

YERLİ VE MELEZ BAZI KOYUN IRKLARINDA BİYOKİMYASAL POLİMORFİZM*Zafer Bulut¹@, Mehmet Nizamlıoğlu¹, Vahdettin Altunok¹, İnci Togan², Firuze Kurtoğlu¹, M.Emin Tekin³, Ali Ergin⁴**Biochemical Polymorphism of Several Local Breeds and Cross Breeds**

Geliş Tarihi: 21.11.2008

Kabul Tarihi: 22.12.2008

ÖZET: Çalışmada yerli ve melez koyunların genetik yapılarını belirlemek amacıyla glutamat okzalasetat transaminaz (GOT) ve fosfoglukonat dehidrojenaz (PGD) enzim lokusları nişasta jel elektroforezi ile incelendi. Araştırmada "Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü"nden 250 adet yerli ve melez koyunun alyuvar enzimleri kullanıldı. Her enzim için literatür bilgilerine uygun tampon ve enzim aktivite boyaması için kimyasallar kullanıldı. Gözlenen izoenzim bantları analiz edildi. Got ve Pgd enzim lokusları yönünden, yerli ve melez koyunlarda varyasyon görülmedi. Yerli ve melez koyunların aynı bantlara sahip ve hepsinin homozigot olduğu görüldü. Bu çalışma ile yerli ve melez koyunların çalışılan 2 enzim sistemi yönünden monomorfik olduğu, ayrıca araştırılan lokuslar yönünden melez koyunların yerli koyun ırklarına göre bir farklılık göstermediği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Koyun, Nişasta Jel Elektroforezi, Polimorfizm

SUMMARY: In the study to determine the genetic structure of local breeds and cross breeds of sheep, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and phosphogluconate dehydrogenase (PGD) enzyme loci were examined by starch gel electrophoresis. In the present study, the red cell enzymes of 250 local breeds and cross breeds of sheep from Konya Central Animal Research Institute were used. For each of the enzyme systems appropriate buffers and chemical for the activity staining were used in accordance with the information given in the literature. The observed bands of the isoenzymes were analysed. For the enzyme loci Got and Pgd neither the individuals of local breeds of sheep nor the individuals of cross breeds of sheep exhibited any variation. They displayed identical bands and they were all homozygotes. This study explained that two enzyme systems exhibited monomorphic. It seem that, with respect to the loci studied, cross breeds of sheep do not differ from the local breeds of sheep.

Key words: Sheep, Starch Gel Electrophoresis, Polymorphism

GİRİŞ

Koyun varlığı bakımından çiftlik hayvanları içinde %58.7 (TÜİK 2008)'lik bir orana sahip olan Türkiye, yaklaşık 25.4 milyon baş koyun varlığı (TÜİK 2007) ile dünya ülkeleri arasında önemli bir yerdedir. Mevcut koyun varlığının büyük bir kısmı (%98) yerli koyun ırklarından meydana gelmektedir ve bu yerli koyun ırklarının çeşitli özelliklerini inceleyen ve önemli bilgiler ortaya koyan çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sınırlıdır ve son yıllarda ivme kazanabilmiştir.

Genlerdeki yapı farklılıklarının ve genler arası ilişkilerin gen ürünlerine ve bu ürünlerin biyokimyasal özelliklerine yansımaları içeren çalışma alanına

biyokimyasal genetik adı verilmektedir. Genetiğin bu dalının hayvan yetiştiriciliğindeki önemi giderek artmaktadır. Yağların, süt ve et proteinlerinin kalitesi onları aslında kalıtsal olarak belirleyen kimyasal yapılarına bağlı biyokimyasal genetik, ilerleyen yıllarda hayvansal ürünlerin kaliteleri üzerindeki araştırmalarda önemli rol oynayacaktır (Aritürk 1983, Düzgüneş ve Ekingen 1983).

Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyonu aynı olan enzimlere izoenzimler adı verilmektedir. İzoenzimlerin kimyasal, fiziksel ya da immunolojik karakterleri ile elektroforetik güçleri de farklıdır (Ersoy ve Bayşu 1986, Gözükara 1997). Kontrol mekanizmasında önemli rol oynayan

¹ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

² Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü, ANKARA

³ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyometri Anabilim Dalı, KONYA

⁴ Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, KONYA

@ zbulut@selcuk.edu.tr

*Bu çalışma DPT tarafından desteklenmiştir (Proje No: 98/3).

olaylardan birisi de, aynı kimyasal reaksiyonu katalizleyen fakat enzim protein yapısı farklı olan izoenzimlerin hücrede bulunmasıdır (Gözükara 1997). Elektroferez teknikleri kullanılarak izoenzimler olarak adlandırılan enzimlerin moleküler formları direkt olarak gözlenebilmektedir (Ayala 1982).

Bilim adamları özellikle jel elektroforezi gibi modern biyokimya tekniklerinin geliştirilmesi ile popülasyonların genetik yapılarını ve farklılıklarını ortaya koyabilmektedir (Crozier ve Ferguson 1986) ve yapısal gen lokuslarındaki genetik değişkenliklerin belirlenmesi için bu tekniklerin popülasyon genetiği alanında kullanılması ile popülasyonlarda ortalama heterozigotluk ve gen polimorfizmi hakkında büyük bir bilgi patlaması olmuştur (Ayala 1982).

Biyokimyasal enzim polimorfizmi çalışmaları değişik elektroferez teknikleri kullanılarak son 50-60 yıldır gerçekleştirilmektedir. Yapılan bu çalışmalarda karbonik anhidraz (Agar ve ark 1970, Tucker ve Clarke 1980, Ordas ve Primitivo 1983), süperoksit dismutaz (Manwell ve Baker 1977), laktat dehidrojenaz (Tucker ve Clarke 1980), esteraz (Casati ve ark 1988, Casati ve ark 1990, Mwacharo ve ark 2002), hemoglobin, transferrin, albumin (Morera ve ark 1983) ve kan grupları (Buis ve Tucker 1983, Clarke ve ark 1989) yönünden koyunlarda polimorfizm incelenmiştir.

Türkiye'de yetiştirilen koyunlarda transferrin ve hemoglobin polimorfizmi ile verim özellikleri arasındaki ilişkilerin araştırılmasına ilişkin birçok çalışma (Dellal ve ark 1985, Doğrul 1985, Vanlı ve ark 1990, Yaman ve ark 1986-1987, Yaman ve Üstdal 1983) bulunmaktadır. Ancak bu çalışmada kullanılan enzim lokuslarıyla ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sunulan çalışmada, Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen yerli ve melez koyun ırklarının genetik yapılarını belirlemek ve bu koyun ırklarında biyokimyasal polimorfizmin araştırılması amacıyla glutamat oksalasetat transaminaz (Got) ve fosfoglukonat dehidrojenaz (Pgd) enzim lokusları çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde etçi koyun tipi elde etmek amacıyla yapılan melezleme çalışmalarında, ana hat olarak yerli koyun ırklarımızdan Akkaraman (AKK), İvesi (İVE) ve Konya Merinosu (KMER) ile baba hattı olarak Hampshire Down (HD) ve Alman Siyah Baş (ASB) etçileri kullanılmış ve HASMER, HASİV ve HASAK koyun tipleri elde edilmiştir. Çalışmada materyal olarak bu koyun tiplerinin elde edilmesi aşamalarında kullanılan ana hattı koyunlar (AKK, İVE ve KMER), baba hattı koçlar (HD ve ASB) ile bunların melezlenmesi ile elde edilen F1, G1 ve HASMER, HASİV ve HASAK koyun tiplerinden toplam 250 koyun kullanılmıştır.

