



doi 10.33188/vetheder.1375103

Derleme / Review

Nükleik asit temelli moleküler yöntemler: Köpeklerde genetik markerlar**Hasan Zafer ŞAFAK^{1,a}, Murat SAĞLAM^{2,b}, Banu YÜCEER ÖZKUL^{3,c*}**^{1,2}Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye³Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı, Ankara, TürkiyeID 0009-0004-8803-8261^a; 0000-0002-5630-7736^b; 0000-0002-7036-6230^cMAKALE BİLGİSİ /
ARTICLE INFORMATION:

ÖZET

Geliş / Received:

13 Ekim 23

13 October 23

Revizyon/Revised:

29 Aralık 23

29 Aralık 23

Kabul / Accepted:

2 Ocak 24

2 January 24

Dünyada ve Türkiye’de çok sayıda köpek genotipi bulunmaktadır. Bu köpek genotipleri çeşitli amaçlar (av, çoban, bekçi, arama-kurtarma köpeği vb) doğrultusunda yetiştirilmektedir. Geçmişte avcılıkla başlayan köpek ve insan birlikteliği günümüzde birçok alanda devam etmektedir ve ilk evciltelen tür olması muhtemeldir. Köpeklerin kökeni, evrimi ve birbirleri ile olan genetik uzaklıkların belirlenmesinde, köpeklerin bir veya birkaç yerde mi evcilleştirildiğini, evcilleştirildiği zamanı ve yerini tespit etmek, evcil köpekler arasındaki genetik varyasyonu belirlemek için çeşitli yöntemlerden (mitokondrial DNA (mtDNA), mikrosatelit, tek nükleotid polimorfizmi (SNP), kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) gibi) yararlanılmaktadır. Bu analizlerin çoğu populasyon genetiği esasına dayanmaktadır. Diğer evcil türlerde olduğu gibi, köpeklerin de farklı yer ve zamanlarda evcilleştirilmeleri farklı köpek ırklarının oluşmasına neden olmuştur. Köpek yetiştiriciliğinde değişik birleştirme metodları ve seleksiyon uygulanarak farklı amaçlara uygun köpek ırkları meydana getirilmiştir. Birçok hayvan türünde olduğu gibi köpekler üzerinde de farklı genetik çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla genetik markerlardan (kalça displazisi gibi kalıtsal hastalıkların tespiti, yavru cinsiyetinin belirlenmesi, ikizlik ve freemartinismus olgularının tespiti, genom haritalarının çıkarılması vb) faydalanılmaktadır. Bu derlemede, köpeklerde marker genlerin kullanımı hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar Sözcükler:

Gen

Köpek

Marker

nükleik asit

Keywords:

Dog

gene

marker

nucleic acid

Nucleic acid-based molecular methods: Genetic markers in dogs

ABSTRACT

There are many dog genotypes in the world and in Turkey. These dog genotypes are bred for various purposes (hunting, herding, guarding, search and rescue dog, etc.). The association of dogs and humans, which started with hunting in the past, continues in many areas today and is likely to be the first domesticated species. Various methods such as mitochondrial DNA (mtDNA), microsatellite, single nucleotide polymorphism (SNP), truncated fragment length polymorphism (RFLP) are used to determine the origin, evolution and genetic distance between dogs, to determine whether dogs were domesticated in one or several places, to determine the time and place of domestication, and to determine genetic variation among domestic dogs. Most of these analyses are based on population genetics. As with other domestic species, the domestication of dogs in different places and times has led to the formation of different dog breeds. Different breeding methods and selection have been applied in dog breeding to create dog breeds suitable for different purposes. As in many animal species, different genetic studies are carried out on dogs. For this purpose, genetic markers (detection of hereditary diseases such as hip dysplasia, determination of puppy sex, detection of twinning and freemartinismus cases, genome mapping etc.) are used. In this review, information about the use of marker genes in dogs is given.

©2024 The Authors.
Published by Veteriner Hekimler Derneği. This is an open access article under CC-BY-NC license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>)



How to cite this article: Şafak HZ, Sağlam M, Özkul Yüceer B. Nükleik asit temelli moleküler yöntemler: Köpeklerde genetik markerlar. Vet Hekim Der Derg 95 (1): 83-96, 2024. DOI: 10.33188/vetheder.1375103

* Sorumlu Yazar e-posta adresi / Corresponding Author e-mail address: yuceerbanu@hotmail.com

1. Giriş

Türkiye hayvan gen kaynakları bakımından zengin bir ülkedir. Farklı coğrafik yapıya ve geniş bir yüz ölçümüne sahip olan Türkiye’de farklı köpek genotipleri bulunmaktadır. Bu köpek genotipleri yüzyıllardır Anadolu topraklarında saf olarak yetiştirilmiş, bulunduğu bölge şartlarına adapte olmuş ve üstün yeteneklere sahip genotiplerdir. Bu genotiplerin çoğu çoban veya av köpeği olarak kullanılmaktadırlar (1).

Arkeolojik kalıntılar köpeğin MÖ 12000 yıllarında Mezopotamya’da evcilleştirildiğini göstermektedir ve ilk evciltiren tür olması muhtemeldir (2). Evcilleştirildikten sonra günümüze kadar çok sayıda köpek ırkı elde edilmiş olup köpeklerin kullanım amaçlarında değişiklikler olmuştur. Bugün FCI (Uluslararası Kinoloji Federasyonu)’a kayıtlı 356 köpek ırkı mevcuttur (3).

Köpeklerin evrimi, insanların etkisi altında yapay seleksiyon yöntemiyle gerçekleştirilen bir süreci kapsamaktadır. Köpeklerin evrimi hem fiziksel hem de sosyokültürel olarak gerçekleşmiştir. Normal şartlar altında canlıların evrim süreci, doğal çevrenin etkisi altında gerçekleşir. Ancak köpeklerin evrimi sırasında insanların ciddi katkıları olmuştur. Köpeklerde evrim süreci, insanların ve toplumun beklentilerine göre şekillenmiş ve bu durum köpeklerin normalde sahip olamayacakları özelliklere sahip olmalarına yol açmıştır (4).

Köpeklerde, teknolojik gelişmelere uygun bir şekilde farklı alanlarda kullanılmıştır. Önceleri köpeklerden bekçi, avcı ve çoban köpeği olarak yararlanılmıştır. Bu nedenle de ilk ortaya çıkan ve kullanılan ırklar bekçi, çoban ve av köpekleridir. Sonra köpeklerin koruma içgüdülerinden faydalanılarak koruma ve dövüş köpekleri ortaya çıkmıştır. Özellikle büyük ırklar melezlenmiş ve müsabaka yeteneği iyi olan köpekler elde edilmiştir. Bu dönemde özellikle Mastif ırkı köpeklerin sayıları artmıştır. Bu köpekleri, 1. Dünya savaşında kullanılmaya başlanarak halen yetiştirilmekte olan polis ve asker teşkilatındaki köpekler takip etmiştir. 1. Dünya savaşında, köpekler yaralıları kurtarmak için arama kurtarma amaçlı olarak eğitilmişlerdir. Günümüzde ise, enkaz altındaki insanları arama, mayın, bomba ve uyuşturucu madde arama, hastalık teşhisi gibi birçok alanda eğitilmekte ve kullanılmaktadırlar. Geçmişte avcılıkla başlayan köpek ve insan birlikteliği günümüzde birçok alanda devam etmektedir (2).

