

Keçi Türünde Mikrosatellit Polimorfizminin Belirlenmesinde Farklı Çoklu-PZR (Multiplex PCR) Sistemleri*

Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU**, Bengi ÇINAR KUL***, Bilal AKYÜZ****, Emel ÖZKAN*****, Okan ERTUĞRUL*****, Halil EROL*****

Öz: Bu çalışma; TÜBİTAK tarafından TÜRKHAYGEN-I (Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I) projesi kapsamında desteklenmiştir. Mikrosatellit belirteçler ile genetik çeşitliliğin araştırılması amacıyla keçi türünde 20 lokustan oluşan 4 farklı çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sisteminin kullanılabilirliği ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmanın materyalini Türkiye’de yetiştirilen Ankara Keçisi, Kilis Keçisi, Honamlı Keçisi, Kıl Keçisi ve Norduz Keçisi gibi 5 farklı yerli keçi ırkı oluşturmuştur. Araştırmada 20 lokusa ilişkin tek tek PZR optimizasyonlarının yapılmasının yanı sıra; 4 farklı çoklu PZR sisteminin de optimizasyonları yapılmış; bu sistemlerin populasyon yapısı ve genetik çeşitliliğin araştırılmasında kullanılabilirliği vurgulanmıştır.

Anahtar sözcükler: Keçi, mikrosatellit, PCR-multiplex sistem, polimorfizm.

Determination of Microsatellite Polymorphism in Goat Species Using Different PCR-Multiplex Systems

Abstract: This study was supported by TUBITAK TURKHAYGEN-I (In Vitro Conservation and Preliminary Molecular Identification of Some Turkish Domestic Animal Genetic Resources-I) project. In order to investigate the genetic diversity of goat has been carried out with 20 different microsatellite markers in 4 different multi-locus polymerase chain reaction (PCR) system. Five different breed of domestic goat were used in the study namely Angora goat, Kilis goat, Honamlı goat, Hair goat and Norduz goat.

PCR optimizations were made for individual locus and 4 different multiplex-PCR systems. The applicability of these systems were demonstrated for population structure and genetic diversity.

Key words: Goat, microsatellite, PCR-multiplex systems, polymorphisms.

Giriş

Son yıllarda çiftlik hayvanlarında genetik çeşitliliğin ortaya konması amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Sığır, koyun, domuz gibi çiftlik hayvanlarında bu çalışmaların sayısı fazla olmasına rağmen (6, 10, 12, 26, 28), keçi ile ilgili çalışmalar (1, 8, 11, 13, 15) son zamanlarda artış göstermiştir. Bu bağlamda; populasyon genetiği çalışmalarında yeni ve güçlü moleküler belirteçlerden yararlanılmaktadır. PZR ve çeşitli moleküler uygulamaların yaygınlaşması ile birlikte SNP (Single Nucleotide polymorphism), mtDNA (Mitochondrial DNA), Y kromozomu, RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve mikrosatellitler gibi çok farklı moleküler belirteçlerin kullanıldığı teknikler geliştirilmiştir. Bu belirteçler birçok hayvan türünde çeşitli amaçlara yönelik olarak başarıyla ve sıklıkla kullanılmaktadır. Eş-baskın (ko-dominant) belirteçlerden olan mikrosatellit DNA lokusları; 2-6 nükleotit uzunlukta kısa, tekrarlanan DNA bölmelerini ifade etmektedir (7, 14). Mikrosatellitler; basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats, SSR) ya da kısa ard arda tekrarlar (Short Tandem Repeats, STR) olarak da adlandırılırlar (3, 7). Polimorfik bir lokusta tekrarların sayısı 5'ten 100'e kadar değişebilmektedir. Mikrosatellit PZR ürünleri her bir lokusa göre değişen ve genel olarak 75 ile 300 baz çifti uzunluğu arasındadır (3). Bu mikrosatellit lokuslarının çalışmanın amacına göre; farklı kromozom bölgeleri üzerinde bulunmaları (11), yüksek polimorfik özellik göstermeleri (11), yüksek heterozigotluk düzeylerine sahip olmaları (21), allel sayılarının 4 ve üzeri olarak tanımlanması (5), ISAG ve FAO tarafından önerilmeleri (11, 18) gerekmektedir ve bu çalışmada bu özellikler üzerinde durulmuştur.

Mikrosatellitler ko-dominant kalıtım özelliği göstermeleri (22), lokusa özgü olmaları (9), genom içinde düzgün ve geniş yayılımları (16, 22); yüksek mutasyon oranı (27) ve genom hakkında diğer moleküler belirteçlere göre daha fazla bilgi vermeleri (22) yanında PZR' ye dayalı bir teknik olmasından dolayı çok tercih edilen ve birçok türde kullanılan bir DNA belirteçleridir.

