



Şanlıurfa Yöresi Halep Keçilerinde Mitokondriyal 12S rRNA Gen Sekansına Göre Filogenetik Analizler

Selahattin KİRAZ^{1*}

¹Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü, ŞANLIURFA

*Sorumlu yazar: skiraz73@gmail.com

Öz

Evcil keçiler (*Capra hircus*), yaklaşık 10.000 yıl önce Neolitik devirde Yakın Doğu'da evcilleştirilmiş ve bugün Dünya'nın bütün kıtalarına yayılmıştır. Keçiler, özellikle etinden ve sütünden yararlanılan önemli çiftlik hayvanlarıdır. Bu çalışmada, Şanlıurfa yöresindeki Halep keçilerinin filogenetik yapıları moleküler tekniklerle belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırmanın hayvan materyalini, Şanlıurfa yöresinde yetiştirilen Halep keçileri oluşturmuştur. Keçilerden toplanan kan örneklerinden genomik DNA'lar izole edilmiştir. Keçilere ait 12S rRNA gen bölgeleri PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Keçilerde 12S rRNA gen dizilerine göre; toplam bölge sayısı, G+C oranı, polimorfik bölge sayısı, haplotip sayısı, haplotip farklılığı, nükleotid farklılığı değerleri sırasıyla, 408, 0.415, 2, 4, 0.584±0.054 ve 0.00161±0.00023 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, Şanlıurfa yöresi Halep keçilerinde, 12S rRNA bölgesi gen dizileri belirlenmiştir. Gen dizi bilgilerine göre keçilerde mtDNA polimorfizmi, mtDNA haplotipleri, haplotipler ve yabancı keçiler arasında filogenetik ilişkiler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Halep keçisi, 12S rRNA geni, Filogenetik

Phylogenetic Analysis of Halep Goats in Sanliurfa Province Based on The Mitochondrial 12S rRNA Gene Sequences

Abstract

Domestic goats (*Capra hircus*) were domesticated in the Near East in the Neolithic period about 10.000 years ago, and have spread to all continents in the world today. Goats are especially important livestock used for meat and milk. In this research, determination of phylogenetic tree of Halep goats in Şanlıurfa province using molecular techniques was the main goal. Halep goats raised in Şanlıurfa province were used as the animal materials. Blood samples were collected for genomic DNA isolation. Mitochondrial 12S rRNA gene region was amplified by applying polymerase chain reaction (PCR) technique. In goats, DNA polymorphism based on 12S rRNA gene sequence, total number of site, the rate of G+C, number of polymorphic site, number of haplotype, haplotype diversity, and nucleotide diversity were found to be 408, 0.415, 2, 4, 0.584±0.054 and 0.00161±0.00023, respectively. In conclusion, in Halep goats raised in Şanlıurfa province; gene sequences of 12S rRNA were determined. Based on gene sequences information, in goats, the phylogenetic relationship among mtDNA polymorphism, mtDNA haplotypes, haplotypes and relationship between wild goats and halep goats were determined.

Key words: Halep goat, 12S rRNA gene, Phylogenetic

Giriş

Keçiler (*Capra hircus*), yaklaşık 10.000 yıl önce neolitik devirde Yakın Doğu'da evcilleştirilmiş ve bugün Dünya'nın bütün

kıtalarına yayılmıştır (Fernandez ve ark., 2006). Keçiler, etinden, sütünden, lifinden ve derisinden yararlanılan önemli bir çiftlik hayvandır. Türkiye'de yerli keçi ırkı olarak Kıl keçisi, Tiftik keçisi ve Kilis keçisi olmak üzere

3 ırktan bahsedilmektedir (Kaymakçı ve Aşkın, 1997). Kıl keçileri tüm bölgelere yayılmış olmakla beraber en yoğun yetiştirildiği bölgeler Akdeniz (%26.5), Güneydoğu (%25.6) ve Ege Bölgesi (%20.3)'dir. Tiftiğiyle ünlü olan Ankara keçisi (Tiftik Keçisi) genellikle en yoğun Ortakuzey (%60.8), Ortagüney (%19.2) ve Güneydoğu (%12.3) bölgelerinde yetiştirilmektedir. Kilis keçisi ise Gaziantep, Kilis ve Hatay illeri çevresinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Bu bölgedeki Kıl keçileri ve Suriye kökenli Halep keçilerinin melezlenmesi ile meydana gelmiş bir keçi tipidir. Uzun yıllar kendi aralarında yetiştirilerek bir örnek hale geldiklerinden ayrı bir ırk olarak da değerlendirilmektedir (Kaymakçı ve Aşkın, 1997).