Farklı amaçlarla yetiştirilen ve kullanılan köpeklerde yavru seçimi çok önemlidir. Yavru seçimi fenotipik özelliklere bakılarak davranış testleri ile yapılmaktadır. Bu testlerin sonuçları eğiticilerin deneyim veya önceliklerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Oysa belirteç gen olarak bilinen genetik markerlar kullanılarak yapılan Marker Destekli Seleksiyon (MAS) çalışmalarında objektif sonuçlar elde edilmektedir. Ayrıca, istenilen verim özelliklerinin geliştirilebilmesi için generasyon aralığı kısaltmakta ve daha kısa sürede ilerleme sağlanmakta, verimlerin tespitinde cinsiyete bağlı olarak yaşanan sıkıntılar bertaraf edilmektedir. Böylelikle yavru seçimlerinde hata ihtimalide azalmıştır (5).

2. Marker genler

Genetik marker canlıda, belli bir genetik özelliğin veya hastalığın varlığına işaret eden gen; belirleyici gen, genetik belirleyici anlamına gelmektedir. Günümüzde genetik markerlar moleküler genetiğin gelişmesiyle birlikte birçok hayvan türünde; babalık tayini, kalıtsal hastalıklar, akrabalık, yavru cinsiyetinin belirlenmesi, ikizlik ve freemartinismus olgusu, genetik uzaklığın tahmini, genom haritalarının çıkarılması, kantitatif karakterler ile ilgili lokusların belirlenmesi ve marker destekli seleksiyon gibi birçok alanda kullanılmaktadır (6).

Biyoteknolojideki gelişmeler günümüzde hızla ilerlemektedir. Özellikle PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniğinin bulunmasından sonra genetik çalışmalar iyice hız kazanmıştır. Köpek genom haritası çıkarılmış ve uluslararası biyoteknoloji merkezinin web sitesinde (7) Temmuz 2004 tarihinde yayınlanmıştır. Birbirini takip eden araştırmalar ortaya koymuştur ki köpekler, davranışların ve hastalıkların genetik altyapısını açıklamak için ideal hayvanlardan biridir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda, farklı davranış özelliği sergileyen köpeklerde genetik açıdan da farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (8; 9; 10).

3. Genetik Markerlar

Genetik marker (işaretleyici-belirteç), kromozom üzerinde bilinen konuma sahip bir DNA dizisidir. Genetik markerler, farklı amaçlarla kullanılabilirler. Örneğin, kalıtsal bir hastalığı sorumlu gen ile ilişkilendirmeye yardımcı olabilir veya henüz tanımlanmamış ancak yaklaşık konumu bilinen yakındaki bir genin kalıtımını izlemek için kullanılabilir. Genetik markerin kendisi bir genin parçası olabilir veya bilinen bir işlevi olmayabilir (11).

DNA, 1970'lerin başlarına kadar bilim insanları tarafından incelenmesi zor bir moleküldü. DNA dizilerinin incelenmesi protein ve RNA dizilerini incelemek veya genetik analizler yapmak suretiyle yani indirekt yollar ile mümkün olmaktadır. Günümüzde ise durum tamamen değişmiştir. Artık DNA'nın belli bir bölgesini kesip çıkarmak, bu bölgenin kopyalarını ve nükleotid dizilerini hatta genom dizilerini kısa bir sürede elde edebilmek mümkün hale gelmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir (11). Bu yöntem ilk kez 1985'te bilim dünyasına sunulduğundan beri, hem araştırmalarda hem de klinik laboratuvarlarda tanıya yeni bir bakış açısı getirmiştir. Aslında PCR işlemi (DNA polimerizasyonu-DNA'nın kopyalanarak çoğaltılması) canlı hücrelerde devamlı olmaktadır. PCR, DNA polimerizasyon işleminin belli özel amaçlar için minik deney tüplerinde (PCR tüpleri) veya cam borucuklarda yapılan bir kopyasıdır. Canlı hücreler içindeki polimerizasyon işlemi, PCR tüpleri içinde, gerekli tüm kimyasal maddeler konularak ve ısı parametreleri uygulanarak taklit edilmektedir (12).

Polimeraz zincir reaksiyonunun temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primerle sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesi bir başka ifade ile çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanmaktadır. Bir PCR döngüsü denatürasyon (denaturation), primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır (13).

PCR tekniğinin günümüzde birçok alanda kullanıldığı görülmektedir. Başlıca kullanım alanları; çeşitli araştırmalar, klonlama, dizi analizi ve genom haritalarının çıkarılması, beşeri hekimlikte birçok hastalığın tanısında (örak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi, vb), veteriner hekimlikte bakteriyel (*Salmonella* (Tifo ve Paratifo), *Mycoplasma*, vb) ve viral hastalıkların (Lökosis Tavuk İnfeksiyöz Anemisi, İnfeksiyöz Laringotrakeitis, Marek ve Newcastle hastalığı ve Avian İnfluenza vb) tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), adli tıp örneklerinin genetik olarak tiplendirilmesi ve doku transplantasyonu için doku tiplerinin belirlenmesi gibi birçok alanda da kullanılabilir (12; 13).

Günümüzde kullanılan genetik markerlar; RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), STR (Mikrosatellit), SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve DNA dizi analiz yöntemi olarak adlandırılmaktadır (14).

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) tekniği ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR yöntemini temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (15). Aynı dönemde başka bir araştırma grubu tarafından AP-PCR (Arbitrarily Primed-PCR) olarak isimlendirilmiştir (16). Daha sonra bu metodla aynı temele dayanan ancak 10 nükleotidden daha kısa primerlerle çalışılarak DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen benzer bir metod bildirilmiştir (17).

RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir. Tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir ve bu oligonükleotid özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapabilmektedir (18).

Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD), PCR tabanlı bir prosedürdür ve koyun, sığır, keçi, manda, deve ve at populasyonları arasındaki genetik ilişkilerin değerlendirilmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. RAPD tekniği, kullanımının basitliği, polimorfizm için hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi gibi özelliklere sahip olması nedeniyle daha fazla kullanım alanı bulmaktadır (19).

Bununla beraber metodun bazı dezavantajları da bulunmaktadır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşın, belirteçleri dominanttır ve bu nedenle heterozigotları teşhis etmek zordur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için yöntemin optimize edilmesi oldukça önem taşımaktadır (18).