* Bu çalışma birinci yazarın doktora tezinin bir bölümünün özeti olup, TÜBİTAK TÜRKHAYGEN-I (Türkiye Yerli Evcil Hayvan Genetik Kaynaklarından Bazılarının In Vitro Korunması ve Ön Moleküler Tanımlanması-I) (Proje No: KAMAG 1007- 106G005 (117)) projesi kapsamında desteklenmiştir.

** Arş. Gör. Dr., Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootečni AD, 15100, Örtülü-Burdur

*** Arş. Gör. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik AD, 06110, Dışkapı-Ankara

**** Yrd. Doç. Dr., Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootečni AD, Kayseri

***** Yrd. Doç. Dr., Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 59030, Tekirdağ

***** Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik AD, 06110, Dışkapı-Ankara

***** Uzm. Vet. Hekim, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, 06852, Ankara

Genom içerisinde mikrosatellit lokusları; oligonükleotit primerler kullanımı ile PZR aracılığıyla yükseltgenebilirler. Daha sonra bu PZR ürünleri elektroforez ile görüntülenebilirler. Heterozigot olanlar iki bant, homozigot olanlar tek bant olarak görüntülenirler. Bir popülasyonda; mikrosatellit lokuslarının PZR yöntemiyle çoğaltılması ve jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda, heterozigot ve homozigot hayvanlara ait molekül ağırlıklarına göre yayılarak oluşan bantlar jel üzerinde görüntülenebilmektedir. Mikrosatellitler jel elektroforezi ile görüntülenebildikleri gibi; otomatik dizi analiz cihazlarında fragment analizi yapılarak bilgisayar sisteminde özel analiz programlarıyla uzunluğu bilinen standart örnek yardımıyla da analiz edilebilmektedirler. Kapiller elektroforez sisteminin kullanıldığı bu teknikte; sonuçlar allel uzunluklarını gösteren pikler şeklinde elde edilmektedir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler (kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı, 20-30 nükleotid uzunluğunda sentetik oligonükleotit) tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir (4). Bu bağlamda birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması da çoklu (multipleks) PZR olarak adlandırılır. Bu PZR uygulaması; emek, zaman, maliyetten tasarruf sağlarken kontaminasyon riskini de en düşük düzeye indirmektedir. Ancak yöntemin başarılı olabilmesi için primer seçiminden, tüm PZR reaksiyonlarının aynı tampon-ısı koşullarında optimize edilebilmesi, jelde görüntülenebilmesi gibi koşulların birlikteliğinin sağlanması gerekmektedir (2).

Gen kaynakları korunması ve genetik çeşitliliğin araştırıldığı çalışmalarda son zamanlarda FAO İkinci Ulusal Çiftlik Hayvanları Genetik Kaynaklarının Yönetimi Planı'nda her ırktan en az 25 akraba olmayan hayvanın ve en az 20-25 mikrosatellit lokusunun kullanılması gerektiğini vurgulamaktadır (27). Bu bağlamda çok sayıda lokus ve hayvan ile yapılacak çalışmalarda çoklu PZR sistemlerin kullanılmasında fayda vardır.

Bu çalışma kapsamında farklı allel uzunluklara sahip lokuslar ile setler oluşturulmuş ve aynı set içindeki her bir lokus üretici firmaya farklı floresan boyalarla işaretlendirilerek farklı çoklu PZR sistemleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırmanın materyalini, TÜRKHAYGEN-I projesi kapsamında Türkiye'ye özgü 5 yerli keçi ırkından (Ankara

keçisi (n=50), Kilis keçisi (n=51), Honamlı keçisi (n=49), Kıl keçisi (n=52) ve Norduz keçisi (n=49)) 251 baş keçinin DNA örneklerinden elde edilen veriler oluşturmuştur. DNA izolasyonu için tüm keçilerden K₃EDTA içeren tüplere kan alınmıştır. Tüm örneklerin DNA izolasyonları standart Fenol-Kloroform DNA izolasyonu metoduna göre yapılmıştır (25).

