

## İvesi Koyunlarında Mitokondriyal 16S rRNA Gen Bölgesi Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemiyle İncelenmesi

<sup>1</sup>Selahattin KIRAZ\*, <sup>2</sup>Oğuz AĞYAR

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Şanlıurfa

<sup>2</sup>Adıyaman Üniversitesi, Kahta Meslek Yüksekokulu, Adıyaman

\*Sorumlu yazar: skiraz73@gmail.com

Geliş Tarihi: 28.12.2015

Düzeltilme Geliş Tarihi: 31.03.2016

Kabul Tarihi: 04.04.2016

### Özet

İvesi koyunlarının mitokondriyal 16S ribozomal RNA gen polimorfizmi, PCR-RFLP yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Şanlıurfa'daki İvesi koyunlarından genomik DNA izole edilmiştir. Mitokondriyal 16S ribozomal RNA geninin bir kısmı amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen fragment 1470 bp uzunluğundadır. PCR ürünleri *Sau3AI*, *DdeI*, *DraI*, *Hae III*, *HinfI* kesme enzimleri ile kesilmiştir ve bu enzimlerin kesim paternleri belirlenmiştir. *Sau3AI*, *DdeI* ve *HinfI* kesimleri iki farklı patern göstermiştir (A ve B). PCR-RFLP analizi ile toplam 4 birleşik haplotip sayısı tespit edilmiş olup, popülasyonda haplotip farklılık 0.578 olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** İvesi, mtDNA, 16S rRNA, PCR-RFLP

## Investigation of Polymorphism in Mitochondrial 16s rRNA Gene of Awassi Sheep by PCR-RFLP Method

### Abstract

The polymorphism of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene of Awassi sheeps was studied by using PCR-RFLP method. Genomic DNA was isolated from Awassi sheep in Şanlıurfa. A fragment of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene was amplified. The amplified fragment was found 1470 bp. PCR products were digested with *Sau3AI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII*, *HinfI* restriction enzymes, and its restriction pattern was determined. *Sau3AI*, *DdeI* and *HaeIII* digestions contained two pattern, A and B. RFLP analysis revealed a total of four composite haplotypes. The estimated haplotype diversity within populations was found as 0.578%.

**Key words:** Awassi, mtDNA, 16S rRNA, PCR-RFLP

### Giriş

Türkiye'de 31.140.244 baş koyun varlığı bulunmaktadır (TÜİK, 2014). Türkiye'de üretilen süt miktarının %5.8'i (973 619 ton), et miktarının %10.6'sı (97 344 ton), deri miktarının %55'i koyunlardan (4.541.122 adet) elde edilmektedir (TÜİK, 2012). Türkiye'de İvesi (koyun varlığı içindeki payı: %1.6) önemli bir yerli koyun ırkıdır. İvesi koyunlarının asıl anavatanı ve yayılma alanı Fırat ve Dicle nehirleri arasında kalan Mezopotamya Bölgesidir. Türkiye'de Gaziantep, Şanlıurfa ve Hatay illeri olmak üzere Güneydoğu Anadolu Bölgesine yayılmıştır. Vücut yapısı beyaz yapağı ile örtülüdür. Baş, boyun ve ayaklar kahverengi, kirli sarı yada siyah renklidir (Kaymakçı, 2007).

Ökaryotik hücrelerde nükleusda bulunan DNA'ya ek olarak az miktarda sitoplazmik DNA'ya rastlanmaktadır. Bu sitoplazmik DNA'lar hayvanların mitokondrilerinde bulunmakta olup çift sarmal ve halkasal yapıdadır. Memeli mitokondriyal DNA (mtDNA)'sı 16-19 kb arasında değişmektedir. Koyunlarda (*Ovis aries*) mitokondriyal genom; 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 ribozomal RNA bölgesi (12S rRNA, 16SrRNA), kontrol bölgesi (D-loop) ve 22 çeşit tRNA bölgelerinden oluşmakta olup 16640 bp uzunluğundadır (Hiendleder ve ark., 1998). mtDNA mutasyon oranı, nükleer DNA'dan 10 kez daha

hızlıdır (Brown ve ark., 1979). mtDNA maternal kalıtım yolu izler, haploiddir, rekombinasyon yoktur (Avisé, 1994). Mitokondriyal DNA, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik ile filogenetik ilişkilerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Nei, 1987; Zhang ve Shi, 1992).