RAPD yönteminin hayvancılıkta kullanım alanları;

1. Genetik çeşitlilik çalışmaları (20; 21; 22; 23),
2. Akrabalık düzeyinin belirlenmesi (24),
3. Genom haritalarının çıkarılması (25; 26),
4. Genetik markerların tespiti (27),
5. Hayvansal ürünlerin orjinlerinin belirlenmesi (28).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi)

DNA'yı belirli nükleotid sıralarından kesen bakteriyel kökenli restriksiyon enzimlerinin (restriksiyon endonükleaz enzimi) keşfedilmesi ile moleküler biyoloji alanında önemli gelişmeler yaşanmıştır. RFLP tekniği DNA düzeyinde polimorfizm elde etmek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (29). Bakteriler, bakteriyofajlara (bakterileri enfekte ederek çoğalan viruslar) karşı savunma mekanizması olarak çeşitli restriksiyon enzimleri oluşturmaktadırlar. Bu enzimler DNA molekülünü özgün tanıma sıralarından kesebilen enzimlerdir. Bir bakteri bakteriyofajlar tarafından enfekte edildiği zaman, konakçı bakterilerin endonükleaz enzimleri fajların DNA'sını çeşitli noktalardan keserek o fajın konakçı bakteride çoğalmasını önlemiş olmaktadır (30). RFLP tekniği Southern blot ve PCR tabanlı olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır.

Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı bu yöntemde, Restriksiyon endonükleazlar, restriksiyon bölgeleri olarak bilinen DNA'nın sadece spesifik baz dizilerini tanımakta ve diziyi bu bölgelerden kesmektedir.

Evrin ve populasyon genetiği çalışmalarında restriksiyon enzimlerinden yararlanılarak çok önemli farklılıklar tespit edilmiştir. RFLP analizleri hem çekirdek ve hem de mitokondriyal genomda oldukça faydalı bilgiler ortaya koymaktadır (14).

RFLP yönteminin hayvancılıkta kullanım alanları;

1. Genetik polimorfizmlerin saptanması (28; 31, 32; 33; 34),
2. Rekombinant DNA teknolojisi (35),
3. Genom haritalarının çıkarılması (26).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Vos ve ark., (36), PCR kaynaklı markerların süre avantajını ve RFLP yönteminin güvenilirliğini birleştiren yeni bir yöntem geliştirmiş ve bu tekniğe AFLP adını vermişlerdir. Seçici primerlerin kombinasyonları kullanılarak birçok polimorfik bant tespit edilebildiğinden, AFLP, genom bilgilerinin daha kolay elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir (37).

AFLP tekniği ile polimorfizm elde etme olasılığı oldukça yüksektir ve genom hakkında herhangi bir ön bilgi olmadan bu teknik uygulanabilmektedir. Elde edilen her bir marker oldukça güvenilir ve bilgi sağlayıcıdır (38). Ancak, AFLP tekniğinin dominant markerler vermesi önemli bir eksikliğidir. Ayrıca AFLP tekniğinde 50-100 gibi çok sayıda çoğaltılmış parçacık elde edildiği için bunların analizlerinin otomatik olarak bilgisayar kontrolünde yapılması gerekmektedir. Genetik haritalamada AFLP markerleri genellikle kromozomların sentromer ve telomer (uç bölgeleri) bölgelerinde toplanmaktadır. Bu durum kromozomların diğer bölgelerinin analizlerini güçleştirmektedir (39).

AFLP yönteminin hayvancılıkta kullanım alanları;

1. Genetik polimorfizmlerin tanımlanması (40; 41; 42),
2. Parmak izi teknolojisi (43; 44; 45),
3. Mikrosatellitlerin tespit edilmesi (46; 47),
4. Genetik haritalama ve QTL çalışmaları (48; 49).

STR (Short Tandem Repeat - Mikrosatellit Analizi)

Ko-dominant belirteçlerden olan mikrosatellit DNA lokusları; 2-6 nükleotid uzunlukta, kısa ve tekrarlanan DNA dizilerini ifade etmektedir. Mikrosatellitler; basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeats, SSR) veya kısa ard arda tekrarlar (Short Tandem Repeats, STR) olarak adlandırılırlar.

Mikrosatellit lokuslardaki farklı alleller PCR ile çoğaltılan DNA parçasındaki farklı nükleotid dizilerinin belirlenmesiyle ortaya konmaktadır (50). STR'ler, detaylı bir şekilde incelenerek doğrulanmış primer bazlı multipleksler kullanılarak amplifiye edilir ve boyutlarına göre ayrılırlar (51).

Her bir allelde tekrar eden birimlerin sayıları birbirlerinden farklılık göstermektedir. Mikrosatellitler, lokus başına 10-3 ile 10-4 gibi yüksek mutasyon oranlarına sahiptirler ve buna bağlı olarak bir lokusta allel sayısı oldukça fazla olabilmektedir. Ayrıca mikrosatellitlerin kodominant markerler vermesi ve PCR ile kolaylıkla çalışılabilmesi kullanım alanlarını artırmaktadır (38, 52).

STR yönteminin hayvancılıkta kullanım alanları;

1. Irk içi ve ırklar arası genetik çeşitliliğin saptanması (53; 54; 55; 56; 57),
2. Babalık testi (58; 59; 60),
3. Tehlike altındaki popülasyonların durumlarının belirlenmesi (61),
4. Genom haritaları (62; 63).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism - Tek Nükleotid Polimorfizmi)

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) genomun herhangi bir bölgesindeki tek nükleotiddeki dizilim farklılıklarıdır. Genomda oldukça yaygın bulunan bu markerlara intron ve ekzon bölgelerinde, 500–1000 baz çifti sıklıkta rastlanabilmektedir (64; 65). Tek bir nükleotid varyasyonunun polimorfizm olarak tanımlanabilmesi için, popülasyonun en az %1'inin DNA'sında meydana gelmesi gerekmektedir. SNP'ler, hücrenin protein ve enzimatik mekanizmasını değiştiren genlerde varyasyonlara neden olmaktadır (65).

Genetik varyasyonun %90'ını oluşturan SNP'ler otomasyona yüksek düzeyde uyum sağlamaları ve diğer markerlara göre daha duyarlı analizlerin yapılmasına olanak tanımları nedeniyle hayvancılıkta son yıllarda oldukça geniş bir kullanım alanı bulmuşlardır. Gen kodlayan bölgelerde görülen SNP varyantları, bir proteinin amino asit sekansını değiştirmekte ve protein fonksiyonunu doğrudan etkilemektedir (66).

Gen kodlayan bölgelerdeki SNP sayısının yaklaşık 10000-50000 dolaylarında olduğu tahmin edilmektedir (67). Günümüzde aynı anda çok fazla sayıda SNP'in analizine olanak tanıyan otomasyon sistemleri geliştirilmiştir. Meydana gelen bu gelişmeler doğrultusunda yüksek çözünürlüğe sahip SNP çipleri ile genom boyu ilişki analizleri gerçekleştirilebilmektedir. Elde edilen bilgiler ışığında genomik seleksiyon olanaklı bir hale gelmiştir (68).

Genetik çalışmalarda SNP markerleri kullanımının yaygınlaşmasının 4 önemli nedeni bulunmaktadır (69).

Üzerinde durulan hemen her lokusta diğer moleküler yöntemlere göre çok daha fazla marker elde edilmektedir.

SNP herhangi bir gen ürünü karşılığı bulunan bölgelerde bulunmakta ve bu nedenle doğrudan fenotipi etkilemektedir (Siyah Alaca sığırlarında BLAD hastalığında olduğu gibi).