Elde edilen DNA örneklerinin ISAG (Uluslararası Hayvan Genetiği Derneği; International Society of Animal Genetics) ve FAO (Tarım ve Gıda Örgütü; Food and Agriculture Organization) tarafından önerilen 20 mikrosatellit belirteci ile genetik çeşitlilikleri araştırılmak üzere; farklı allel uzunluklara sahip lokuslar ile setler oluşturulmuş ve aynı set içindeki her bir lokus üretici firmaya (Beckman Coulter) farklı floresan (D2 (siyah), D3 (yeşil), D4 (mavi)) boyalarla işaretlendirilmiştir (Tablo 1). Çalışmada kullanılan 20 adet polimorfik mikrosatellit lokusu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (Multipleks ve geleneksel PZR ile) ile yükseltgenmiştir. Mikrosatellit bölgelerinin yükseltgenmesinde Eppendorf marka Mastercycler Gradient isimli PZR cihazı kullanılmıştır. PZR ile yükseltgenmede reaksiyon başına kullanılacak DNA kalıp miktarı, MgCl₂, primer ve dNTP konsantrasyonları ve mikrosatellit lokuslarının her birine özgü primerlerin bağlanma sıcaklıkları (Ta; annealing temperature) gradient özellikli ısı döngü cihazında optimize edilmiştir. PZR optimizasyonları yapılmış ve uygun PZR koşulları ile reaksiyon bileşenleri belirlenmiştir (Tablo 2 ve Tablo 3). Geleneksel PZR ile optimize olan farklı renk ve farklı allel uzunluğundaki ürünler aynı tüp içinde karıştırılarak (co-loading, multiloading) ve zaman, iş gücü, maddi kayıpların önüne geçilmesi açısından çoklu PZR ile optimize olan ürünler de doğrudan fragment analizleri yapılmak üzere Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarında bulunan Beckman Coulter CEQ8000 otomatik dizi analiz sistemine yüklenmiştir. PZR ile yükseltgmeden sonra %2 lik jelde kontrolleri yapılan PZR ürünleri kapiller elektroforez sisteminin kullanılması ile her örneğe özgü allel uzunlukları belirlenmiştir. Bu PZR ürünleri, bilgisayar sisteminde özel analiz programlarıyla uzunluğu bilinen standart (D1 boyası, kırmızı) örnek yardımıyla analiz edilmiştir. Fragment analizinde; PZR ürünleri formamid (SLS; Sample Loading Solusyonu) ve CEQ-Size Standart-400 ile birlikte Beckman Coulter CEQ-8000 analiz sistemine yüklenmiştir. FragTest-3 protokolü (90°C'de 2 dakika denatürasyon, 2.0 kV 30 saniye injeksiyon, 50°C kapiller ısı ve 6 kV 35 dakika seperasyon) ile kapiller elektroforez uygulandıktan sonra, alleller CEQ fragman analiz programı kullanılarak "default" kalibrasyonu ile tanımlanmıştır. Araştırma kapsamında oluşturulan Set 1, Set 2, Set 3; 5'li olarak, set 4 ise 4'lü multipleks ve BM1818 lokusu ile birlikte (coload) fragment analiz sistemine yüklenmiştir.

Tablo 1: 20 mikrosatellit lokusuna ilişkin özellikler.**Table 1:** Characteristics of 20 microsatellite locus.

SET	LOKUS	PRIMER (5'–3') İLERİ, GERİ	BOYA	ALLEL GENİŞLİĞİ	GEN BANKASI KODU
SET1	MAF70	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC GCAGGACTCTACGGGGCCCTTTGC	D2	132-158	M77199
	OARAE54	TACTAAGAAACATGAAGCTCCCA GGAAACATTATCTTATTCTCAGTG	D3	114-150	L11048
	SRCRSP5	GGACTCTACCACTGAGCTACAAG TGAATGAAAGCTAAAGCAATGC	D4	158-182	L22197
	SRCRSP8	TGCGGCTCGGTTCTGATTTCAC GTTTCTCTCTGCAAGAGTTCGATGCTTAG	D4	210-242	L22200
	SRCRSP23	TGAACGGGTAAGATGTC TGTTTTAATGGCTGAGTAG	D4	76-118	-
SET2	CSR247	GGACTTGCCAGAATCTGCAAT CACCTGGGTTTGTATTAGTCAGG	D4	217-249	-
	INRA005	CAA TCTGCACTGACTATAAATAT CTT CAG GCA TAC CCTACA CC	D2	127-145	X63793
	OARFCB48	GAGTTAGTCAAGGATCAAGAGGCAC GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	D3	136-170	M82875
	SRCRSP1	TGC AAG AAG TTT TTC CAG AGC ACC CTG GTT TCA CAA AAG G	D4	118-160	L22192
	SRCRSP15	CTTTACTTCTGACATGGTATTTC TGCCACTCAATTAGCAAGC	D4	158-230	-
SET3	ILSTS11	GCT TGC TAC ATG GAA AGT GC CTA AAA TGC AGA GCC CTA CC	D2	265-283	L23485
	ILSTS30	CTGCAGTCTTGCATATGTGG CTTAGACAACAGGGGTTTGG	D2	150-180	L37212
	INRA23	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTAGATGAACT	D4	193-217	X80215
	OARCP34	CCTGAACAATGIGATATGTTCCAGG GGGCAATACTGTCTTGA TGCTCC	D4	104-132	U15699
	OARFCB20	GGAAAACCCCATATATACCTATAC AAATGTGTTAAGA TTCATACATGTG	D3	88-124	L20004
SET4	BM1818	AGC TGG GAA TAT AAC CAA AGG AGT GCT TTC AAG GTC CAT GC	D2	226-270	G18391
	HSC	CTG CCA ATG CAG AGA CAC AAG A GTC TGT CTC CTG TCT TGT CAT C	D4	266-302	S83920.1
	MAF65	AAAGCCAGAGTATGCAATTAGCAG CCACTCCTCTGAGAAATATAACATG	D3	116-168	M67437
	OARFCB304	CCC TAGGAG CTT TCA ATA AAG AAT CGG CGC TGC TGT CAA CTG GGT CAG GG	D2	124-178	L01535
	TGLA53	GCTTTCAGAAA TAGTTTCATTCA ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	D4	102-168	-

