

Türkiye’de Yetiştirilen Et Irkı Kültür Sığırlarında Leptin, Ghrelin ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü -1 (IGF-1) Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi**

Aydın DAŞ^{1*}, Tekin ŞAHİN², Ömer AKBULUT³, A. Şükrü BENGÜ⁴, Faruk BOZKAYA¹

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

²Sirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye.

³Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Erzurum, Türkiye.

⁴Bingöl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Bingöl, Türkiye.

Geliş Tarihi: 08.03.2019

Kabul Tarihi: 02.06.2019

Özet: Bu çalışma, Türkiye’de yetiştirilen et ırkı kültür sığırlarında leptin, ghrelin ve insülin benzeri büyüme faktörü -1 (IGF-1) geni polimorfizmlerinin belirlenmesi, polimorfizmler yönünden genotip ve allel sıklıklarının tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmanın materyalini Şanlıurfa Harranova Besi ve Tarım İşletmesi’nde bulunan ve fenotipik değerlendirmeyle seçilmiş Hereford (n=112), Angus (n=145), Şarole (n=54), 36 Siyah Hereford (n=36), Brahman (n=24) ve Limousin (n=34) ırkı toplam 405 baş erkek hayvan oluşturmuştur. Hayvanların et örneklerinden DNA izole edildikten sonra leptin, ghrelin ve IGF-1 gen polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuç olarak incelenen besi sığırı sürüsünde IGF-1/*SnaBI* polimorfizmi yönünden BB, AB ve AA genotiplerinin her üçü de gözlemlenmiştir. IGF-1 lokusunda sıklığı en yüksek genotip AB, en düşük genotip ise AA şeklinde bulunmuş olup B allelinin sıklığı (0.600) A allele göre (0.400) yüksek olduğu gözlenmiştir. Leptin/*PstI* polimorfizmi yönünden bakıldığında da yine olası üç genotip gözlenmiştir. Bu lokusta sıklığı en yüksek genotip CT, en düşük genotip ise TT olarak bulunmuş, C allelinin sıklığı 0.571 bulunurken T allelinin sıklığı 0.429 olarak tespit edilmiştir. Ghrelin/*Bfal* polimorfizmi yönünden ise incelenen materyalde AA ve AG genotipleri gözlenirken GG genotipi gözlenmemiştir. Buna bağlı olarak A allelinin sıklığı yüksek bulunurken (0.938), G allel sıklığı ise oldukça düşük (0.062) bulunmuştur. Sonuç olarak incelenen besi sığırı populasyonlarının IGF-1/*SnaBI* ve Ghrelin/*Bfal* polimorfizmleri yönünden Hardy-Weinberg dengesinde, Leptin/*PstI* polimorfizmi yönünden ise dengede olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Genetik polimorfizm, Besi sığırları, Leptin, Ghrelin, IGF-1.

Determination of Genetic Polymorphisms of Leptin, Ghreline and Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) Genes in Beef Cattle Raised in Turkey

Abstract: This study was performed to determine polymorphisms in leptin, ghrelin and insulin like growth factor-1 (IGF-1) genes and to identify genotype and alleles frequencies in beef cattles raised in Sanliurfa province of Turkey. A total of 405 male beef cattles, which were raised in Harranova Live stock and Agricultural Enterprise in Şanlıurfa and selected by phenotypic evaluation, were included in to the study. The animal material consisted of Hereford (n=112), Angus (n=145), Charolais (n=54), Black Hereford (n=36), Brahman (n=24) and Limousin (n=34) cattles. After DNA isolation from meat samples, leptin, ghrelin and insulin like growth factor-1 (IGF-1) gene polymorphisms were determined by using PCR-RFLP method. All three possible genotypes of BB, AB and AA were observed in IGF-1/*SnaBI* gene AB and AA genotypes had the highest and the lowest frequencies, respectively. The frequency of B allele (0.600) was higher than that of A allele (0.400). With respect to *PstI* polymorphism at the leptin gene, three possible genotypes were also observed. In this locus; genotypes having the highest and the lowest frequency were CT and TT respectively and the frequency of C allele was 0.571 while frequency of T was 0.429. At the *Bfal* polymorphic site of Ghrelin gene in AA and AG genotypes were observed while GG genotype was not observed. Accordingly, the frequency of the A allele was found to be high (0.938) and the frequency of the G allele was found to be quite low (0.062). As a result, it was determined that the examined beef cattle populations were in the Hardy-Weinberg equilibrium in terms for IGF-1 / *SnaBI* and Ghrelin / *Bfal* polymorphisms but not for Leptin/*PstI* polymorphism.