SNP'ler mikrosatellitlere oranla daha kararlı bir şekilde döllere aktarılmaktadır. Bu durum uzun vadede seleksiyon markeri olarak SNP'lerin kullanımını daha uygun hale getirmektedir.

DNA mikroarray teknolojisi kullanılarak daha fazla lokusun irdelendiği genetik çalışmalarda SNP markerleri mikrosatellitlere oranla daha kullanışlı markerlardır.

SNP yönteminin hayvancılıkta kullanım alanları;

1. Genetik çeşitlilik,
2. Babalık testleri,
3. Genomik seleksiyon ve
4. Genom haritalama çalışmalarıdır (70).

DNA Dizi Analizi Yöntemi

Bireyler arasındaki genetik farklılıkların tespit edilmesinde kullanılan etkin yöntemlerin başında DNA dizi analizi yöntemi gelmektedir. Otomatik DNA dizi analizi cihazlarının geliştirilmesi ve elde edilebilirliklerinin kolaylaşması sonucunda moleküler biyoloji çalışmalarında DNA dizi analizinden yararlanılması gittikçe yaygınlaşmaktadır (71).

DNA dizi analizi veya sekanslama nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Analiz, bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Çoğunlukla gen mutasyonlarının (delesyon, insersiyon vb) ve kalıtsal hastalıkların tespiti ve rekombinant DNA oluşumlarının tayininde kullanılmaktadır (72).

DNA dizi analizinin genetik temeli 1970'li yıllarda ortaya konan iki farklı yöntemeye dayanmaktadır. Bunlardan ilki 1977 yılında Maxam ve Gilbert tarafından ortaya konan ve bazı nükleotidlere (A, T, C ya da G) özgü kimyasal kesim reaksiyonu temelinde geliştirilen yöntemdir. Maxam-Gilbert yöntemi olarak ifade edilen bu teknikte dizi analizi yapılacak hedef DNA bölgesinin uç kısımları radyoaktif madde ile etiketlenmekte ve bazlara özgün noktalardan kesim yapabilen çeşitli kimyasal maddeler ile DNA molekülü 4 ayrı reaksiyon alt grubunda incelenmektedir. Farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilmektedir. Daha sonra poliakrilamid jel elektroforezi ile parçacıklar ayrılmakta ve otoradyografi ile görüntülenmektedir. En son olarak otoradyografi sonucu görüntülenen bantlardan yararlanılarak DNA dizisi elde edilmektedir (71).

Sanger yöntemi olarak bilinen diğer bir DNA dizi analizi yöntemi, günümüzde kullanılmakta olan otomatik DNA dizi analizi tekniklerinin öncüsü olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem laboratuvar ortamında (invitro) gerçekleştirilen DNA replikasyonu işleminin kontrollü bir şekilde yarıda kesilmesi temeline dayanmaktadır. İkili sarmal DNA tek eksenli hale getirilmekte ve hedef DNA bölgesinin bir bölümü ile komplementer olan kısa bir DNA parçacığı, bu bölge ile hibrit oluşturmaktadır. Bu primer/hedef DNA (template) karışımı DNA polimeraz enzimi tarafından katalize edilen ve primere yeni nükleotidlerin ilave edilmesi temelinde 4 ayrı reaksiyon alt grubunda incelenmektedir. Her bir reaksiyonda 4 tip deoksiniükleotidlere (dA, dC, dG ve dT) ilave olarak deoksiniükleotidlerde var olan 3' OH grubunu taşımayan dideoksiniükleotidler (ddN) de bulunmaktadır. Yeni sentezlenen DNA molekülü, primerin uç kısmı etiketlenerek veya sentez sırasında etiketli deoksiniükleotid ilave ederek radyoaktif etiketli hale getirilmektedir. Yeni DNA eksen sentezinin yapılması nükleotidlerin serbest 3' OH grubuna eklenmesi ile devam etmekte ve uzayan eksene ddNTP eklendiği zaman eksen uzaması devam edememektedir. Polimeraz reaksiyonu, ddNTP'lerin nadir ve rasgele ilave edildiği durumlarda yürütülmekte ve ayrıca farklı bazlarda sonlandırılan farklı uzunluklarda DNA molekülleri seti elde edilmektedir. Maxam-Gilbert yönteminde olduğu gibi, her bir reaksiyon grubuna ait parçacık seti, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmakta ve otoradyografi ile görüntülenerek doğrudan jelden okunmaktadır (38).

4. Köpeklerde Genetik Yapı

Uluslararası Kinoloji Federasyonu (FCI)'na kayıtlı 356 köpek ırkı bulunmaktadır (3). Köpeklerin kökeni, evrimi ve birbirleri ile olan genetik uzaklıkların belirlenmesinde, evcilleştirme zamanı ve yerinin tespitinde ve ırklar arasındaki genetik varyasyonun belirlenmesinde mitokondrial DNA (mtDNA), mikrosatellit, SNP, MHC ve RFLP gibi genetik analizlerden yararlanılmaktadır. Bu analizlerin çoğu populasyon genetiği esasına dayanmaktadır (73).

Köpek mtDNA haplotipleri; haplogrup A, B, C, D, E ve F şeklinde 6 ana filogenetik gruba ayrılmakta ve köpeklerin bu gruplarda yer alma yüzdeleri sırasıyla %71.2, 18.0, 7.6, 2.5, 0.3 ve 0.3 olarak bildirilmektedir (74). Dünyadaki köpeklerin hemen hemen %100'ü üç büyük haplogruptan birini taşımaktadır (A %55-85, B %10-35, C%5-15). Ayrıca birkaç haplotipten birini taşıyan köpeklerin çoğu neredeyse her populasyonda paylaşılmaktadır. Özellikle,

14 haplotip Avrupa, Anadolu, Ortadoğu, Güneybatı Asya, ve Doğu Asya'daki köpeklerde ortak olup Universal Tipler (UT) olarak adlandırılmaktadır (75).

Köpeklerin genetik yapıları bize hem köpek ırkları arasındaki akrabalık ilişkileri hem de ırkların coğrafik göçleri hakkında fikir vermektedir. Köpeklerin genetik yapılarıyla ilgili yapılan genetik marker çalışmaları özellikle kalıtsal hastalıkların teşhisi ve davranış bozuklukları üzerine yoğunlaşmıştır.

5. Dünyada Köpekler Üzerinde Çalışılan Marker Genler

Dünyada köpekler üzerinde birçok genetik çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla genetik markerlar da kullanılmaktadır. Genetik markerlar kullanılarak kalıtsal hastalıkların teşhisi yapılabilir, davranış bozukluklarının genetik alt yapısı araştırılabilir, köpeklerin saf ırk olup olmadıkları belirlenebilir veya hangi ırkın/ırkların genini taşıdıklarının tespiti yapılabilir (76).