Mitokondriyal DNA (mtDNA) filogenetik ilişkilerin araştırılmasının yanında özellikle 16S rRNA gen bölgesi PCR-RFLP analizi et ve et ürünlerinde tür veya orjinin belirlenmesi çalışmalarında yaygın

olarak kullanılmaktadır (Mitani ve ark., 2009; Sarri ve ark., 2014; Saika ve ark., 2015).

Türkiye, Dünya’da endemik veya lokal bitki ve hayvan türleri bakımından biyoçeşitlilik zengini ülkeler arasında gösterilmektedir. Bununla beraber özellikle yerli hayvan gen kaynaklarımızın genetik çeşitliliği moleküler tekniklerle belirlenmelidir. Çalışmada, Şanlıurfa yöresi ivesi ırkı koyunlarda mitokondriyal 16S rRNA gen bölgesinin polimorfizm PCR-RFLP yöntemi kullanılarak polimorfizm belirlenmeye çalışılmıştır.

**Çizelge 1.** Kesme enzimleri ve tanıma bölgeleri

Kesme enzimleri	Tanıma bölgeleri	16S rRNA geninde tanıma bölgelerinin pozisyonları
<i>Sau3AI</i>	5'...GATC...3' 3'...CTAG...5'	315, 493, 1240, 1253, 1340, 1407
<i>HaeIII</i>	5'...GGCC...3' 3'...CCGG...5'	513, 912, 980, 1489, 1569
<i>HinfI</i>	5'...GANTC...3' 3'...CTNAG...5'	795, 1301
<i>DraI</i>	5'...TTTAAA...3' 3'...AAAATTT...5'	314, 390, 429, 1197
<i>DdeI</i>	5'...CTNAG...3' 3'...GANTC...5'	236, 1087, 1410

## Materyal ve Yöntem

### Örnek toplama ve DNA ekstraksiyonu

Araştırmanın hayvan materyalini, Şanlıurfa ve yöresinde yetiştirilen İvesi koyunları oluşturmuştur. Seçilen hayvanların birbirlerine akraba olmamasına dikkat edilmiştir. DNA izolasyonu için 32 koyundan kıl örnekleri toplanmıştır. Kıl örnekleri, doğrudan temas ve kontaminasyonu önlemek için eldivenlerle hayvanların üst sırt kısmından çekilerek toplanmıştır. Her bir hayvan için toplanan kıl örnekleri özel kilitli poşetlere konularak, etiketlenilip laboratuvara ulaştırılincaya kadar muhafaza edilmiştir. Çalışma sahasında ırk tespitinde, Kaymakçı (2007) tarafından belirtilen dış görünüş özellikleri dikkate alınmıştır.

DNA izolasyonu öncesi kıl örnekleri etanol ile temizlenmiştir. Daha sonra fiziksel olarak parçalama için örnekler eppendorf tüpü içerisinde sıvı azot ile dondurularak homojenizatörden geçirilmiştir. Daha sonra örneklerden standart fenol/kloroform yöntemiyle (Sambrook ve ark., 1989) DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA %1’lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidiyum bromür ile boyanarak UV ışığı altında DNA’nın varlığı tespit edilmiştir.

### PCR-RFLP analizi

Mitokondriyal 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmak için gerekli ileri; 5'- CCA AAA TCT CCC ACT CTC CAG -3' ve geri; 5'- CTC TTG TCC TTT CGT ACT GGG -3' primerlerin dizaynı, koyun için referans

sekans (RefSeq: NC\_001941) kullanılarak yapılmıştır. 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 dH<sub>2</sub>O ile toplam karışım 50 µl’ye tamamlanmıştır. PCR reaksiyon şartları; ön denatürasyon için 95 °C’de 4 dakika ve tek döngü, denatürasyon için 94 °C’de 60 sn, yapışma için 59 °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.

PCR ürünleri *Sau3AI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII* ve *HinfI* kesme enzimleri (Çizelge 1) ile kesilmiştir. Kesme reaksiyonu; 1.0 µl enzim, 2.0 µl buffer, 1.0 µl BSA, 3.0 µl PCR ürünü ve 7.0 dH<sub>2</sub>O ile toplam karışım 14 µl’ye tamamlanmıştır. Örnekler 37 °C’de bir gece bekletildikten sonra %2’lik agaroz jelde yürütülmüştür.