Keywords: Genetic polymorphisms, Beef cattle, Leptin, Ghreline, IGF-1.

Giriş

Hayvan yetiştiriciliğinde verimin artırılması yönünde yapılan farklı uygulamaların başında seleksiyon yöntemleri gelmektedir. Ekonomik öneme sahip karakterlerin hemen hepsi küçük eklemeli etkileri olan çok sayıda gen tarafından

kontrol edilen ve çevre koşullarından çokça etkilenen kantitatif özelliklerdir. Bu durum kantitatif özellikler bakımından yapılan seleksiyonun hızını yavaşlatmakta ve zorlaştırmaktadır (Öner ve ark., 2013). Moleküler genetik alanındaki gelişmeler,

ekonomik özelliklerin fenotipik farklılıklar göstermesinde önemli etkileri olan farklı genlerin veya gen bölgelerinin belirlenebilmesine imkan sağlamaktadır. Seleksiyonla sağlanacak genetik ilerlemenin hızlı ve etkin olmasını sağlayan Belirteç Destekli Seleksiyon (MAS = Marker Assisted Selection)'nin uygulanabilmesi için her bir belirtecin popülasyondaki çeşitliliğinin bilinmesi gerekmektedir (Öner ve ark., 2011).

Dünyada ve Türkiye'deki araştırmacılar ekonomik özellikler üzerinde etkili olabileceği düşünülen çeşitli gen bölgelerindeki allellerin popülasyonlardaki sıklığını belirlemek amacıyla çeşitli araştırmalar yapmışlardır (Akyüz ve ark., 2013; Rogberg-Muñoz ve ark., 2013; Trujillo ve ark., 2012). Bununla birlikte bazı araştırmacılar ise farklı zamanlarda tespit edilen farklı allellerin verim özellikleri ile olan ilişkilerini incelemişlerdir (Curi ve ark., 2012; De la Rosa Reyna ve ark., 2010; Gurses ve Yuçe, 2012).

Zhang ve ark. (1994) tarafından keşfedilmiş olan leptin, sitokin benzeri protein yapısında bir hormondur. Leptinin memelilerde yağlanmayı durdurucu etkiye sahip temel bir fizyolojik faktör olduğu bildirilmiştir (Nkrumah ve ark., 2004). Sığırlarda 4. kromozom üzerinde haritalanmış olan leptin geni (Pomp ve ark., 1997) 3 ekson ve 2 introndan oluşur (Taniguchi ve ark., 2002) ve 16 kD (Kilodalton) büyüklüğünde bir proteini kodlar (Friedrich ve ark., 1995).

