşlarda genotip bilgilerinin güvenilir bir şekilde ortaya konması büyük avantaj sağlamaktadır. Bu husus erkek damızlık adaylarının ön seçimi anlamında da büyük önem arz etmektedir.

Ülkemiz sathında yaygın olarak yetiştirilen Kıl keçilerinde leptin geni exon 1 bölgesindeki polimorfizmi ilk kez ortaya koymak, genin oğlak büyüme özellikleri üzerine olası etkilerini tanımlamak ve bunun sonucunda leptin geni bakımından bireylere ait genotip bilgilerinin seleksiyonda kullanılabilirliğini ortaya koymak için yapılan bu çalışmada aşağıda özetlenen bulgu ve sonuçlara ulaşılmıştır:

- 1- Kıl keçilerine ait incelenen örneklerde leptin geninin exon 1 bölgesine ait 412 bç uzunluğundaki DNA kesiti PCR ile problemsiz olarak çoğaltılmıştır.
- 2- PCR ürünlerinin *NmuCI* (*Tsp45I*) restiriksiyon enzimi ile kesime tabi tutulması ve RFLP ürünlerinin agaroz jelde ayrıştırılması sonucunda elde edilen bant profillerine dayalı olarak bireylerin genotipleri doğru bir şekilde tespit edilmiştir.
- 3- Aydın ve Denizli illerindeki sürülerden örneklenen bireyler için elde edilen genotipler, incelenen gen bölgesi bakımından Kıl keçilerinin polimorfik olduklarını göstermiştir.
- 4- İncelenen 155 bireylik örnekleme CC genotipine hiç rastlanmamış, 150 birey TT, kalan 5 birey ise TC genotipli olarak tespit edilmiştir.
- 5- TT, TC ve CC genotiplerinin frekansları sırasıyla 0.967, 0.033 ve 0.000 bulunmuştur.
- 6- T ve C allellerinin frekansları sırasıyla 0.984 ve 0.016 bulunmuştur.
- 7- Heterozigot bireylerin varlığından ötürü populasyonda C allellinden bahsetmek mümkündür. Fakat yapılan taramada homozigot CC genotipine rastlanmamıştır. Bu durumun, örnekleme sapmasından ve C alelelinin frekansının çok düşük olmasından kaynaklanmış olması muhtemeldir.

- 8- Aydın ve Denizli illeri için genotip ve allel frekansları benzerlik sergilemiştir.
- 9- İncelenen SNP bakımından hem Aydın ve Denizli illeri bazında hem de örneklemin bütünü bazında genotip frekanslarına dayalı olarak ki-kare testi sonucunda Kıl Keçi popülasyonunun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu belirlenmiştir.
- 10- İstatistiki olarak önemli çıkmasa da incelenen oğlak büyüme özelliklerinin tamamı (doğum ağırlığı, 3.5 ve 5.5 aylık yaştaki canlı ağırlıklar, iki farklı döneme ait OGCAA) bakımından TT genotipli bireylerin ortalaması TC genotipli bireylerden belirgin derecede yüksektir.
- 11- Kıl keçisi için elde edilen genotip ve allel frekans değerleri aynı primer çifti kullanılarak Çin'deki keçi ırkları için yapılan araştırmadan elde edilen değerlerle büyük benzerlik sergilemektedir.

Bu çalışma sonucunda, ülkemizin başat keçi ırkı olan ve neredeyse ülkenin tamamında yetiştirilen Kıl keçilerinde leptin geni exon 1 bölgesi polimorfizmi ilk kez tanımlanmış, böylece ırkın genetik yapısının tanımlanmasına katkı sağlanmıştır.

Tüm büyüme özellikleri bakımından TT genotipli bireylerin ortaya koyduğu yüksek performans daha detaylı ek çalışmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır. Minör allel olan C allelinin frekansı oldukça düşük olduğundan leptin genotiplerinin veya allellerinin büyüme özellikleri üzerine etkilerini sağlıklı olarak tanımlayabilmek için çok geniş hayvan materyalinde genotipleme ve sonrasında oğlak büyüme özellikleri ile ilişkilendirme çalışmalarına gereksinim söz konusudur. Genotipleme çalışmasında leptin geninin tamamının DNA dizisinin çıkartılması, saptanacak SNP ve haplotipler ile performans değerlerinin ilişkilendirilmesi çok daha aydınlatıcı olacaktır.

Bu çalışma, bundan sonra Kıl keçisi ve diğer yerli ırklarımızda Leptin geni polimorfizminin tanımlanması ve mevcut genotiplerle büyüme özelliklerinin ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalar için de yönlendirici olacaktır.