Kan örnekleri EDTA'lı tüplere vena jugularis'ten tekniğine uygun olarak alındı. 3000 rpm (devir/dk)'de 10 dakika süre ile santrifüj edilen kanlardan, plazma ve diğer kan hücreleri pastör pipeti ile uzaklaştırıldı. Alyuvarlar, distile su ile üç kez yıkanarak ve her defasında santrifüj edilerek ayrımlandı ve elektroferez işlemine kadar derin dondurucu (-20 °C)'da bekletildi. Bu materyal çözündürüldükten sonra elektroferez için kullanıldı.

Elektroferez işlemi, nişasta jelinde (%8) termostatik sirkülatör (+4 °C'de, Karipek) yardımıyla gerçekleştirildi (Altunok 1998). Çalışılan enzim sistemlerinin elektroferezinde kullanılan tamponlar ve diğer işlemler, Altunok ve ark. (1999; 2007)'nın köpek ve keçilerde yaptığı çalışmalardaki şartlara uygun olarak yapılmış, ancak bazı küçük modifikasyonlara gereksinim duyulmuştur. Her enzim sistemi için uygulanan elektroferez şartları tablo 1'de verilmiştir.

Çalışmada elektroferez sonrası enzimlerin boyanmasında kimyasal boyama (GOT) ve elektron transfer boyama (PGD) olarak adlandırılan 2 metot kullanıldı. (Grunbaum ve Crim 1981, Harris ve Hopkinson 1976). Çalışılan enzimlerin boyama şartları ve boya bileşenleri tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Enzimlerin Elektroforez Şartları

Enzimler	Elektroforez Süresi (Saat)	Tampon	Voltaj (V)
GOT	4 ⁰⁰	Citric Asit (pH 6.6)	150 V
PGD	3 ⁴⁵	Tris-Maleik Asit (pH 7.4)	165 V

Tablo 2. Enzimlerin Boyama Şartları ve Boya Komponentleri

Enzim	Boyama Süresi (dk)	İnkübasyon (°C)	Boyama Tamponu (50ml)	Boya Komponentleri	Bantların Gözlemlenmesi
GOT	110-170	37	Tris-HCl (pH 8.0)	200 mg Aspartik asit 100 mg α-ketoglutaric asit 60 mg Fast blue BB 25 mg Pridoksal-5-fosfat	Uygun bir ışık ortam
PGD	50-80	37	Tris-HCl (pH 8.0)	150 mg MgCl ₂ .6H ₂ O 10 mg 6-fosfoglukonik asit 8 mg NADP 8 mg MTT 8 mg PMS 200 mg Agar Noble	Uygun bir ışık ortam

MTT: Methylthiazolyl tetrazolium; **PMS:** Phenazine Methosulphate

BULGULAR

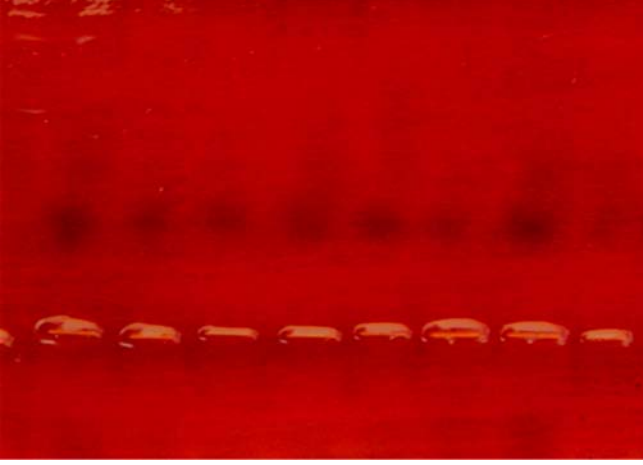
Sunulan çalışmada 2 farklı enzim (Got, Pgd) lokusu populasyonun hepsinde çalışılmıştır. Ayrıca her enzim için Ankara keçisi, Kangal köpeği ve insan örneklerinin de elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Glutamat oksalasetat transaminaz (GOT) enzimi dimerik bir enzimdir ve elektroforetik analizleri sonucunda, yerli ve melez koyunların bütün bireylerinde aynı hizada anodal tek bant olarak