Mitokondriyal DNA (mtDNA); populasyonların genetik benzerlik veya farklılıklarından yararlanılarak filogenetik ilişkilerin tespit edilmesi çalışmalarında moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır (Naderi ve ark., 2007). Keçi mitokondri genomu; protein kodlayan 13 bölge (sitokrom c oksidaz kompleksi I, II ve III altbirimleri, ATPaz kompleksi 6 ve 8 altbirimleri, NADH dehidrojenaz 1, 2, 3, 4L, 4, 5 ve 6 ile sitokrom b), 2 ribosomal RNA bölgesi (12S rRNA, 16S rRNA), kontrol bölgesi (D-loop), 22 çeşit tRNA bölgelerinden oluşmaktadır ve keçi mtDNA'sı 16.616 bp uzunluğundadır (Parma ve ark., 2003).

Kanarya Adaları (Amills ve ark., 2004), İspanya (Azor ve ark., 2005), Çin (Chen ve ark. 2005; Fan ve ark., 2007; Liu ve ark., 2009), Hindistan (Joshi ve ark., 2004), Pakistan (Sultana ve ark., 2003), Güney ve Merkez Amerika (Amills ve ark., 2009) ve Türkiye (Kiraz, 2009; Çınar Kul, 2010; Akis ve ark., 2014) bazı keçi ırklarında filogenetik ilişkiler araştırılmıştır. Türkiye yerli hayvan gen kaynakları açısından zengin genetik çeşitliliğe

sahiptir. Yerli hayvan genetik kaynaklarının korunması amacıyla; en önemli ve öncelikli yapılması gereken aşamanın, yerli ırkların genetik yapılarının ırklar arası ve ırklar içi farklılıkların incelenmesi gerektiği bildirilmiştir (Soysal ve ark., 2003). Çalışmanın amacı; Şanlıurfa yöresi Halep keçilerinde Mitokondriyal 12S rRNA gen dizilerinin belirlenmesi ile mtDNA polimorfizmi ve mtDNA haplotiplerini, haplotipler ve yabancı keçiler arasında filogenetik ilişkileri tespit etmektir.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali ve Örnek Toplama

Araştırmanın hayvan materyalini, Şanlıurfa ve yöresinde yetiştirilen Halep keçileri (Şekil 1) oluşturmuştur. Keçilerden DNA izolasyonu için kan örnekleri toplanmıştır. Seçilen hayvanların birbirlerine akraba olmaması için her sürüden bir örnek alınmıştır.



Şekil 1. Şanlıurfa yöresi Halep keçisi (Fotoğraf: S. Kiraz)

Figure 1. Aleppo goat of Şanlıurfa province (Photograph: S. Kiraz)

Moleküler Çalışmalar

Keçilerden alınan kan örneklerinden genomik DNA izolasyon kiti (GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit #K0781, Thermo) kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin

görüntülenmesinde %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. DNA örneklerinden, mitokondriyal 12S rRNA gen bölgesini çoğaltmak için gerekli ileri; 5'-CCCTCAAATCAATAAGACTAAG-3' ve geri; 5'-CGATTATAGAACAGGCTCCTC-3' primerleri kullanılmıştır (Kiraz, 2009). PCR reaksiyon karışımı; 1.0 µl kalıp DNA (~50 ng/µl), 5.0 µl 10X PCR buffer, 1.0 µl forward primer (10 pmol/µl), 1.0 µl reverse Primer (10 pmol/µl), 1.0 µl dNTP mix (1 nM), 1.5U *Taq* polimeraz (5U/µl) ve dH₂O ile toplam karışım 50 µl'ye tamamlanmıştır. PCR reaksiyon şartları; ön denaturasyon için 95 °C'de 4 dakika ve tek döngü, denatürasyon için 94 °C'de 60 sn, yapışma için 54 °C'de 60 sn, uzama için 72 °C'de 2 dakika ve bu aşamalar için 30 döngü, son uzama için 72 °C'de 10 dakika tek döngü olarak ayarlanmıştır. Tasarlanan primerler ile genin 488 bç'lik kısmı çoğaltılmıştır. PCR amlifikasyonu gerçekleşmiş örnekler gen dizileme için seçilerek ileri (F) ve geri (R) zincir olmak dizileme işlemi yaptırılmıştır (İontek).