### Verilerin değerlendirilmesi

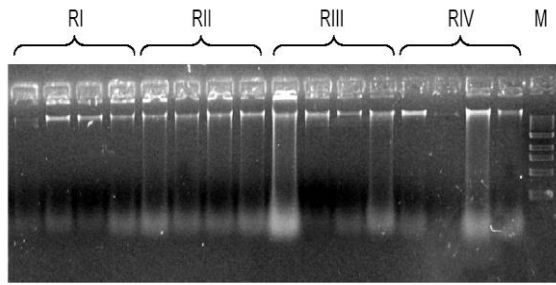
Mitokondriyal 16S rRNA gen bölgesi PCR-RFLP analizleri sonucunda jel görüntüleri değerlendirilerek veri seti oluşturulmuştur. Daha sonra kesim paternleri göz önünde bulundurularak klasik genotiplendirme ile kombine haplotipler belirlenmeye çalışılmıştır. Haplotip frekansları ve haplotip farklılık (*h*: haplotype diversity, Nei, 1987) değerleri belirlenmiştir. Populasyonlar arası Nei’nin (1972) genetik uzaklık değerleri ve UPGMA

dendogramı POPGENE 3.2 (Yeh ve ark., 1987) paket programı kullanılarak belirlenmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

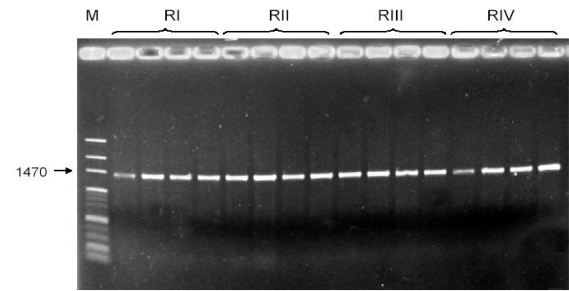
Şanlıurfa yöresindeki İvesi koyunlarından toplanan kıl örneklerinden DNA izole edilmiştir (Şekil 1). DNA örneklerinden PCR ile mitokondriyal 16S ribozomal RNA gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Burada 1574 bp uzunluğundaki gen bölgesinin 1470 bp'lik kısmı çoğaltılmıştır.

PCR ile mitokondriyal 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonundan sonra PCR ürünleri



Şekil 1. Koyun DNA'ları, M:marker (1 kb ladder)

*Sau3AI*, *DdeI*, *DraI*, *HaeIII* ve *HinfI* kesme enzimleri ile kesilmiştir ve ilgili enzimlerin kesim paternleri Şekil 3'te verilmiştir. İlgili enzim bakımından kesim paternlerine göre jel görüntüleri değerlendirilmiştir (A ve B olarak) ve RFLP profiline göre kesim paternleri Çizelge 2'de verilmiştir. Burada sırasıyla, *Sau3AI* enzimi A paterni için 747, 302 ve 178, B paterni için 747, 480, 302 ve 178, *DdeI* enzimi A paterni için 851, 323 ve 224, B paterni için 1470, *DraI* enzimi A paterni için 768, 356 ve 283, *HaeIII* enzimi A paterni için 502, 501 ve 399, *HinfI* enzimi A paterni için 783, 506 ve 181, B paterni için 783, 253, 181 bp uzunluklarında fragmentler gözlenmiştir.



Şekil 2. Mitokodriyal 16S rRNA gen bölgesi, M:marker (100 bp ladder)

Çizelge 2. Kesme enzimleri ile elde edilmiş paternler, fragment büyüklükleri: bp

<i>Sau3AI</i>		<i>DdeI</i>		<i>DraI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	
A	B	A	B	A	A	A	B
747	747	851	1470	768	502	783	783
302	480	323		356	501	506	253
178	302	224		283	399	181	181
	178						

Çizelge 3. Haplotip kodlar, birleşik haplotipler, bölgelere göre haplotip sayıları ve frekansları, haplotip çeşitliliği

Haplotip kodu	Birleşik haplotipler	Haplotip frekansı %
H1	AAAAA n = 18	56.25
H2	BAAAA n = 2	6.25
H3	AAAAB n = 2	6.25
H4	ABAAA n = 10	31.25
Haplotip çeşitliliği (H)		0.578