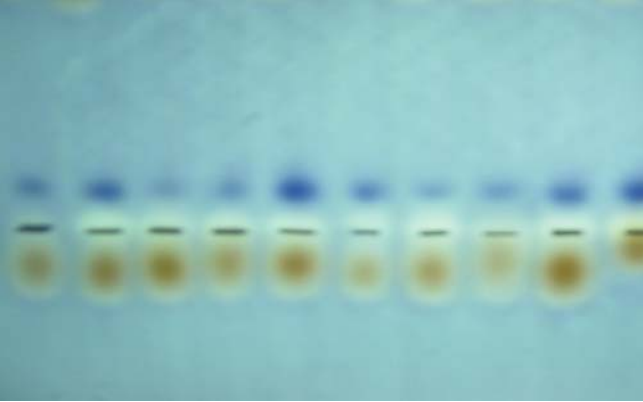
gözlenmiştir (Resim 1). Monomorfik olduğu ortaya konulan bu enzimin, bir lokus ve bir allel tarafından determine edildiği tespit edilmiştir.

Dimerik bir enzim olan fosfoglukonat dehidrojenaz (PGD, GPGD) enziminin elektroforetik incelemeleri sonrası, yerli ve melez koyun ırklarının hepsinde aynı hizada anodal tek bant gözlemlenmiştir (Resim 2). Bir lokus ve bir allel tarafından determine

edildiği tespit edilen bu enzimin, homozigot olduğu ve varyasyon göstermediği ortaya konulmuştur.



Resim 1: GOT enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları



Resim 2: PGD enziminin nişasta jel elektroforez sonrası gözlenen bantları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen yerli ve melez koyun ırklarının genetik yapılarını belirlemek ve bu koyun ırklarında biyokimyasal polimorfizmin araştırılması amaçlanmıştır. Koyun örnekleri ile birlikte aynı jellerde köpek, Ankara keçisi ve insan hemolizatlarının elektroforetik incelemeleri yapılarak

hem bantlarının görünüşleri yönünden hem de elektroforetik göçleri bakımından benzerlik ve farklılıkları birarada gözlemlenmiştir. Dolayısı ile bu çalışma ile, Harris ve Hopkinson (1976)'un insan kanındaki enzimlerin elektroforetik analizlerinde kullandıkları tekniklerin, küçük modifikasyonlarla köpeklerde de uygulanabileceğini önce Seixas ve ark (1988) ve daha sonra Altunok (1998) tarafından belirlenmesine ilave olarak, Altunok ve ark. (2007) Ankara keçilerinde belirlemiş ve şimdi de koyunlarda küçük modifikasyonlarla yararlı bir şekilde kullanılabileceği de belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan yerli ve melez koyun ırklarında Got ve Pgd lokuslarının varyasyon göstermedikleri tespit edilmiştir. Bu bulgu, koyun ırklarında varyasyon verilerinin çok sınırlı olduğu yönündeki çalışmalarla (Buis ve Tucker 1983, Casati ve ark 1990, Clarke ve ark 1989) uyum içerisindedir.

Her iki enzimde aynı hizada ve anodal tek bant olarak gözlemlenmiş ve bütün koyunların bu 2 enzim yönünden homozigot oldukları tespit edilmiştir. Got ve Pgd enzimleri için elde edilen bu bulgular, McDermid ve ark (1975) tarafından koyunlarda bu iki enzimin varyasyon göstermedikleri yönündeki bildirimleri ile benzerlik göstermektedir. Ancak Got ve Pgd enzim lokuslarının yerli ve melez koyunlarda elektroforetik analizinin gerçekleştirilmiş olması önemli bir gelişme olarak değerlendirilebilir.