Köpeklerdeki davranışsal özelliklerin genetik temeli, insanlardaki çeşitli genetik belirteçler (yani aday genler) kullanılarak geniş çapta değerlendirilmektedir (77). Zira, köpeklerde davranış bozuklukları önemli bir toplum sorunu haline gelmiştir. Bugünkü ortalama 400 farklı saf köpek ırkı incelendiğinde her bir ırk için farklı özellikler amaçlanarak seleksiyon yapıldığı gözlenmektedir. Bu saf ırkların sadece morfolojik değil, davranış olarak da farklılık gösterdikleri görülmektedir (78; 79). Dünya geneline bakıldığında Pitbull, Japanese Tosa ve Fila Brasileiro ırklarının yasaklı ırklar olduğu görülmektedir (80). Bir başka açıdan incelendiğinde Türk Silahlı Kuvvetleri ve Dünya ordularında Belçika Malinois, Labrador Retriever ve Alman Çoban Köpeklerinin diğer ırklara göre daha fazla kullanıldıkları görülmektedir. Farklı şartlarda ve ortamlarda aynı ırkların kullanılması veya yasaklanması saldırganlığın sadece çevresel bir faktör olmadığını genetik yapıyla da ilişkili olduğunu göstermektedir.

Günümüzde köpeklerde davranış konusunda yapılan genetik çalışmaların oldukça fazla olduğu dikkat çekmektedir. Örneğin, bazı hormonlar, nörotransmitter maddeler ve enzimlerin hayvanlarda davranış üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir (81). Nörotransmitter maddeler merkezi sinir sisteminin işleyişinde oldukça önemli olup, insan ve hayvan davranışlarında kritik rol oynamaktadır (82). Yapılan bazı araştırmalarda, enzimler, hormon taşıyıcılar ve reseptörlerdeki SNP gibi genetik değişimlerin farklı davranışlar ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (83). Köpeklerin saldırganlıkları üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, serotoninin diğer nörotransmitter maddelere göre saldırganlığı daha fazla etkilediği görülmektedir (81). Davranışla ilgili yapılan diğer araştırmalar, dopamin taşıyıcı gen ve androjen reseptör geni gibi nörotransmitter maddeleri düzenleyen genler üzerine yoğunlaşmıştır.

Golden Retriever ırkı köpeklerde serotonin reseptörlerinin (htr1A, htr1B, htr2A ve slc6A4) agresif davranış özellikleri üzerine etkisi araştırılmış ve incelenen haplotiplerin agresiflik ile ilgili bir duruma neden olmadığı gözlemlenmiştir (84).

Proskura ve ark., (79) köpeklerde agresif davranışların genetik temelini ortaya çıkarmak amacıyla 2 farklı geni incelemişlerdir. Bu çalışmada, dopamin reseptör geninin (DRD4) değişik tekrarlarından oluşan polimorfizmler ve serotonin reseptör genindeki (HTR2B) C/T değişimi incelenmiştir. Toplam 121 köpeğin incelendiği çalışmada (21 agresif davranış gösteren, 100 sakin mizaçlı köpek), dopamin taşıyıcı genin intron 2 bölgesindeki polimorfizmin köpeklerde agresif davranışla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Serotonin reseptör geni (HTR2B) üzerinde olan C/T tek nükleotid polimorfizminin, sakin ve agresif köpekler arasında benzerlik gösterdiği ve agresif davranışa etki etmediği belirlenmiştir.

Lit ve ark., (85) dopamin taşıyıcı gen üzerindeki değişimlerin (SLC6A3) davranışa etkilerini araştırmışlardır. Bu genin intron kısmında 12 nükleotidlik insersiyon "poly (A)" olduğunu tespit etmişlerdir. 138 Malinois ırkı köpek üzerinde yürütülen çalışmada, bu değişimin (poly(A)) köpeklerde davranış değişikliğinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

Konno ve ark., (86) tarafından Androjen reseptör (AR) geninin köpeklerde saldırganlık davranışı üzerine etkileri araştırılmıştır. Androjen Reseptör (AR) geninin ekson 1 bölgesi içindeki polimorfik trinükleotid tekrarları 171 köpek üzerinde yürütülen bu çalışmada gözlemlenmiştir. Androjen reseptör geninin (AR); erkek köpeklerde saldırganlıkla ilgili olduğu tespit edilmiş olup dişi köpeklerde bu etkiye rastlanmamıştır.

Japonyaya özgü Shiba Inu ırkı köpekler üzerinde yürütülen bir araştırmada, c.471T>C genindeki polimorfizm

(nöral/epitel yüksek affiniteli glutamat taşıyıcı) ile SLC1A2 geni arasında "yabancılara karşı saldırgan davranış" ile ilgili önemli ilişki tespit edilmiş olup c.471T>C genindeki polimorfizmin Shiba Inu ırkı köpeklerde agresif davranıştan sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (87).

Köpeklerde bildirilen yaklaşık 500 kalıtsal hastalık içinde 100'den fazlasının tek nokta mutasyonu ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Günümüzde çok sayıda hastalık genetik markerlar ile tespit edilebilmektedir. Bu da erken teşhis ve marker destekli seleksiyon için temel oluşturmaktadır (88). Ayrıca, bazı kalıtsal hastalıklar çok sayıda köpek ırkını etkilemektedir. Oluşumunda genetik yapının etkili olduğu deri hastalıkları (genodermatozlar) buna örnek gösterilebilir. Bu hastalıklar aynı zamanda hayvan refahını da önemli ölçüde azaltmaktadır. Seleksiyon programlarında bu durumun dikkate alınması gereklidir (77).

6. Marker Destekli Seleksiyon (MAS)

Hayvanların genetik yapısına bakılarak fenotipik değerlerinin tahmin edilmesi ve buna göre seleksiyonun yapılmasıdır. Bu amaçla günümüzde genetik (DNA) markerler kullanılmaktadır.

Geleneksel seleksiyon yöntemlerine göre önemli avantajları vardır. Geleneksel seleksiyon yöntemlerinde hayvanların genetik değeri kendisinin veya akrabalarının performanslarına (verimlerine) göre yapıldığından oldukça zor, yorucu, uzun zaman gerektiren ve pahalı bir uygulamadır. Nitekim bazı karakterler bakımından bireylerin genetik değerlerinin belirlenmesi için hayvanların belli bir yaşa kadar büyütülmeleri ve yüzlerce akrabasının performansının incelenmesi gerekmektedir. Marker Destekli Seleksiyon'da bunlara gerek yoktur.

Kantitatif bir karakteri etkileyen gen ya da gen bölgeleri doğrudan bilinmediğinde genlerle ilişkili (bileşik olan) DNA markerleri kullanılmaktadır. Markerlar kromozomlarda yerleri bilinen, kalıtımı izlenilebilen ancak fonksiyonları bilinmeyen sınırlı bölgelerdir. Genetik markerler çok sayıda amaç için kullanılmaktadır. Bu amaçlardan biri de seleksiyondur (89).

Kantitatif karakterleri etkileyen genlerin yerleştiği lokuslar QTL olarak adlandırılır. QTL ler, DNA'nın bir bölgesi olup hayvanların fenotipinde etkili olurlar. Markerler kullanılarak QTL ler bakımından seleksiyon yapılmaktadır. Seleksiyon çalışmalarında QTL ile marker arasındaki uzaklık çok önemlidir. Bu uzaklık fazla olunca markerin ıslahta etkisi az olmaktadır. Çünkü mayoz bölünme sırasında crossing over olma olasılığı artmaktadır.