Leptin geninin fonksiyonu nedeniyle birçok araştırmacı tarafından bu gendeki polimorfizm ile sığırlarda çeşitli verimler arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Buchanan ve ark. (2002) besi sığırlarında leptin geni 2. ekzonundaki polimorfizm ile karkas yağ düzeyi arasında önemli ilişki olduğunu bildirmiştir. Anton ve ark. (2011) leptin lokusunda TT genotipindeki Angus ırkı boğaların *Musculus longissimus dorsi* ve *Musculus semitendinosus* kaslarındaki yağ yüzdesinin CC genotiplilerden daha yüksek ($P < 0.05$) olduğunu belirtmişlerdir. Nobari ve ark. (2010) İsviçre esmeri ve İran'ın yerli bir ırkı olan Sistani ineklerinde leptin geninin 2. intronundaki polimorfizm ile gelişme parametreleri arasındaki ilişkiyi incelemişler ve AB genotipine sahip Sistani ineklerinin 9 ve 12 aylık canlı ağırlıkları bakımından AA genotipine sahip bireylerden daha yüksek değerler gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Ghrelinin, büyüme hormonu salınımını uyaran 28 aminoasit uzunluğunda oligopeptid yapıda bir hormondur. Başlıca mide dokusundan salgılanan bu hormon ayrıca bağırsaklar, böbrekler, beyin, plasenta, hipofiz bezi ve pankreasta da üretilmektedir (Kojima ve ark., 1999). Ghrelinin, genel metabolik olaylar ile büyüme ve vücut kompozisyonu arasında bir köprü vazifesi görmektedir (Kowalewska-Łuczak ve ark., 2011).

Ghrelinin geni sığırlarda 22. kromozom üzerinde (BTA22) lokalize olmuş 5 ekson ve 4 intron içeren bir gendir (Colinet ve ark., 2009). Ghrelinin geni yapı ve fonksiyonları itibarıyla merak uyandıran ve verim özellikleri ile ilişkileri araştırılan (Gil ve ark., 2013; Sherman ve ark., 2008) aday genlerden bir tanesidir. Memelilerde ve kanatlılarda ghrelinin gen polimorfizmi ile alakalı yapılan araştırmalar, bu gendeki polimorfizmin yağ depolama (Nie ve ark., 2009), vücut ağırlığı (Ukkola ve ark., 2001; Ukkola ve ark., 2002) ve vücut uzunluğu (Jin ve ark., 2010) gibi özellikler üzerinde etkin bir rol oynadığını göstermektedir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (Insulin like growth Factor-1; IGF-1) metabolizmanın düzenlenmesinde, embriyo gelişiminde, büyümede ve hücre çoğalmasında anahtar rol oynayan büyüme faktörlerinden biridir. IGF-1, 70 aminoasit içeren 7649 kD molekül ağırlığında bazik bir peptittir (Daughaday ve Rotwein, 1989). Bu faktörün büyüme ve hücre çoğalmasının düzenlenmesindeki rolünden dolayı sığırlarda et üretim özellikleri ve büyüme oranı için aday genlerden biri olarak kabul edilmektedir (Siadkowska ve ark., 2006). Sığırlarda IGF-1 geni, 5. kromozomda lokalize olmuştur (Kappes ve ark., 1997).

Curi ve ark. (2005) 384 baş besi sığırı üzerinde yapmış oldukları araştırmada (Nellore=79, Canchim=30, 275 baş Simmental ve Angus kökenli melez besi sığırı) IGF-1/*SnaBI* BB genotipine sahip bireylerin AB genotipine oranla canlı ağırlık ve sıcak karkas ağırlığı yönünden önemli derecede yüksek, kabuk yağı kalınlığı yönünden ise önemli derecede düşük değerler gösterdiğini bildirmişlerdir. Siadkowska ve ark. (2006) Polonya'daki Holstein Friesian ırkı sığırlarında yem tüketimi, yemden yararlanma oranı ve kesim günü canlı ağırlığı açısından AB genotipinin BB genotipinden, soğuk karkas ağırlığı, değerli et miktarı ve etin yağ oranı açısından AB genotipine sahip bireylerin AA genotipinden daha yüksek değerlere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) yöntemi günümüzde DNA düzeyinde polimorfizm araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler arasındadır. Bu yöntemde alınan sonuçların, laboratuvar şartlarına göre değişkenliğinin az olması ve güvenilir olması yöntemin hayvan yetiştirmede belirteç olarak kullanımını artırmaktadır (Eken, 2010; Kaplan, 2010).