Uzun süre kapalı sürülerde bulunan bireyler hemen bütün genleri bakımından homozigot hale gelmektedir (Aritürk 1983, Ayala 1982, Düzgüneş ve Ekingen 1983). Çalışılan enzim lokuslarının varyasyon göstermemeleri de akrabalı yetiştiriminin bir sonucu olabilir.

Çalışılan populasyonda ana hattı olarak seçilen yerli koyunların akrabalı yetiştirilen sürüden alınması ve kültür ırkı koçların sayılarının az olması ve hep aynı koçların kullanıldığı hatırlanırsa, bu populasyonda varyasyon görülmemesi nedeninin akrabalı yetiştirme ve kültür ırkı koçların sayısının az olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca diğer ülke araştırmacılarının kendi ülkelerine

özgü koyun ırklarında yaptıkları çalışmalarda da hiç varyasyon görülmediği veya çok az görüldüğü (Agar 1970, Buis ve Tucker 1983, Casati ve ark. 1990, Clarke ve ark. 1989, McDermid ve ark. 1975, Ordas ve Primitivo 1986) yönündeki bildirimleri koyunların pek çok lokusunda monomorfizm görüldüğünü yansıtmaktadır.

Sonuç olarak; yapılan çalışmada enzim elektroforez yöntemi yerli ve melez koyun ırklarında uygulanmış, Got ve Pgd enzim lokusları yönünden yerli ve melez koyun ırklarının genetik yapısı belirlenmiştir. Ayrıca Got ve Pgd lokusları yönünden yerli ve melez koyun ırklarının homozigot genlere sahip oldukları ve polimorfizm göstermedikleri tespit edilmiş ve diğer koyun ırklarından farklı bir allel taşımadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Agar, N.S., Roberts, I. and Evans, J.V. (1970)** Breed differences in sheep erythrocyte carbonic anhydrase activity, *Comp. Biochem. Physiol.*, 35, 639-646.
- Altunok, V. (1998)** "Kangal Köpeklerinin Genetik Yapılarının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması", Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Altunok, V., Nizamlioğlu, M., Ergüven, A. ve Togan, I. (1999)** Red blood cell enzyme biochemical polymorphism in Anatolian shepherd dog. *Rev. Med. Vet.*, 150, 7, 625-628.
- Altunok, V., Nizamlioğlu, M. ve Bulut, Z. (2007)** "Ankara Keçilerinin Genetik Yapılarının Nijasta Jel Elektroforezi Yöntemiyle Araştırılması", *Vet. Bil. Derg.*, 21 (2), 67-72.
- Artürk, M. E. (1983)** Evcil Hayvanların Genetiği, 2. Baskı, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Ayala, F.J. (1982)** Population and Evolutionary Genetics: A Primer The Benjamin/Cummings Publishing Company .Inc. California.
- Buis, R.C. and Tucker, E.M. (1983)** Relationships between rare breeds of sheep in the Netherlands as based on blood-typing, *Animal Blood group and Biochemical Genetics*, 14, 17-26.
- Casati, M.Z., Gandini, G.C., Leone, P. and Rognoni, G. (1988)** Genetic relationship among four sheep breeds of the Italian Alpine ARK. *J. Animal Breed Genet.* 105, 135-142.
- Casati, M.Z., Gandini, G.C. and Leone, P. (1990)** Genetic Variation and Distances of Five Italian native sheep breeds, *Animal Genetics*, 21:87-92.
- Clarke, S.W., Tucker, E.M. and Osterhoff, A.R. (1989)** Blood groups and biochemical polymorphism in the Namaqua sheep breed. *Animal Genetics*, 20, 279-286.
- Crozier, W.W. and Ferguson, A. (1986)** Electrophoretic Examination of the Population Structure of Brown Trout, *Salmo trutta* L., from the Lough Neagh Catchment Northern Ireland, *J. Fish Biol.*, 28;459-477.
- Dellal, G., Yıldız, M.A., Arık, İ.Z., Elmacı, C., Balcıoğlu, S. (1985)** Koyunlarda hemoglobin tipleri ile döl verimi özellikleri arasındaki ilişkiler, *TİGEM*, 10 (55), 18-24.
- Doğrul, F. (1985)** Çeşitli koyun ırklarında transferrin ve hemoglobin tiplerinin dağılımı üzerine araştırma, *Etlık Vet. Mikrob. Enst. Derg.*, 5, 8-9.
- Düzgüneş, O. ve Ekingen, H.R. (1983)** Genetik, 2. Baskı, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları 55, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Ersoy, E. ve Bayşu, N. (1986)** Biyokimya, A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları No:408. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- Gözükar, E.M. (1997)** Biyokimya, Cilt 1-2-3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti., Çapa İstanbul.
- Grunbaum, B.U., Crim, M.D. Ph. (1981)** "Handbook for Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstain". Published by Harward California, USA.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A. (1976)** Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics, Elseiver Publishing Company, Inc., New York.