Tablo 2: Set1, Set2, Set3 ve Set4'e ilişkin PZR reaksiyon bileşenleri.**Table 2:** The PCR reaction components of 4 different systems (Set1, 2, 3, 4).

PZR	SET1	SET2	SET3	SET4	BM1818 (SET4)
ddH ₂ O	15µL'ye tamamlanır	15µL'ye tamamlanır	15µL'ye tamamlanır	15µL'ye tamamlanır	15µL'ye tamamlanır
10X Buffer	1,5µL	1,5µL	1,5µL	1,5µL	1,5µL
10mM dNTP mix	0,45µL	0,45µL	0,45µL	0,45µL	0,15µL
25mM MgCl ₂	1,5µL	1,5µL	1,5µL	1,5µL	0,9µL
10pmol Primer mix	SRCRSP23 0,5µL SRCRSP5 0,4µL SRCRSP8 0,4µL MAF70 0,5µL OARAE54 0,5µL	SRCRSP1 0,4µL SRCRSP15 0,4µL CSR247 0,3µL INRA005 0,5µL OARFCB48 0,5µL	OARCP34 0,5µL INRA23 0,5µL ILSTS30 0,5µL ILSTS011 0,5µL OARFCB20 0,5µL	HSC 0,6µL MAF65 0,6µL OARFCB304 0,5µL TGLA53 0,5µL	0,5µL
Taq DNA pol.	0,1µL	0,1µL	0,1µL	0,1µL	0,1µL
DNA	~60-100ng	~50-100ng	~50-100ng	~60-100ng	~50-100ng
Toplam	15µL	15µL	15µL	15µL	15µL

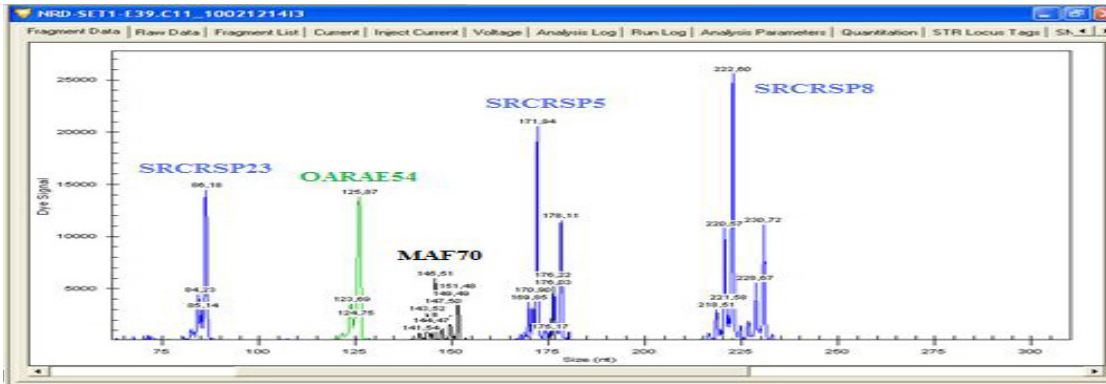
Tablo 3: Set1, Set2, Set3 ve Set4'e ilişkin ısı döngü koşulları.**Table 3:** PCR conditions of 4 different Sets (Set1, 2, 3, 4).