Bu çalışmada Şanlıurfa'da yetiştirilen etçi kültür ırkı besi sığırlarında metabolik hormonlar olarak tanımlanan leptin (LEP), ghrelinin (GHRL) ve IGF-1 proteinlerini kodlayan genlerindeki bazı

polimorfik nükleotid bölgelerinin çeşitliliğinin PCR-RFLP yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvan materyali: Çalışmanın hayvan materyalini, Latin Amerika ülkelerinden fenotipik değerlendirme ile seçilerek ithal edilmiş ve Şanlıurfa'daki Harranova Tarım İşletmesi'nde besiye alındıktan sonra ortalama 16.7 aylık (± 2 ay) yaşta kesime sevk edilmiş toplam 405 baş erkek sığır oluşturmuştur. Çalışmaya Hereford (n=112), Angus (n=145), Charolais (n=54), Black Hereford (n=36), Brahman (n=24) ve Limousin (n=34) ırkına ait sığırlar dahil edilmiştir. Sığır karkaslarından numaralandırılarak et örnekleri alınmış ve soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir.

DNA izolasyonu: Sığır karkaslarından numaralandırılarak alınan et örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için Qiagen marka DNeasy Blood and Tissue kiti (cat. No. 69504 ve 69506) kullanılmıştır. İzolasyon işlemi üreticinin tavsiyelerine uygun olarak yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflığı spektrofotometre yardımıyla (Thermo Scientific Nanodrop ND-1000) sırasıyla 260 nm ve 260/280 nm dalga boyundaki ışık ile ölçülmüştür.

Araştırmaya konu olan lokusların hedef bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan primerler, PCR ürünlerinin kesimi için kullanılan enzimler ile kesimi yapılacak bölgenin fragment uzunlukları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Leptin: Leptin lokusunun hedef bölgesini çoğaltmak amacıyla kullanılan PCR işlemi 12.5 μ l reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon çözeltisi 1.25 μ l 10X Reaksiyon Buffer, 1.5 mM MgCl⁺⁺, her bir primerden 0.2 μ M, 0.625 U Taq polymerase, 0.1 mM dNTP karışımı, 1 μ l genomik DNA (50-100 ng/ μ l) olacak şekilde hazırlanmıştır. Sıcaklık protokolü olarak 94°C'de 2 dakika denatürasyonun ardından, 35 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 62°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama adımları uygulanmıştır. Son uzama adımı 72°C'de 5 dakika olacak şekilde uygulanmıştır. **Ghreltin:** Ghreltin lokusunun yükseltgenmesi için kullanılan PCR işlemi 25 μ l hacimde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon karışımı; 2.5 μ l 10X Reaksiyon Buffer, 2 mM MgCl⁺⁺, her bir primerden 0.4 μ M, 1.25 U Taq polymerase, 0.1 mM dNTP mix, 2 μ l DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Protokol olarak 94°C'de 5 dakika denatürasyonun ardından, 40 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama adımları uygulanmıştır. Son uzama adımı 72°C'de 5 dakika olacak şekilde

uygulanmıştır. **IGF-1:** IGF-1 lokusu için 12.5 μ l'lik PCR ürünü elde etmek amacıyla her bir örnek için reaksiyon çözeltisi 1.25 μ l 10X Reaksiyon Buffer, 1.5 mM MgCl⁺⁺, her bir primerden 0.2 μ M, Taq polymerase 0.625 U, dNTP mix 0.1 mM, 2 μ l genomik DNA ve 8.75 μ l nükleazsız su içerecek şekilde hazırlanmıştır. Protokol olarak 94°C'de 5 dakika denatürasyonun ardından, 40 döngü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 62°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama adımları uygulanmıştır. Son uzama adımı 72°C'de 5 dakika olacak şekilde uygulanmıştır.

Elde edilen PCR ürünlerinin spesifik enzimlerle kesimi amacıyla yapılan işlemler Tablo 2'de gösterilmiştir.

İstatistiksel analizler: Genotip sıklıkları doğrudan sayım ile belirlenmiştir. Allel sıklıkları ise AA+1/2AB Formülü ile hesaplanmıştır. Her bir ırkın Hardy-Weinberg denge durumu χ^2 testi ile kontrol edilmiştir.