- Manwell, C. and Baker, M.A. (1977)** Genetic distance between the Australian Merino and the Roll Dorset sheep, *Genetical Research*, Camb, 29, 239-253.
- McDermid, E.M., Agar, N.S. and Chai, C.K. (1975)** Electrophoretic variation of red cell enzyme systems in farm animal, *Anim. Blood Groups Bioch. Genet.*, 6, 127-174.
- Morera, L., Barbancho, M. and Rodero, A. (1983)** Genetic Polymorphism in Spanish Merino Sheep, *Animal Blood Group and Biochemical genetics* 14,77-82.
- Mwacharo, J.M., Otieno, C.J., Okeyo, A.M. and Aman, R.A. (2002)** Charaterization of Indigenous Fat-tailed and Fat-rumped hair sheep in Kenya: Diversity in Blood Proteins, *Tropical Animal Health and Production* ,34,515-524.
- Ordas, J.G. and Primitivo, F.S (1983)** A new allele at the red cell carbonic anhydras locus in sheep, *Animal Blood group and Biochemical Genetics*, 14, 233-234.
- Ordas, J.G. and Primitivo, F.S. (1986)** Genetic variations in blood proteins within and between Spanish dairy sheep breeds. *Animal Genetics*, 17, 255-266.
- Seixas, D., Arnaud, H., Queinnec, G., Queinnec, B. (1988)** Approche du polymorphisme biochimique des enzymes erythrocytaires et plasmatiques du chien domestique, *Revue Met Vet.*, 139(3): 285-291
- Tucker, E.M. and Clarke, S.W. (1980)** Comparative aspects of biochemical polymorphism in the blood of Caprinae species and their hybrids. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics*, 11, 163-183.
- TÜİK (2007)** T.C Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu (www.tuik.gov.tr).
- TÜİK (2008)** T.C Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, Haber Bülteni, Tarımsal İşletme Hayvansal Üretim Araştırması 2006, Sayı:198.
- Vanlı, Y., Özsoy, M.K., Dayıoğlu, H., Doğrul, F. (1990)** Transferrin polimorfizmi ile bazı çevre faktörlerinin merinos, morkaraman, ivesi, karagül ve tuj koyunlarının verim özelliklerine etkileri II. Koçaltı koyun başına kuzu verimi, *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 14(1), 83-95.
- Yaman, K., Başpınar, H., Gökçen, H., Erdinç, H., Yorul, O. (1986-1987)** Merinos kuzularda transferrin tipiyle bazı yün özellikleri arasında ilişki üzerine araştırmalar, *T.C. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fak. Dergisi*, 5-6 (1-2-3), 125-130.
- Yaman, K., Üstdal, K.M. (1983)** Türkiye'deki bazı koyun ırklarında hemoglobin (hb) tipleri üzerine araştırmalar, *D.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 2(1), 79-83.