QTL ler kullanılarak yapılan seleksiyonda sınırlı sayıda marker kullanıldığı için ilerleme ancak ele alınan QTL in etkisiyle sınırlı olmaktadır. Oysa sınırlı sayıda marker kullanmak yerine genomdaki tüm markerlere ait bilginin kullanılması yani SNP lerin kullanılması seleksiyonda daha etkili olmaktadır (89).

Marker destekli seleksiyondan faydalanılarak çiftlik hayvanlarında süt kalitesi, üreme özellikleri, köpeklerde kalça veya dirsek displazisi olmayan, saldırgan mizaçta veya sakin mizaçta, tüy rengi, egzersize bağlı kollaps hastalığı gibi görev performansını önemli derecede etkileyebilecek hastalıklar bakımından genetik markerlar kullanılarak seleksiyon yapılmaktadır.

Damızlık köpek seçimi ve yavru seçiminde bakılan özellikler farklılık göstermektedir. Damızlık seçiminde damızlık köpeklerin iskelet yapısının düzgün, doğru bir duruşa sahip olmasına, egzersize bağlı kollaps, kalça displazisi gibi hastalıklar taşımamasına, üreme hastalıklarından arı olmasına ve üreme sisteminin sağlıklı olmasına dikkat edilir. Yavru seçiminde ise sosyalizasyon aşamasındaki yavrulara uygulanan; yükseklik korkusu, sosyal dominans, sosyallik, yüksek sese tepki, oyuncaklara ilgi vb karakter testleri ile mizaçları anlaşılmasına çalışılır. Marker destekli seleksiyon, saldırgan veya sakin mizaça göre yavru seçilmesine olanak sağlayabilir. Bu durum, sakin mizaç istenen arama kurtarma köpeklerinin ve saldırgan mizaç istenen keşif köpeklerinin seçiminde önemli olmaktadır.

7. Genomik Seleksiyon

Tüm genomu kapsayan binlerce (veya yüzbinlerce) marker (SNP) kullanılarak damızlık adaylarının damızlık değerlerinin istatistiksel metotlar yardımıyla tahmin edilmesi ve bu tahmine göre yapılan seleksiyona Genomik Seleksiyon denir. Genomik seleksiyon, önemli verim özelliklerinde genetik varyasyona neden olan polimorfizm ile markerlar (SNP ler) arasındaki ilişkilere dayanır.

Genomik seleksiyonun yapılabilmesi için öncelikle referans popülasyonlarda hayvanların genetik ve fenotipik bilgileri kombine edilerek tahmini genomik damızlık değeri hesaplanır ve bir formül geliştirilir. Bu formül kullanılarak aday hayvanlar sadece genetik özelliklerine bakılarak damızlık olarak seçilirler.

Genomik seleksiyondan daha önce kullanılan marker destekli seleksiyon yöntemlerinde az sayıda marker (dolayısıyla az sayıda QTL) kullanıldığı için kantitatif özelliklerin ıslahında başarı sınırlı olmuştur. Çünkü kantitatif özellikler etkileri küçük yüzlerce veya binlerce polimorfizmden etkilenmektedir. Genom boyu DNA markerlarıyla yapılan seleksiyonda (genomik seleksiyon) bütün lokusların etkileri dikkate alınmaktadır.

SNP'lerin belirlenmesi DNA dizileme yöntemi ile mümkün olabilmektedir. DNA dizileme (DNA sekans) (genom boyu ilişki analizi, GWAS), bütün genomun veya bir DNA bölgesinin nükleotit dizisinin belirlenmesidir. Bu yöntemle görevleri hakkında bir bilgi olmayan genlerin verim veya hastalıklarla ilişkileri ve bu genlerin yerleri belirlenmeye çalışılır. DNA dizi analizi ile bütün genomun veya bazı DNA bölgelerinin dizilişi çıkartılarak verimler ile ilişkilendirilmeye çalışılır. Bu durum SNP'lerin belirlenmesi ve bunların verimlerle ilişkilerinin ortaya konmasına imkan sağlamaktadır. Böylece genomik seleksiyon mümkün olabilmektedir (89).

8. Sonuç

Marker genlerle ilgili araştırmalar yıllardır devam etmektedir. Mevcut marker genlerin ve yeni keşfedilen marker genlerin fenotipe etkileri gün geçtikçe ortaya konulmaktadır.

Marker genlerin kullanımı ile hastalıkların erken teşhis edilmesinin kolay, hızlı ve daha güvenilir hale geleceği ve bu markerlardan faydalanılarak marker destekli seleksiyon yapılabileceği değerlendirilmektedir. Aynı zamanda, köpek yetiştiriciliğinde önemli bir problem olan kalça displazisi gibi bozuklukların marker destekli seleksiyon ile önceden tespiti yapılarak görülme sıklığının azaltılabileceği öngörülmekte ayrıca görev köpeklerinin seçiminde davranışla ilgili marker genlerin incelenerek davranışa etkilerinin tam olarak ortaya çıkarılmasının görev köpeklerinin seçimi ve gruplandırılmasında önemli olacağı düşünülmektedir.

Türk çoban köpeği (Kangal), Malaklı, Akbaş çoban köpeği, Zağar, Sultan Tazısı, Çatalburun ve Zerdava gibi yerli köpek ırkları ile ilgili genetik çalışmaların artmasının gelecek yıllarda bu ırkların saf olarak yetiştirilmeleri ve bu ırklara özgü davranışların genetik temelini ortaya konulmasında önemli olacağı öngörülmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların herhangi bir çıkar çatışması beyanı bulunmamaktadır.

Finansal Kaynak Beyanı

Çalışma için herhangi bir finansal bir destek alınmamıştır.

Yazar Katkısı Beyanı

Bu bölümde makalenin yazar/yazarlarının çalışmaya katkıları aşağıdaki başlıklar yardımıyla yazar(lar)ın isim-soyisimleri kullanılarak belirtilmelidir.

Fikir/kavram: Banu YÜCEER ÖZKUL, Hasan Zafer ŞAFAK

Deney tasarımı: Banu YÜCEER ÖZKUL, Hasan Zafer ŞAFAK

Denetleme/Danışmanlık: Banu YÜCEER ÖZKUL

Veri toplama: Banu YÜCEER ÖZKUL, Hasan Zafer ŞAFAK, Murat SAĞLAM

Veri analizi ve yorum: Banu YÜCEER ÖZKUL, Hasan Zafer ŞAFAK

Kaynak taraması: Banu YÜCEER ÖZKUL, Hasan Zafer ŞAFAK, Murat SAĞLAM

Makalenin yazımı: Banu YÜCEER ÖZKUL, Hasan Zafer ŞAFAK, Murat SAĞLAM

Eleştirel inceleme: Banu YÜCEER ÖZKUL

Etik Onay

Bu makaledeki sunulan verilerin, bilgilerin ve dokümanların akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edildiği, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçlarının bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunulduğuna dair yazarlardan etik beyan alınmıştır.