DNA Polimorfizmi ve Filogenetik Analizler

Populasyonlar için toplam bölge sayısı, polimorfik bölge sayısı (S), haplotip sayısı (h), haplotip farklılığı (H_d : haplotypediversity), nükleotid farklılığı (π : nucleotidediversity), değerleri DnaSP5.0 (Librado ve Rozas, 2009) programı kullanılarak belirlenmiştir.

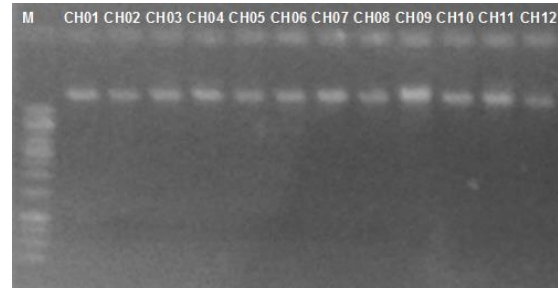
Keçilerde filogenetik analizler; genetik ilişkileri göstermek ve haplotipleri belirlemek amacıyla UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmeticmean) yöntemine göre MEGA 4.0.1 programında (Tamura ve ark., 2007) Kimura-2-parametre model (Kimura, 1980) kullanılarak yapılmıştır. Nodların (ağaç kolları) güvenilirliğinin test edilmesinde Bootstrap testi (1000 tekrarlı) kullanılmıştır (Nei ve Kumar, 2000).

Ayrıca yerli keçi ırkları ile yabancı keçilerde yapılan önceki çalışmalara ait dizi bilgileri Gen Bankasından (NCBI) temin edilerek birlikte farklı filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Genomik DNA izolasyonu

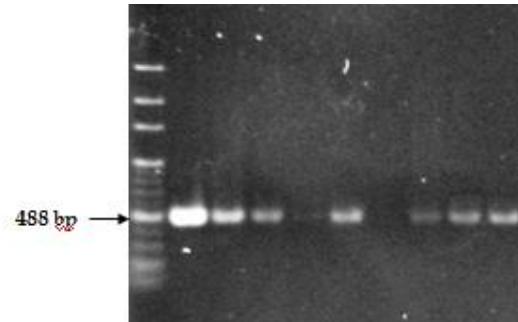
Keçilerden toplanan tüm örneklerinden genomik DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü sırasıyla Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Keçilerinden izole edilen DNA'lar
Figure 2. Isolated DNA from goats
(M: marker, 1 kb ladder)

PCR Sonuçları

İzole edilen DNA örneklerinden, rRNA gen bölgeleri primerleri kullanılarak PCR amlifikasyon çalışmaları yürütülmüştür. Tüm örneklerde PCR ürünleri elde edilmiştir. Evcil keçilerde 12S rRNA gen bölgesi 571 bç uzunluğundadır. CAP 12S (F) ve CAP 12S (R) primerleri ile bu genin 488 bç'lik kısmı PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. 12S rRNA gen bölgesi: 488 bç
Figure 3. 12S rRNA gene region: 488bp

Filogenetik Analiz Sonuçları

Evcil keçide 571 bç uzunluğunda bulunan 12S rRNA geninin, 12S rRNA primerleri ile 488 bç'lik kısmı çoğaltılmıştır. Gen dizi analizleri (İontek) ve düzenlemeler sonucunda tüm örnekler için 408 bç'lik dizi bilgisi elde edilmiştir. Keçilerde 12S rRNA gen dizi bilgileri analiz edilerek, DNA polimorfizm özellikleri belirlenmiştir (Çizelge 1). 12S rRNA geninde 2 polimorfik bölge ve 4 haplotip tespit edilmiştir. Haplotip ve nükleotid farklılığı sırasıyla 0.0584 ± 0.054 ve 0.00161 ± 0.00023 olarak bulunmuştur. Keçilerde, 12S rRNA geninde belirlenen 2 polimorfik bölgede (126. ve 189. pozisyonlar) nükleotid yer değiştirmeleri transisyon ($T \leftrightarrow C$) şeklindedir.