KAYNAKLAR

- Alver, A. 2003. Sıçan Yağ Hücrelerinde Leptin Hormonu İle Karbonik Anhidraz 3 İzoenzimi Arasındaki Etkileşimin İn Vitro İncelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Andrews, J.F. 1998. Leptin: energy regulation and beyond to a hormone with pan-physiological function. **Proc Nutr Soc.**, 57: 409-411.
- Anonim (Resmi Gazete: Kıl Keçisi <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/12/EK-16%20K1l%20Keçi.doc>)
- Anonim, 2012. http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis. [Erişim Tarihi: 15.08.2012].
- Anonim, 2001. Hayvancılık özel ihtisas komisyonu raporu. Sekizinci 5 Yıllık Kalkınma Planı, Yayın No: DPT 2574-ÖİK 587, Ankara.
- Anonim, 2009. Türkiye Çiftlik Hayvanları Genetik Kaynakları Kataloğu. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim, 2015. Türkiye’de küçükbaş hayvan yetiştiriciliği, [http://www.zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=23597&tipi=17&sube=0.] Erişim Tarihi:25.02.2015.
- Anonymous, 2004. F.A.O. www.fao.org .
- Aslan, K., Serdar, Z., Tokullugil, A., 2004. Multifonksiyonel hormon: Leptin. **Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 30(2): 113-118.
- Auwerx, J., Staels, B. 1998. Leptin. **Lancet**, 351: 737-742.
- Bakırcıoğlu, Ö., Öztapak, K.Ö. 2016. Characterization of Exon 2 and Intron 2 of Leptin Gene in Native Anatolian Goat Breeds. **İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.** 42 (2): 178-185,
- Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S., Ren, H., Kabigting, E.B., Kujiper, J.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, 137(7): 3144-3147.
- Cha, M.C., Jones, P.J. 1998. Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats. **J Lipit Res**, 39: 1655-1660.

- Chilliard, Y., Bonnet, M., Delavaud, C., Faulconniera, Y., Leroux, C., Djianec, J., Bocquier, F. 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Dom. Anim. Endocrinol**, 21: 271-295
- Christos, S., Mantzoros, M.D., 1999. The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. **Ann Intern Med**, 13: 671-680.
- Eker, M., Tuncel, E., Aşkın, Y., Yener, S.M. 1975. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kilis Keçilerinde Süt Verimi İle İlgili Özellikler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı 25: 402-411.
- Ensminger, M.E., Parker, R.O. 1986. Sheep and Goat Science, Fifth Edition. Danville, Illinois: The Interstate Printers and Publishers Inc.
- Ergün, A. 1998. Obezite, besin alımı ve vücut ağırlığının kontrolünde leptin. **T Klin Tıp Bilimleri**, 18: 220-225.
- Erlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain-reaction. **Science**, 252: 1643-1651.
- Ertuğrul, M., Savaş, T., Dellal, G., Taşkın, T., Koyuncu, M., Cengiz, F., Dağ, B., Koncagül, S., Pehlivan, E. 2010. Türkiye küçükbaş hayvancılığının iyileştirilmesi. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler, 11-15 Ocak 2010, S:667-685, Ankara.
- Eryavuz, A., Avcı, G., Küçükkurt, I., Fidan, A.F. 2007. Comparison of plasma leptin, insulin and thyroid hormone concentrations and some biochemical parameters between fattailed and thin-tailed sheep breeds. **Revue Med Vet.**, 158: 244-249.
- Fonfara, S., Hetzel, U., Tew, S.R., Duker-McCowan, J., Cripps, P., Clegg, P.D. 2011. Leptin expression in dogs with cardiac disease and congestive heart failure. **Journal of veterinary internal medicine**, 25: 1017-1024.
- Frederich, R.C., Löllmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B., Flier, J.S. 1995. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, 96(3): 1658-1663.
- Friedman, J.M., Halaas, J.L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, 395: 763-770.

- Fruhbeck, G., Jebb, S.A., Prentice, A.M. 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. **Clin Physiol**, 18: 399-419.
- Garcia, M.R., Amstalden, M., Keisler, D.H., Raver, N., Gertler, A., Williams, G.L., 2004. Leptin attenuates the acute effects of centrally administered neuropeptide Y on somatotropin but not gonadotropin secretion in ovariectomized cows. *Domest Anim Endocrinol*, 27: 89.
- Haegeman, A., van Zaveren, A. Peelman, L.J., 2000. New mutation in exon 2 of bovine leptin gene. **Anim. Genet.**, 31: 79.
- He, Y., Chen, H., Quon, M.J., Reitman, M., 1995. The Mouse obese Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, 270: 28887-28891
- Houseknecht, K.L., Baile, C.A., Matteri, R.L., Spurlock, M.E. 1998. The biology of leptin: a review. **Journal of Animal Science**, 76(5): 1405-1420.
- Kaymakçı, M. 2006. Keçi Yetiştiriciliği. 238s. Bornova.
- Kaymakçı, M. 2005. Süt Keçiciliği Ulusal Kongresi değerlendirme ve öneriler raporu. Süt Keçiciliği Ulusal Kongresi, Bornova, İzmir.
- Kaymakçı, M., Dellal, G., 2006, Türkiye ve Dünya Keçi Yetiştiriciliği. Keçi Yetiştiriciliği (Ed: Kaymakçı, M.), Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir İli Damızlık Koyun-Keçi Birliği Yayınları No:2, İzmir, s.3-15
- Kim, K.H. 1996. Scientists Sprint to Understand Fat-Busting Protein Leptin. *Purdue News*, 11.
- Kirel, B., Doğruel, N. 1998. Yeni bir hormon: Leptin. **Sürekli Tıp Eğt Derg**, 7: 421-423.
- Komisarek, J., Dorynek, Z. 2005. Polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in the Polish population of Holstein-Friesian bulls. **Ann. Anim. Sci.**, 5(2): 253-260.
- Leifers, S.C., Veerkamp, R.F., te Pas, M.F.W., Delavaud, C., Chilliard, Y., Van der Lende, T. 2003. Leptin Concentrations in Relation to Energy Balance, Milk Yield, Intake, Live Weight, and Estrus in Dairy Cows. **J. Dairy Sci.**, 86:799-807.
- Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M. and Strabel, T., 2004. effect of leptin gene polymorphism