SET1	SET2	SET3	SET4	BM1818 (SET4)
95°C 5 DAKİKA 94 °C 30 SANİYE 58°C 45 SANİYEX30 72 °C 1,5 DAKİKA 72 °C 20 DAKİKA	95°C 5 DAKİKA 94 °C 30 SANİYE 58°C 45 SANİYEX30 72 °C 1,5 DAKİKA 72 °C 20 DAKİKA	95°C 5 DAKİKA 94 °C 30 SANİYE 57,9°C 45 SANİYEX30 72 °C 1,5 DAKİKA 72 °C 20 DAKİKA	95°C 5 DAKİKA 94 °C 30 SANİYE 60°C 45 SANİYEX30 72 °C 1,5 DAKİKA 72 °C 20 DAKİKA	94 °C 4 DAKİKA 94 °C 30 SANİYE 58 °C 30 SANİYEX30 72 °C 30 SANİYE 70 °C 15 DAKİKA

Bulgular

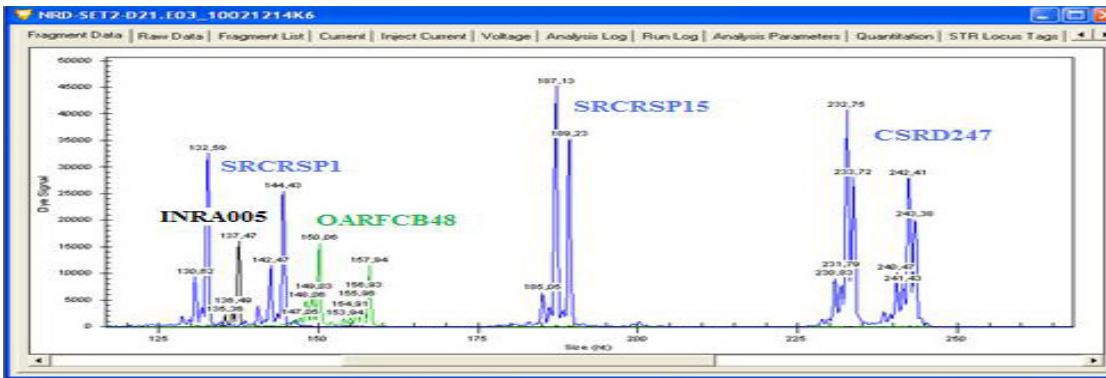
Standart Fenol-kloroform yöntemi ile izole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PZR sonunda elde edilen ürünler ile gerçekleştirilen % 2'lik agaroz jel elektroforezlerinde tüm örneklerde farklı her sete ilişkin 5'er (set 4 hariç, 4 bant ve ayrı 1 bant BM1818) bant elde edilmiştir. Elde

edilen PZR ürünlerinin Beckman Coulter otomatik dizi analiz cihazında fragment analizi yapılmıştır. Çalışmada incelenen keçi ırklarının mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesi amacıyla oluşturulan farklı setlere ilişkin çoklu PZR sonuçlarının başarılı olduğu belirlenmiştir (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4).



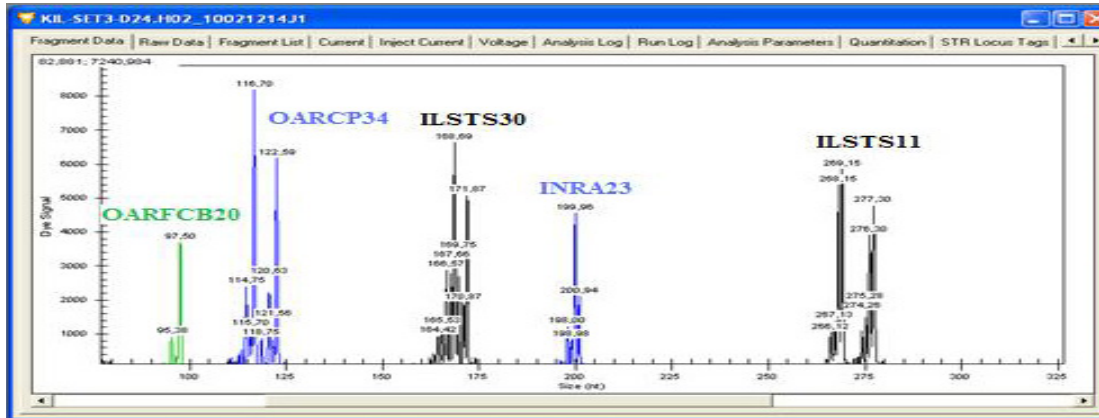
Şekil 1: Norduz Keçisi SET1 (SRCRSP23; OARAE54; MAF70; SRCRSP5; SRCRSP8) e ilişkin yükseltgenen lokusların örnek elektroferogram görüntüsü.

Figure 1: An elektroferogram result of a Norduz goat sample with Set 1 (SRCRSP23; OARAE54; MAF70; SRCRSP5; SRCRSP8).