Çizelge 4. Haplotipler arası genetik uzaklıklar

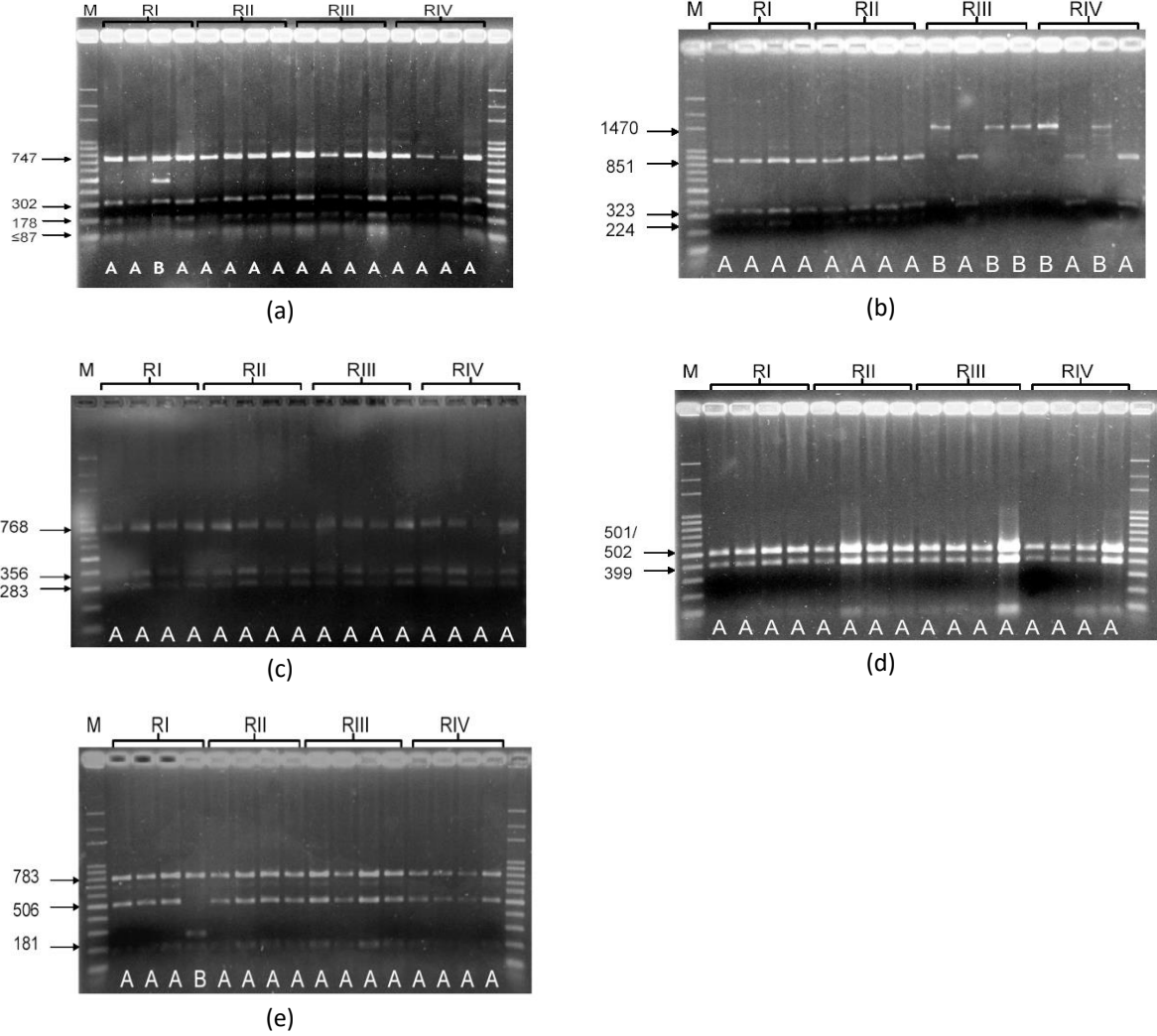
Haplotip	H1	H2	H3
H2	0.0007		
H3	0.0007	0.0014	
H4	0.0020	0.0027	0.0027

PCR-RFLP analizi sonucunda 32 hayvanda 4 birleşik haplotip belirlenmiştir. Haplotip sayıları, haplotip frekansları, gen farklılıkları (gene diversity)

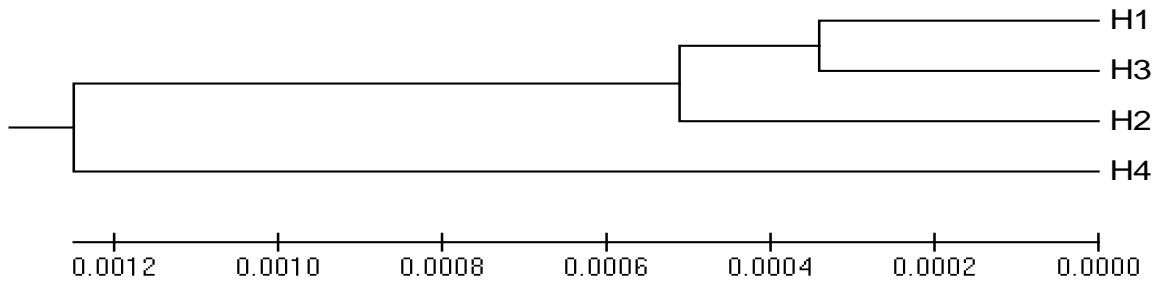
ve haplotip farklılıkları (haplotype diversity) Çizelge 3'te verilmiştir. Çizelge 3'te görüldüğü gibi haplotip çeşitliliği bakımından; AAAAA (%56.25)