Kaynaklar

1. Yüceer Özkul B, Doka PCK, Özen D, Özbaşer FT, Özarslan B, Atasoy F. Correlation between live weight and body measurements in certain dog breeds. *South African Journal of Animal Science*, 2021; 51(2):151-159.
2. Atasoy F, Kanlı O. Türk çoban köpeği Kangal. Medisan yayınevi, ISBN:975-7774-55-3, 1. Baskı; 2004.
3. FCI breeds nomenclature Erişim: [<https://www.fci.be/en/Presentation-of-our-organisation-4.html>]
Erişim tarihi: 26.10.2022
4. Tunçay GY. Dogs with their environmental bioethics aspect evolution process. ISBN 978-625-7562-88-1; 2021.
5. Özbeyaz C, Kocakaya A Süt sığırlarında genomik değerlendirme. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2011; 51(2): 93 - 104.
6. Bayraktar M, Gürses M. Moleküler markerlerin hayvan yetiştiriciliği ve genetiğinde kullanımı. *F Ü Sağ Bil Vet Derg* 2014; 28 (2): 99-106.
7. Plassais J. Whole genome sequencing has gone to the dogs *Nat Commun* 2019; 10: 1489.
8. Lindblad TK, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, Zody MC. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005; 438: 803-819.
9. Houbt K, Rigterink A. Genetics of canine behavior (A review). *World Journal of Medical Genetics* 2014; 4 (3): 46-57.
10. Spady TC, Ostrander EA. Canine behavioral genetics: pointing out the phenotypes and herding up the genes. *Perspectives in Human Genetics* 2008; 82 (1): 10-18.
11. National Human Genome Research Institute, Genetic Marker. Erişim: [<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Marker>] Erişim Tarihi: 29.07.2023
12. Çarlı TK. Polymerase chain rection (PCR) ile ilgili sıklıkla karşılaşılan sorular ve yanıtları. Erişim:[www.protekt.com.tr/dokumanlar/pcr_nedirguneygokcelik.doc]
Erişim Tarihi:14.04.2016
13. Arda N, Temizkan G. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemlere genel bakış. *Nobel Tıp Kitabevi*, 2.Baskı; 2021.
14. Aras ES. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ders Notları Erişim: [<http://atlasbiyo.com>] Erişim Tarihi: 30.07.2023.
15. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 6531-6535.
16. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 7213-7218.
17. Caetano Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primer. *Biotechnology* 1991; 9: 553-557.
18. Özaydın S. RAPD (rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematigi. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2004; 6.
19. Kumar A. PCR-based randomly amplified polymorphic DNA used for molecular characterization and detection of genetic diversity in sheep breeds. *The Pharma Innovation Journal* 2021; 10 (3): 18-21.
20. Ali AB, Ahmed MMM, Aly OM. Relationship between genetic similarity and some productive traits in local chicken strains. *African Journal of Biotechnology* 2003; 2 (2): 46-47.

21. Binbaş P, Cemal İ. Koruma altındaki Çine Çaparı koyunlarda genetik çeşitlilik. *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty* 2016; 13 (1): 71-78.
22. Elmacı C, Öner Y, Öziş S, Tuncel E. RAPD analysis of DNA polymorphism in Turkish sheep breeds. *Biochemical Genetics* 2007; 45: 691-696.
23. Kumar M. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7 (23).
24. Bhattacharya K, Kumar S, Joshi D, Kumar P. Estimation of inbreeding in cattle using RAPD markers. *Journal of Dairy Research* 2003; 70: 127-129.
25. National Human Genome Research Institute, Polymerase Chain Reaction. Erişim: [<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>] Erişim Tarihi: 30.07.2023.
26. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32 (3): 314-331.
27. Rao A, Bhat VK, Totey SM. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) genetic analysis. *Biomolecular Engineering* 1996; 13 (5): 135-138.
28. Ahmed MMM. Species identification in meat origin farm animals through DNA technology. *biotechnology in animal husbandry*. 2005; 21 (1-2): 13-15.
29. Stres B. The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology. *Acta Agriculturae Slovenica* 2006; 88: 65-73.
30. Griffiths JFA. Mitochondrial inheritance in filamentous fungi. *Journal of Genetics* 1996; 75: 403-414.
31. Cemal İ, Karaca O, Davis GM, Galloway SM, Yılmaz O. Molecular genetic testing of Karya sheep for booroola and inverdale mutations. In *International Scientific Conference, Challenges of the Balkan Animal Industry and the Role of Science and Cooperation (BALNIMALCON) 2009*; 108-111.
32. Yılmaz O, Cemal I, Karaca O, Sevim S, Öztürk M, Ata N. Calpastatin gene polymorphism in Turkish sheep breeds. *International Scientific Conference (BALNIMALCON): Challenges of the Balkan Animal Industry and the Role of Science and Cooperation, 2013*.
33. Yılmaz O, Cemal I, Karaca O. Genetic diversity in nine native Turkish sheep breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics* 2014; 45 (4): 604-8.
34. Yılmaz O, Sezenler T, Ata N, Yaman Y, Cemal I, Karaca O. Polymorphism of the ovine calpastatin gene in some Turkish sheep breeds. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 2014; 38 (4): 354-7.
35. Solak M, Bağcı H, Şengil AZ, Öztaş S. Moleküler genetik ve rekombinant DNA teknolojisi (temel ilkeler). *Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı Yayınları No: 5, Ankara, 2000*.
36. Vos P., Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 1995; 23 (21): 4407-4414.
37. Malik MH. AFLP based breed marker present a decree for Pakistani Sahiwal cattle breed identification. *Pakistan J Zool* 2022; 1-9.
38. Avise JC. *Molecular markers. Natural history and evolution*, 2nd Ed.; 2004.
39. Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European patent application no.0534858 a 1. European Patent Office, Paris, 1993.
40. Sevim S, Cemal İ, Yılmaz O, Karaca O. Mastitis resistance genes in dairy cattle. *International Animal Science Congress of Turkish and Relatives Communities 2012*; 11-13.
41. Sheng HL, Jun R, Evens G, Hua-Shui A, Jun G, Ke-Fei C, Neng-Shui D. AFLP markers for genomic DNA fingerprinting in pigs. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 2007; 1 (1): 9-12.
42. Foulley JL. Genetic diversity analysis using lowly polymorphic dominant markers: the example of AFLP in pigs. *Journal of Heredity* 2006; 97 (3): 244-252.
43. Marsan PA, Antaldi GV, Bertoni G, Valentini A, Cassandro M, Kuiper M. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 1997; 28 (6): 418-426.
44. Negrini R, Nijman IJ, Milanese E, Moazami-Goudarzi K, Williams JL, Erhardt G, et. al. Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. *Animal Genetics* 2007; 38 (1): 60-66.