Keçiler, 12S rRNA genine göre UPGMA genetik ağaçta, *H1* (CH31), *H2* (CH12), *H3* (CH06, CH02, CH03, CH13, CH14, CH19, CH21, CH23, CH25, CH26, CH27), *H4* (CH04, CH15, CH16, CH09, CH10, CH17, CH18, CH20, CH22, CH28, CH29, CH30, CH32) olmak üzere 4 haplotipe ayrılmıştır (Şekil 4).

Kiraz (2009), Şanlıurfa yöresi Kıl ve Kilis keçilerinde, 12S rRNA bölgesi gen dizi bilgilerine göre mtDNA polimorfizmi, mtDNA haplotiplerini, haplotipler ve yabancı türler arasında filogenetik ilişkileri araştırmıştır. 12S rRNA gen dizisine göre haplotip ve nükleotid çeşitliliği sırasıyla, 0.706 ± 0.019 ve 0.00226 ± 0.00011 olarak bulunmuştur.

Çizelge 1. Keçilerde 12S rRNA gen dizisine göre DNA polimorfizmi

Table 1. DNA polymorphism of 12S rRNA gene sequence

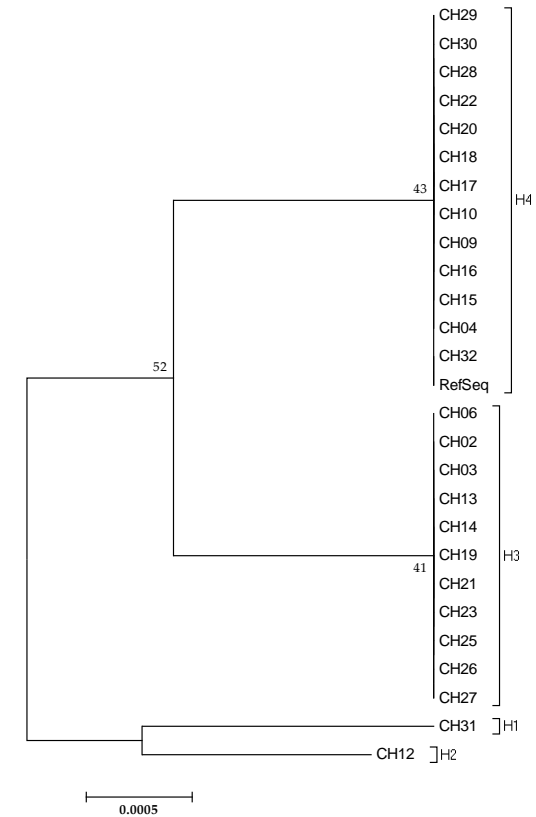
Özellikler	Genel
Specifications	General
Toplam bölge sayısı (bç)	408
G+C	0.415
Polimorfik bölge sayısı (S)	2
Haplotip sayısı (h)	4
Haplotip farklılığı Hd:	0.0584 ± 0.054
Nükleotid farklılığı, π	0.00161 ± 0.00023

Keçi haplotipleri arasında genetik uzaklıklar 0.0025-0.0049 arasında ve oldukça düşük değerlerde bulunmuştur (Çizelge 2). Keçilerde 12S rRNA gen bölgesinde korunmuş bölge oranı %99.50 olarak tespit edildiğinden ilgili gen bölgesinde polimorfizmin sınırlı olduğu gözlenmiştir.