Bulgular

Çalışmada kullanılan besi sığırı sürüsünde IGF-1 (AA, AB, BB) ve Leptin (CC, CT ve TT) lokusları yönünden üç farklı genotip gözlenirken, Ghreltin lokusu yönünden ise AA ve AG şeklinde iki genotip gözlenmiş, GG genotipi ise gözlenmemiştir (Şekil 1). Leptin, IGF-1 ve Ghreltin lokuslarında gözlenen genotip ve allel sıklıkları ile χ^2 test istatistiği sonuçları sırasıyla Tablo 3, 4 ve 5'te özetlenmiştir.

Tablo 3'teki veriler ışığında Leptin/PstI polimorfizmi yönünden bakıldığında sıklığı en yüksek genotip CT, sıklığı en düşük genotip ise TT olarak bulunmuş, C allelinin sıklığı 0.571 bulunurken T allelinin sıklığı 0.429 olarak tespit edilmiştir. IGF-1/SnaBI lokusunda ise sıklığı en yüksek genotip AB, en düşük genotip ise AA şeklinde bulunmuş olup B allelinin sıklığının (0.600) A allele göre (0.400) yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 4). Ghreltin/Bfal polimorfizmi yönünden ise A allelinin sıklığı yüksek bulunurken (0.938), G allel sıklığı ise oldukça düşük (0.062) bulunmuştur (Tablo 5). Ayrıca incelenen besi sığırı sürüsü IGF-1/SnaBI ve Ghreltin/Bfal polimorfizmleri yönünden Hardy-Weinberg dengesinde, Leptin/PstI polimorfizmi yönünden ise dengede olmadığı görülmüştür.

Angus, Hereford, Charolais, Black Hereford, Limousin ve Brahman ırklarının kendi içlerindeki Leptin/PstI, IGF-1/SnaBI ve Ghreltin/Bfal genotipleri ve allel sıklıkları ile χ^2 test istatistiği değerleri Tablo 3, 4 ve 5'te gösterilmiştir. Leptin lokusunda Angus, Charolais ve Black Hereford ırklarında sıklığı yüksek olan genotip CT şeklinde bulunurken, Hereford ve Limousin ırkında CC, Brahman ırkında ise TT olarak

Tablo 1. Çoğaltma işlemi için kullanılan primerler ve kesim enzimleri.

Gen	Primer	Enzim	Fragment Uzunluğu	Kaynak
Leptin	5'-GTGCCACGTGGTTTCTTCTGTT-3' 5'-GTTTTGGTGTCATCCTGGACCCTG-3'	PstI	155 bp	Gürses, (2010)
Ghrelin	5'- GTGGGGATCTTAAGTCCCTA -3' 5'- AGGGTGGGAGAACGGACAGGT -3'	Bfal	187 bp	Sherman ve ark., (2007)
IGF-1	5'- ATTACAAAGCTGCCTGCCCC -3' 5'- ACCTTACCGTATGAAAGGAATATACG T -3'	SnaBI	249 bp	Ge ve ark., (2001)

Tablo 2. Enzim ile kesimde uygulanan işlemler.

Enzim (Firma)	Toplam Hacim (µl)	Buffer	PCR Ürünü	İnkubasyon (°C/Saat)	İnaktivasyon
Bfal (NEB)	30	Cutsmart	10 µl	37/16	80°C'de 20 dakika
SnaBI (NEB)	30	Cutsmart	10 µl	37/1	80°C'de 20 dakika
PstI (Takara)	30	Buffer H	12 µl	37/1	1/10 10x Yükleme Çözeltisi

NEB: New England Biolabs.