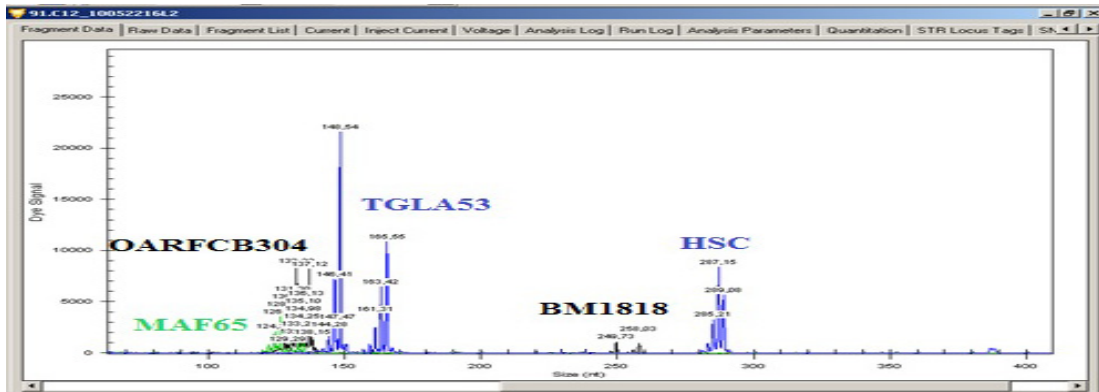
Şekil 2: Norduz Keçisi SET2 (SRCRSP1; OARFCB48; INRA005; SRCRSP15; CSRD247)' ye ilişkin yükseltgenen lokusların örnek elektroferogram görüntüsü.

Figure 2: An elektroferogram result of a Norduz goat sample with Set 2 (SRCRSP1; OARFCB48; INRA005; SRCRSP15; CSRD247).



Şekil 3: Kıl Keçisi SET3 (OARFCB20; OARCP34; ILSTS30; INRA23; ILSTS11)'e ilişkin yükseltgenen lokusların örnek elektroferogram görüntüsü.

Figure 3: An electroferogram result of a Hair goat sample with Set 3 (OARFCB20; OARCP34; ILSTS30; INRA23; ILSTS11).



Şekil 4: Kıl Keçisi SET4+Coloading (MAF65; OARFCB304; TGLA53; BM1818; HSC) e ilişkin yükseltgenen lokusların örnek elektroferogram görüntüsü.

Figure 4: An electroferogram result of a Hair goat sample with Set 4+Coloading (MAF65; OARFCB304; TGLA53; BM1818; HSC).

Tartışma ve Sonuç

Çiftlik hayvanlarında; genetik çeşitlilik, ebeveyn tayini (paternity test) ve pedigrî çalışmalarında çoğunlukla mikrosatellit belirteçler tercih edilmektedir (19). Özellikle keçi türünde genetik çeşitliliğin araştırıldığı çalışmalar son zamanlarda ivme kazanmıştır. Bu bağlamda, birçok çalışmada farklı keçi ırklarının DNA örneklerini kullanarak mikrosatellit polimorfizmi yönünden genotiplerinin belirlenmesine olanak sağlayan farklı çoklu PZR metodu geliştirilmiştir (1, 8, 13, 17, 19). Farklı sayıda lokusların kullanıldığı bazı çalışmalarda; her lokusun ayrı ayrı (20, 23, 29); çoklu (1, 8, 17) ya da touch-down (15, 18, 24) protokoller kullanılarak yükseltgenbildiği vurgulanmıştır. Ancak bu çalışmalarda; PZR ile yükseltgenmede reaksiyon başına kullanılacak DNA kalıp miktarı, MgCl₂, primer ve dNTP konsantrasyonları ve mikrosatellit lokuslarının her birine özgü primerlerin bağlanma sıcaklıkları (Ta; annealing temperature) gradient özellikli ısı döngü cihazında optimize edilmesi oldukça önemli bir konudur.

Bu çalışmada her bir lokus için geleneksel PZR'nin ayrı ayrı optimize edilmesinin yanında çoklu PZR de optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda; çoklu PZR karışımı her bir primerden 3-6 pmol değişen miktarlarda, 1,5 mM, 2,5 mM ve 3 mM konsantrasyonlarda MgCl₂, 200 µM dNTP, 50 ile 100ng arasında değişen miktarlarda genomik DNA'dan kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bununla birlikte; gradient özellikli ısı döngü cihazında primerin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi için 53°C ile 64°C arasında değişen sıcaklıklar denenmiştir. Türkiye'de yetiştirilen 5 yerli keçi ırkında yapılan bu çalışmada keçi türünde genetik çeşitliliğin ortaya konması için 20 mikrosatellit lokusuna ilişkin 4 farklı çoklu PZR seti 4 farklı jel hattında yapılmış; uygun reaksiyon bileşenleri ve koşulları bildirilmiştir (Tablo 2 ve 3). Bu bağlamda; PZR karışımı, her primerden 3-6pmol değişen miktarlarda (Tablo 2), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,5 U Taq DNA polimeraz ve ortalama 75ng genomik DNA'dan ilave edilmiştir. Ayrıca fragment analizi sonuçları da eş zamanlı

değerlendirildiğinde en uygun primer bağlanma sıcaklıklarının Set 1, Set 2 için 58°C, Set 3 için 57,9°C ve Set 4 için 60°C olduğu belirlenmiştir. Ortak lokusların da kullanılmış olduğu bazı çalışmalarda primer bağlanma sıcaklıkları 50°C ile 60°C arasında bildirilmiştir (17, 19).