45. Utsunomiya YT, Bomba L, Lucente G, Colli L, Negrini R, Lenstra JA, Erhardt G, Garcia JF, Marsan PA. Revisiting AFLP fingerprinting for an unbiased assessment of genetic structure and differentiation of taurine and zebu cattle. *Bmc Genetics* 2014; 15 (47).
46. Nijman I, Otsen M, Verkaar E. Hybridization of Banteng (*Bos javanicus*) and Zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity* 1999; (90): 10-16.
47. Santana QC. Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques* 2009; 46 (3).
48. Barendse WSM, Armitage LM, Kossarek A, Shalom BW, Kirkpatrick AM, Ryan D, et. al. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 1994; 6: 227-235.
49. Otsen M, Bieman M, Kuiper TR, Pravenec M, Kren W, Kurtz TW, Jacob HJ, Lankhorst Van Zutphen FM. Use of AFLP markers for gene mapping and QTL detection in the Rat. *Genomics* 1996; 37 (3): 289-294.
50. Buttler JM. *Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers* (2nd Edition). Elsevier Academic Press, New York; 2005.
51. Novroski, Nicole MM. Exploring new short tandem repeat markers for DNA mixture deconvolution. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science* 2021; 3 (1): 1390.
52. Machugh DE. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. 1996; 25.
53. Hoda A, Marsan PA. Genetic characterisations of Albanian sheeps by microsatellites markers. *Analysis of Genetic Variation in Animals* 2012; 3-45.
54. Öner Y, Üstüner H, Orman A, Yılmaz O, Yılmaz A. Genetic diversity of Kıvrıkcık sheep breed reared in different regions and its relationship with other sheep breeds in Turkey. *Italian Journal of Animal Science* 2014; 13 (3): 3382.
55. Özşensoy Y, Kurar E. Genetic diversity of native Turkish cattle breeds: Mantel, AMOVA and bottleneck analysis. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 2014; (1): 86-93.
56. Yılmaz O, Cemal I, Karaca O, Ata N. Association of calpastatin (CAST) gene polymorphism with weaning weight and ultrasonic measurements of loin eye muscle in Kıvrıkcık lambs. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014; 20 (5): 675-680.
57. Yılmaz O, Sezenler T, Sevim S, Cemal I, Karaca O, Yaman Y, Karadağ O. Genetic relationships among four Turkish sheep breeds using microsatellites. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 2015; 39 (5): 576-82.
58. Tian F, Sun D, Zhang Y. Establishment of paternity testing system using microsatellite markers in Chinese Holstein. *Journal of Genetics and Genomics* 2008; 35 (5): 279-84.
59. Araújo AM, Guimarães SE, Pereira CS, Lopes PS, Rodrigues MT, Machado TM. Paternity in Brazilian goats through the use of DNA microsatellites. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2010; 39: 1011-4.
60. Yılmaz O, Karaca O. Karya koyunlarda mikrosatellit işletleyicilerle babalık testi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2012; 18 (5): 807-813.
61. Whitehouse AM, Harley EH. Post-bottleneck genetic diversity of elephant populations in South Africa, revealed using microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 2001; 10 (9): 2139-49.
62. Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 1994; 136 (1): 231-245.
63. Groenen MA, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Briles WE, Burke T, Vignal A. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research* 2000; 10 (1): 137-147.
64. Wang DG, Fan JB, Siao JC, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280 (5366): 1077-1082.
65. Allemailem KS. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in prostate cancer: its implications in diagnostics and therapeutics. *Am J Transl Res* 2021; 13 (4): 3868-3889.
66. Ardıçlı S. Holstein erkek danalarda karkas özellikleri, et verimi ve kalitesini etkileyen genlerin belirlenmesi ve bu genlerin verimler ile ilişkisi. *Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*; 2015.

67. Zengin Sunay S. Paraoksonaz polimorfizminin ve paraoksonaz enzim aktivitesinin pestisitlere maruz kalan bireylerde araştırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi; 2010.
68. Yılmaz O. Seleksiyona Yardımcı Markerlar (Marker Assisted Selection) Erişim adresi: [<http://docplayer.biz.tr/3202926-Seleksiyona-yardimci-markerlar-marker-assisted-selection.html>] .Erişim tarihi:30.07.2023.
69. Beuzen ND, Stear MJ, Chang KC. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal* 2000; 160: 42–52.
70. Özşensoy Y, Kurar E. Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2012; 10 (2): 11-19.
71. Özdil F. Mitokondriyel DNA PCR-RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) markerleri kullanılarak Türkiye'nin farklı yörelerine ait bal arılarının tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), 2007.
72. Mergen H. DNA dizi analiz yöntemleri. Erişim Adresi: [https://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_dizi.pdf] Erişim Tarihi: 29.07.2023.
73. Vila T, Ceradini F, Bozzoni I. Identification of a novel element required for processing of intron-encoded box C/D small nuclear RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Moll Cell Biol* 2000; 20: 1311-1320.
74. Angleby H, Savolainen P. Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. *Forensic Science International* 2005; 154: 99-110.
75. Pang JF, Kluetsch C, Zou XC, Zhang A. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution* 2009; 26 (12): 2849-2864.
76. Dog Tests. Erişim: [<https://animalgenetics.com/dog-tests/>] Erişim tarihi: 30.07.2023
77. Marín-García PJ. Inheritance of monogenic hereditary skin disease and related canine breeds. *Veterinary Sciences* 2022; 9 (8): 433.
78. Hart BL, Miller MF. Behavioral Profiles of Dog Breeds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 186 (11): 1175-1180.
79. Proskura SV, Frost A, Gugala L, Dybus A, Grzesiak W, Wawrzyniak J, et. al. Genetic background of aggressive behaviour in dogs. *Acta vet. Brno* 2013; 82: 441-445.
80. Leefeldt ED, Danise AMY. Dog breeds banned by home insurance companies [<https://www.forbes.com/advisor/homeowners-insurance/banned-dog-breed-lists/>] Erişim Tarihi:27.10.2022
81. Nelson RJ, Chiavegatto S. Molecular basis of aggression. *Trends in Neurosciences*, 2001; 24 (12): 713-719.
82. Våge J, Ligas F. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in coding regions of canine dopamine and serotonin-related genes. *Bmc Genetics* 2008; 9 (10).
83. Savitz JBR, Rajkumar S. Genetic variants implicated in personality: a review of the more promising candidates. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 2008; 131 B (1): 20-32.
84. Berg L, Liinamo AE, Leegwater PA, Schilder BH, Arendonk J, Oost BA. Genetic variation in aggression-related traits in Golden Retriever dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 2007; 104 (1-2): 95-96.
85. Lit L, Belanger JM, Boehm D, Lybarger N, Oberbauer MA. Differences in behavior and activity associated with a poly (A) expansion in the dopamine transporter in Belgian Malinois. *Plos One* 2013; 8 (12).
86. Konno A, Murayama MI, Hasegawa T. Androgen receptor gene polymorphisms are associated with aggression in Japanese Akita. *Inu Biol Lett* 2011; 7: 658–660.
87. Takeuchi Y. Association analysis between canine behavioural traits and genetic polymorphisms in the Shiba Inu breed. *Animal Genetics* 2009; 40 (5): 616-622.
88. Yaprakçı MV, Tekerli M. A review on hereditary and environmental factors causing hip dysplasia in dogs. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2015;55(1):37-43.
89. Ünal N. Hayvan ıslahı ders notları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı, 2023.