- on breeding value form ilk production traits. *J. Dairy Sci.* 87 (11):3925-3927
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P.A., Friedman, J.M. 1995. Leptin levels in human and rodent measurement of plasma leptin and weight– reduced subjects. **Nature Medicine**, 1: 1155-1161.
- Maitra, A., Sharma, R., Pandey, A.K., Singh, L.V., Mandakmale, S.D., Mishra, B.P., 2014. Preliminary identification and characterisation of leptin gene polymorphism in Indian goats. **Journal of Applied Animal Research**, 42(1): 118-122.
- Mantzoros C.S., Prasad A.S., Beck F.W.J., Grabowski S, Kaplan J, Adair C, Brewer G. J, 1998. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 17: 270–275.
- Meier, U., Gressner, A.M. 2004. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. **Chinical Chemistry**, 50 (9): 1511-1525.
- Singh, S.K., Rout, P.K., Agarwal, R., Mandal, A., Singh, S.K., Shukla, S.N., Roy, R. 2009. Characterization of Exon 2 and Intron 2 of Leptin Gene in Indian Goats. **Animal Biotechnology**, 20(2): 80-85.
- Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W. 1996. The bovine homolog of the obese gene maps to Chromosome 4. **Mammalian Genome**, 7: 399-400.
- Şengonca, M. 1989. Küçükbaş Hayvan Yetiştirme. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 27
- Şengonca, M., Koşum, N., 2005. Koyun ve keçi yetiştirme (Keçi yetiştirme ve ıslahı) s:12-13 Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları No: 563 İzmir.
- Şengonca, M., Taşkın T., Koşum N. 2003. Saanen x Kıl melezlerinin ve saf Kıl keçilerinin kimi verim özelliklerinin belirlenmesi üzerine eş zamanlı bir araştırma. **Türk J. Vet. Anim. Sci.**, 27: 1319-1325.
- Taniguchi, Y., Itoh, T., Yamada, T., Sasaki, Y. 2002. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life**, 53(2): 131-135.
- TUİK, 2019. Hayvansal üretim istatistikleri (Yıllık), Tür ve ırklarına göre Hayvan Sayısı, Küçükbaş Hayvan Sayıları.

[http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002] Erişim Tarihi: 5 Kasım 2019.

- Tuncel, E., Bayındır, Ş. 1983. Türkiye’de keçilerin genetik ıslahı. Avrupa Zootekni Federasyonu Uluslar arası Akdeniz Bölgesi Koyun ve Keçi Üretimi Sempozyumu 17-21 Ankara.
- Wang, C., Zhang, H., Niu, L., Guo, J., Jia, X., Wang, L., Li, L., Zhang, H., Zhong, T., 2015. The novel SNPs of leptin gene and their associations with growth traits in Chinese Nanjiang Yellow goat. **Gene**, 572(1): 35-41.
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowskii J., Zoller, M. 1992. The polymerase chain reaction. In: Recombinant DNA. pp. 79-98, New York
- Williams, G.L., Amstalden, M., Garcia, M.R., Stanko, R.L., Nizielski, S.E., Morrison, C.D., Keisler, D.H. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Dom.Anim.Endocrinol**, 23: 339-349.
- Yargıcı, Ş. 1990. Akkeçilerde Erken Sütten Kesmenin Besi Gücü. Büyüme ve Kimi Döl Verimi Özellikleri Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara.
- Yeh, F.C., Yang, R.-C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.-H., Mao, J.X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. In, University of Alberta, Canada (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/Pop32.exe>)
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M, Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372: 425-432.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Neşe CANKARA

Doğum Yeri ve Tarihi : Antalya / 19.02.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Akdeniz Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : nesecankara89@hotmail.com

Tarih : 04/12/2019