Luikart ve ark., keçi türünde yapmış oldukları çalışmada; 22 lokus ile çalışmış ve 6 farklı multipleks set (3'erli ve 4'erli) oluşturmuşlardır. Türkiye yerli keçi ırkları ile yapılan bu çalışma ile ortak olan 10 lokus bulunmaktadır (SRCRSP23, MAF65, OARFCB48, OARFCB20, OARAE54, ILSTS011, TGLA53, SRCRSP8, SRCRSP15, SRCRSP5). Ortak lokus sayısı 10 olmasına rağmen her çoklu PZR seti hem içerdikleri lokuslar bakımından hem de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve ısı döngü koşulları bakımından farklı tasarlanmıştır.

Canon ve ark., yapmış oldukları çalışmada; Orta Doğu ve Avrupa ülkelerinden 1426 baş keçi ile yaptıkları çalışmada 30 lokus ile çalışmış ve farklı setler (5 ile 8 arasında değişen setler) kullanılmışlardır. Bu çalışma ile CSRD247, ILSTS011, INRA023, MAF65, MAF70, OARAE54, OARFCB20, OARFCB48, SRCRSP15, SRCRSP23, SRCRSP5, SRCRSP8, TGLA53 lokusları ortaktır. Ancak hazır çoklu PZR kitleri tercih edilmiştir.

Jandurova ve ark., keçi türünde yapmış oldukları çalışmada; 7 lokus ile çalışmış ve 2 farklı multipleks sistem kullanmışlardır. Türkiye yerli keçi ırkları ile yapılan çalışma ile ortak olan 4 lokus bulunmaktadır (ILSTS011, MAF65, OARFCB48, OARAE54). Ortak 4 lokusun 3 tanesi bir set olarak önerilmiş, ancak yerli keçi ırklarında yapılan bu çalışmada önerilen setlerde aynı grup içinde tasarlanmamıştır.

Agha ve ark., yapmış oldukları çalışmada; 7 lokus ile çalışmış ve tek multipleks sistem (7 li) kullanmışlardır. Türkiye yerli keçi ırkları ile yapılan çalışma ile ortak olan 4 lokus bulunmaktadır (INRA005, SRCRSP5, CSRD247, HSC). Ortak lokuslardan 2 tanesi (INRA005, CSRD247) yerli ırklarda yapılan bu çalışmada da aynı set içerisinde önerilmiş olmasına rağmen diğer lokuslar farklı setler içinde yer almaktadır.

Tasarlanan çoklu setler ile Türkiye'de yetiştirilen 5 keçi ırkının kullanıldığı bu çalışmada bazı ortak lokuslar kullanılmış olsa da önerilen çoklu PZR setleri ve koşulları benzer değildir. Çoklu PZR koşulları ve buna ilişkin yapılan fragment analizleri birlikte değerlendirildiğinde; kullanılan cihaz farklılıkları ve oluşturulan setlerde farklı lokusların da yer alması bu durumu açıklamaktadır.

Elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalar için yol gösterici olması ve Türkiye'de yetiştirilen yerli keçi ırkları ile yapılan ilk çalışma olması açısından önemlidir. Özellikle zaman, iş gücü, maddi kayıpların önüne geçilmesi açısından mikrosatellit lokusları için çoklu PZR daha etkili bir yöntem olmasına rağmen teknik olarak tekli lokus amplifikasyonuna göre daha zordur (2, 19). Ancak yöntemin optimizasyonunda başarı sağlandığında çoklu PZR sistemlerin kullanılması daha uygundur. Bu nedenle; keçi türünde genetik çeşitliliğin araştırıldığı çalışmalarda, bu çalışmada bildirilen çoklu PZR sistemlerinin kullanılması önerilebilir.