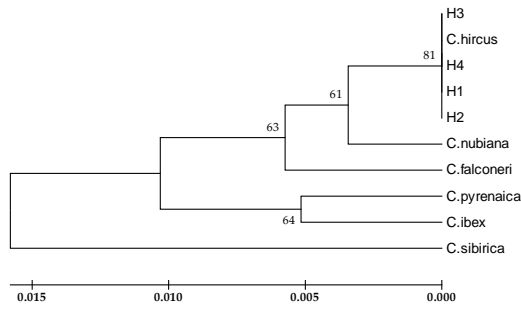
Çizelge 2. Keçi 12S rRNA haplotipleri arasında genetik farklılıklar

Table 2. Genetic distances between 12s rRNA haplotypes of goat

Haplotipler	H1	H2	H3
Haplotypes			
H1	*		
H2	0.0025	*	
H3	0.0025	0.0049	*
H4	0.0049	0.0025	0.0025



Şekil 4. 12S rRNA genine göre UPGMA ağacı
Figure 4. UPGMA tree of 12S rRNA gene



Şekil 5. Filogenetik ağaç: keçi haplotipleri, *Capra hircus* (NC_005044) ve yabani keçi türleri

Figure 5. Phylogenetic tree: Haplotypes of goat, *Capra hircus* (NC_005044) and species of wild goat

[*C. pyrenaica*: AM158313, *C. ibex*: AY846815, *C. sibirica*: AY670658, *C. nubiana* AM670657, *C. falconeri*:AY670656]

Bu çalışmada belirlenen, 12S rRNA haplotiplerine ait nükleotid diziler, yabani ırklara ait dizilerle birlikte değerlendirme için

BLAST yöntemi ile Gen Bankası (NCBI) veri tabanı taranmıştır. Burada keçi haplotiplerinin bazı yabani keçi türleri ile birlikte değerlendirmek ve filogenetik ilişkileri göstermek amacıyla filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 5). Şekil 5 incelendiğinde keçi haplotiplerinin 12S rRNA genine göre filogenetik ilişkiler bakımından referans evcil keçi (*capra hircus*; NC_005044) ile birlikte kümelenmiştir (%81). Filogenetik ağaçta, *C. hircus* ve *C. nubiana* birlikte (%61), *C. pyrenaica* ve *C. ibex* birlikte (%64), *C. sibirica* türü ise tamamen ayrılmıştır.

Mitokondriyal 12S rRNA bölgesine göre keçi haplotipleri ile yabani keçiler arasında genetik uzaklıklar Çizelge 3'te verilmiştir. Keçi haplotipleri ile yabani keçiler arasında genetik uzaklıklar 0.000-0.039 arasında bulunmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. 12S rRNA haplotipleri ve yabani keçiler arasında genetik farklılıklar

Table 3. Genetic distances between 12S rRNA haplotypes and wild goats

Haplotipler Haplotypes	<i>C.</i> <i>sibirica</i> <i>a</i>	<i>C.</i> <i>pyrenai</i> <i>ca</i>	<i>C.</i> <i>ibex</i>	<i>C.</i> <i>nubian</i> <i>a</i>	<i>C.</i> <i>falcon</i> <i>eri</i>	H3	H1	<i>C.</i> <i>hircus</i>	H4
<i>C. sibirica</i>	*								
<i>C. pyrenaica</i>	0.024	*							
<i>C. ibex</i>	0.035	0.010	*						
<i>C. nubiana</i>	0.039	0.021	0.032	*					
<i>C. falconeri</i>	0.028	0.017	0.028	0.017	*				
H3	0.032	0.014	0.024	0.007	0.010	*			
H1	0.032	0.014	0.024	0.007	0.010	0.000	*		
<i>C. hircus</i>	0.032	0.014	0.024	0.007	0.010	0.000	0.000	*	
H4	0.032	0.014	0.024	0.007	0.010	0.000	0.000	0.000	*
H2	0.032	0.014	0.024	0.007	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000

Sonuçlar

PCR ürünlerinin gen dizi bilgileri elde edilmiştir. Gen dizi bilgilerine göre dizi veri setleri oluşturulmuştur. Populasyonlar için toplam bölge sayısı, G+C oranı, polimorfik bölge sayısı (S), haplotip sayısı (h), haplotip farklılığı (H_d), nükleotid farklılığı (π) değerleri

hesaplanmıştır. 12s rRNA gen dizi bilgilerine göre mtDNA polimorfizmi, mtDNA haplotipleri, haplotipler ve yabani keçiler arasında filogenetik ilişkiler belirlenmiştir. Gen dizi bilgilerinin Gen Bankasında (NCBI) depolanması ile keçiler üzerinde yapılan moleküler filogenetik çalışmalara katkı sağlaması beklenmektedir. Ayrıca, çalışma