haplotipinden 18, BAAAA (%6.25) ve AAAAB (%6.25) haplotipinden 2, ABAAA (%31.25) haplotipinden 10 adet gözlenmiştir. Çizelge 3'te de görüleceği gibi haplotip çeşitliliği 0.578 olarak tespit edilmiştir. İvesi haplotipleri arasında genetik uzaklıklar Çizelge 4'te

verilmiştir. Haplotipler arasında genetik uzaklıklar 0.0007-0.0027 arasında tespit edilmiştir. Ayrıca, genetik uzaklıklara göre oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 3. Mitokondriyal 16S rRNA gen bölgesi (a) *Sau3AI* (b) *DdeI* (c) *DraI* (d) *HaeIII* (e) *HinfI* PCR-RFLP profilleri, M:marker (100 bp ladder)



Şekil 4. İvesi 16S rRNA haplotiplerine ait filogenetik ağaç

### Sonuç ve Öneriler

PCR-RFLP yöntemi ile gruplar arasındaki gen ve haplotip farklılık ve genetik uzaklığı saptamak için 5 kesme enzimi kullanılmış ve toplam 4 haplotip gözlenmiştir. Haplotipler arası genetik uzaklık değerleri incelendiğinde İvesilerin genetik olarak birbirlerine yakın oldukları söylenebilir. Bununla birlikte oluşturulan filogenetik ağaç bu durumu desteklemektedir.

Moleküler belirteçler (mtDNA sekanslama veya RFLP varyasyon), populasyonlarda özellikle genetik farklılaşmanın tespit edilmesinde kullanışlı metotlardır (Avice, 2000). Ayrıca, mitokondriyal genom populasyonlarda filogenetik ilişkileri anlamak için büyük veri içerir (Gray ve ark., 1999). Bu nedenle polimorfik bölgelerden alınan veriler ile tespit edilen haplotip bilgileri genetik ilişkileri incelemek için kaynak sağlar. Bu çalışmada *Sau3AI*, *DdeI* ve *HinfI* enzimleri ile farklı kesim paternlerinin (A, B) görülmesi, 16S rRNA geninin filogenetik çalışmalar için kullanılabileceğinin göstergesi olabilir.

Sonuç olarak, mitokondriyal 16S rRNA gen bölgesi PCR-RFLP analizi ile Şanlıurfa yöresi ivesi koyunlarında polimorfizm belirlenmeye çalışılmıştır. Bununla beraber, İvesi koyunlarında ilgili gen bölgesi bakımından DNA dizi analizleri yapılarak daha spesifik moleküler filogenetik analizler yapılabilir.

### Kaynaklar

- Avice, J.C., 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*, Harvard University Press, Cambridge, USA.
- Brown, W.M., George, M. Jr. and Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4): 1967-1971.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. 1999. Mitochondrial evolution, *Science*, 283: 1476-1481.

- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., and Ke, A., 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular Evolution*, 47(4): 441-448.
- Kaymakçı, M. 2007. *Koyun yetiştiriciliği El Kitabı*. TİGEM. Ankara.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Mitani, T., Akane, A., Tokiyasu, T., Yoshimura, S., Okii, Y., and Yoshida, M. 2009. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. *Legal Medicine*, 11: 49-5450.
- Saikia, D.P. Kalita, D.J., Borah, P., Sarma, S., Nagendra, N.B. and Dutta, R. 2015. Differentiation of sheep and goat species by PCR-RFLP of mitochondrial 16S rRNA gene. *Journal of Animal Research*, 5: 213-217.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarri, C., Stamatis, C., Sarafidou, T., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., Liakou, C., Tastsoglou, S. and Mamuris, Z. 2014. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, 43: 35-41.
- TUİK, 2012. *Hayvansal üretim istatistikleri*, www.tuik.gov.tr
- TUİK, 2014. *Hayvansal üretim istatistikleri*, www.tuik.gov.tr
- Yeh, F., Yang, R.C. and Boyle, T. 1987. POPGENE (v. 1.32): Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis.
- Zhang Y.P. and Shi L.M. 1992. Mitochondrial DNA polymorphisms in animals: a review. *Zoological Research*, 13 (3): 289-298.