Kaynaklar

1. Agha SH, Pilla F, Galal S, Shaat I, D'Andrea M, Reale S, Abdelsalam AZA, Li MH (2008): Genetic diversity in Egyptian and Italian goat breeds measured with microsatellite polymorphism. *J. Anim. Breed. Genet.*, 125: 194–200
2. Akar N (1999): Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (İkinci Baskı). Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara
3. Allendorf FW, Luikart G (2007): Conservation and the Genetics of Populations (1st Edition). Wiley-Blackwell, MA, USA
4. Arı Ş (2008): DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. 101–117. İçinde: Temizkan G, Arda N (Ed) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., Ankara
5. Barker JSF (1994): A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds. *Proceeding of 5th World Congress on Genetic Application of Livestock Production*, 21: 501–508
6. Barker JS, Tan SG, Selvaraj OS, Mukherjee TK (1997): Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics* 28: 1–13
7. Butler JM (2005): Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers (2nd Edition). Elsevier Academic Press, New York
8. Canon J, Garcia D, Garcia-Atance MA, Obexer-Ruff G, Lenstra JA, Ajmone-Marsan P, Dunner S (2006): Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Animal Genetics*, 37(4): 327–334
9. Condit R, Hubbell SP (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66–71
10. Dalvit C, Sacca E, Cassandro M, Gervaso M, Pastore E, Piasentier E (2008): Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 80: 45–51
11. Dixit SP, Verma NK, Ahlawat SPS, Aggarwal RAK, Kumar S, Chander R, Singh KP (2008): Molecular genetic characterization of Kutchi breed of goat. *Current Science*, 95(7): 946–952
12. Elbeltagy AR, Galal S, Abdelsalam AZ, El Keraby FE, Blasi M, Mohamed MM (2008): Biodiversity in Mediterranean buffalo using two microsatellite multiplexes. *Livestock Science*, 114: 341–346
13. Fatima S, Bhong CD, Rank DN, Joshi CG (2008): Genetic variability and bottleneck studies in Zalawadi, Gohilwadi and Surti goat breeds of Gujarat (India) using microsatellites. *Small Ruminant Research*, 77: 58–64
14. Freeland JR (2005): Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd., England

- 15. Gour DS, Malik G, Ahlawat SPS, Pandey AK, Sharma R, Gupta N, Gupta SC, Bisen PS, Kumar D (2006):** Analysis of genetic structure of Jamunapari goats by microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 66: 140–149
- 16. Iamartino D, Bruzzone A, Lanza A, Blasi M, Pilla F (2005):** Genetic diversity of Southern Italian goat populations assessed by microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 57: 249–255
- 17. Jandurová OM, Kott T, Kottová B, Czerneková V (2004):** Seven microsatellite markers useful for determining genetic variability in White and Brown Short-Haired goat breeds. *Small Ruminant Research*, 52: 271–274
- 18. Kumar S, Dixit SP, Verma NK, Singh DK, Pande A, Kumar S, Chander R, Singh LB (2009):** Genetic Diversity Analysis of the Gohilwari Breed of Indian Goat (*Capra hircus*) Using Microsatellite Markers. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 4(3): 49–57
- 19. Luikart G, Biju-Duval M-P, Ertugrul O, Zagdsuren Y, Maudet C, Taberlet P (1999):** Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage analysis in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics* 30(6): 431–438
- 20. Mei J, Chun-Li G, Jing-Hui H, Wen-Bo G, Wei W (2006):** Correlation analysis of economic traits in liaoning new breed of Cashmere goats using microsatellite DNA markers. *Acta Genetica Sinica*, 33(3): 230–235
- 21. Qi Y, Luo J, Han XF, Zhu YZ, Chen C, Liu JX, Sheng HJ (2009):** Genetic diversity and relationships of 10 Chinese goat breeds in the Middle and Western China. *Small Ruminant Research*, 82: 88–93
- 22. Ramamoorthi J, Thilagam K, Sivaselvam SN, Karthickeyan SMK (2009):** Genetic characterization of Barbari goats using microsatellite markers. *J. Vet. Sci.*, 10(1): 73–76
- 23. Rout PK, Joshi MB, Mandal A, Laloe D, Singh L, Thangaraj K (2008):** Microsatellite-based phylogeny of Indian domestic goats. *BMC Genetics*, 9: 1–11
- 24. Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff G, Dolf G (1999):** Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics*, 30: 36–41
- 25. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (vol.: 3, 2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold-Spring Harbor, New York
- 26. Sollero BP, Paiva SR, Faria DA, Guimarães SEF, Castro STR, Egito AA, Albuquerque MSM, Piovezan U, Bertani GR, Mariante A da S (2009):** Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livestock Science*, 123: 8–15
- 27. Toro MA, Fernández J, Caballero A (2009):** Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*, 120: 174–195
- 28. Van-Zeveran A, Peelman L, Van de Weghe A and Bouquet Y (1995):** A genetic study of four Belgian pig populations by means of seven microsatellite loci. *J. Anim. Breed. Genet.* 112: 191–204
- 29. Xiang-Long L, Valentini A (2004):** Genetic diversity of Chinese indigenous goat breeds based on microsatellite markers. *J. Anim. Breed. Genet.*, 121: 350–355

Geliş Tarihi:19.10.2010 / **Kabul Tarihi:**29.12.2010

Yazışma Adresi:

Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Zootečni Anabilim Dalı
Orta Alan Yerleşkesi, Örtülü/BURDUR
E-posta: ozgecan2006@mynet.com