sonuçlarının biyoçeşitlilik ve hayvan ıslahı çalışmaları ile evcil hayvan genetik kaynakları koruma stratejilerine katkı sağlaması düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Akis, I., Oztabak, K., Mengi, A., Un, C., 2014. Mitochondrial DNA Diversity of Anatolian Indigenous Domestic Goats. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 131: 487-495.
- Amills, M., Capote, J., Tomas, A., Kelly, L., Obexer-Ruff, G., Angiolillo, A., Sanchez, A., 2004. Strong Phylogeographic Relationships among Three Goat Breeds from The Canary Islands. *Journal Dairy Research*, 71(3):257-262.
- Amills, M., Ramírez, O., Tomàs, A., Badaoui, B., Marmi, J., Acosta, J., Sánchez, A., Capote, J., 2009. Mitochondrial DNA Diversity and Origins of South and Central American Goats. *Animal Genetics*, 40(3):315-322.
- Azor, P.J., Monteagudo, L.V., Luque, M., Tejedor, M.T., Rodero, E., Sierra, I., Herrera, M., Rodero, A., Arruga, M.V., 2005. Phylogenetic Relationships Among Spanish Goats Breeds. *Animal Genetics*, 36(5):423-425.
- Chen, S.Y., Su, Y.H., Wu, S.F., Sha, T., Zhang, Y.P., 2005. Mitochondrial Diversity and Phylogeographic Structure of Chinese Domestic Goats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(3):804-814.
- Fan, B., Chen, S.L., Kijas, J.H., Liu, B., Yu, M., Zhao, S.H., Zhu, M.J., Xiong, T.A., Li, K., 2007. Phylogenetic Relationships Among Chinese Indigenous Goat Breeds Inferred from Mitochondrial Control Region Sequence. *Small Ruminant Research*, 73: 262-266
- Fernández, H., Hughes, S., Vigne, J.D., Helmer, D., Hodgins, G., Miquel, C., Hänni, C., Luikart, G., Taberlet, P., 2006. Divergent mtDNA Lineages of Goats in an Early Neolithic Site, Far from the Initial Domestication Areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42): 15375-15379.
- Joshi, M.B., Rout, P.K., Mandal, A.K., Tyler-Smith, C., Singh, L., Thangaraj, K., 2004. Phylogeography and Origin of Indian Domestic Goats. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3):454-462.
- Kaymakçı, M., Aşkın, Y., 1997. Keçi Yetiştiriciliği, Ankara.
- Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kiraz, S., 2009. Şanlıurfa Yöresindeki Küçükbaş Hayvanların Filogenetik Yapılarının Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi Çalışmaları. Doktora Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, 181s.
- Kul, B.Ç., 2010. Türkiye Yerli Keçi Irklarının Mitokondrial DNA Çeşitliliği ve Filocoğrafyası. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A Software for Comprehensive Analysis of DNA Polymorphism Data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Liu, Y.P., Cao, S.X., Chen, S.Y., Yao, Y.G., Liu, T.Z., 2009. Genetic Diversity of Chinese Domestic Goat Based on the Mitochondrial DNA Sequence Variation. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(1):80-89.

- Naderi, S., Rezaei, H.R., Taberlet, P., Zundel, S., Rafat, S.A., Naghash, Hr., El-Barody, M.A., Ertugrul, O., Pompanon, F., 2007. Econogene Consortium. Large-scale Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Goat Reveals Six Haplogroups with High Diversity. *PLoS ONE*, 2(10): e1012
- Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press, Oxford.
- Parma, P., Feligini, M., Greeppi, G., Enne, G., 2003. The Complete Nucleotide Sequence of Goat (*Capra Hircus*) Mitochondrial Genome. *Goat Mitochondrial Genome. DNA Sequence*, 14(3):199-203.
- Soysal, M.İ., Gürcan E.K., Özkan, E., 2003. Dünya’da ve Türkiye’de Çiftlik Hayvanları Genetik Çeşitliliğinin Korunması Sorunu GAP III. Tarım Kongresi, 2-3 Ekim, 615-623s, Şanlıurfa.
- Sultana, S., Mannen, H., Tsuji, S., 2003. Mitochondrial DNA Diversity of Pakistani Goats. *Animal Genetics*, 34(6):417-421.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.