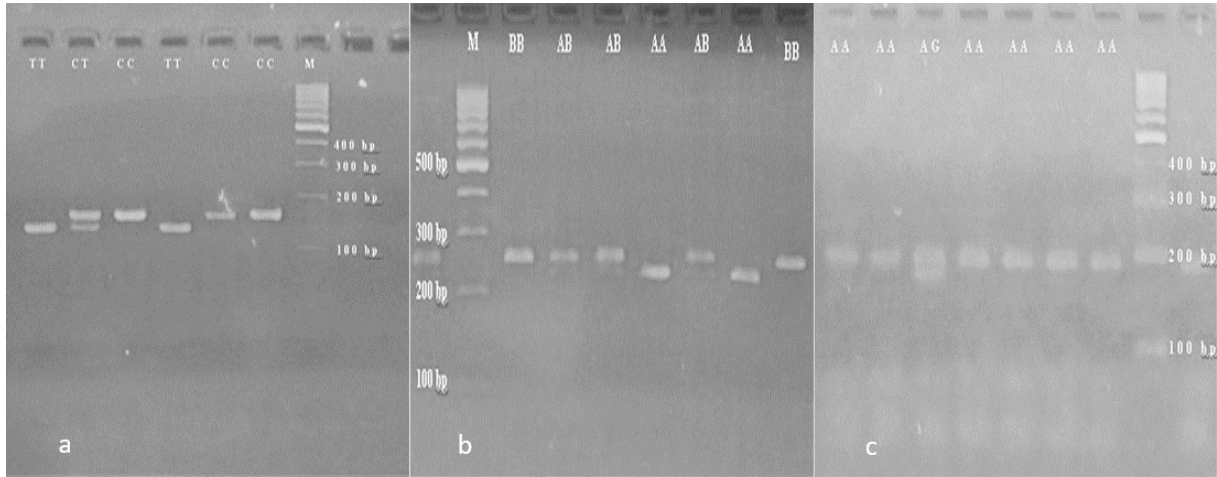
tespit edilmiştir. Brahman ırkı hariç tüm ırklarda C allelinin T alleleline göre yüksek sıklıkta olduğu görülmüştür (Tablo 3). IGF-1 lokusunda Angus, Hereford, Charolais ve Limousin ırklarında sıklığı en yüksek genotip AB, Black Hereford ırkında BB şeklinde bulunurken, Brahman ırkında ise BB ve AB şeklinde tespit edilmiştir. Tüm ırklarda B allelinin sıklığı daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4). Ghrelin/Bfal lokusunda incelen ırklar arasında AG genotipinin sıklığı oldukça düşük bulunurken GG genotipi gözlenmemiştir. Genotip sıklıkları ile uyumlu olarak G allelinin sıklığı çok düşük bulunmuştur (Tablo 5). Hardy-Weinberg denge durumlarına bakıldığında Angus ırkının tüm polimorfizmler yönünden dengede olduğu görülmüştür. Ayrıca Hereford ırkının IGF-1/SnaBI ve Leptin/PstI polimorfizleri yönünden, Charolais ve Black Hereford ırklarının IGF-1/SnaBI polimorfizmi yönünden, Limousin ırkının Leptin/PstI polimorfizmi yönünden ve Brahman ırkının ise Ghrelin/Bfal polimorfizmi yönünden dengede olmadığı görülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmaya 405 baş sığırdan alınan doku örnekleri dahil edilmiş olmakla birlikte her kan örneğinden elde edilen DNA'lardan hedef lokusun genotipleme yapılmadığından tablolarda verilen toplam n sayıları ile toplam örnek sayısı farklılık göstermiştir. Bu durum DNA konsantrasyonlarındaki farklılıktan kaynaklanmış olabilir. Leptin/PstI lokusunda Angus ırkında gözlenen allel sıklıkları, Trujillo ve ark. (2012) tarafından bildirilen verilerle benzerlik göstermekle

birlikte, Buchanan ve ark. (2002), Nkrumah ve ark. (2004) ve Schenkel ve ark. (2005) tarafından bildirilen allel sıklıklarından farklı bulunmuştur. Hereford ırkında bulunan allel sıklıkları (Tablo 3) ise, Buchanan ve ark. (2002), Nkrumah ve ark. (2004), Melucci ve ark. (2012) tarafından bildirilen allel sıklıklarından farklı, Kononof ve ark. (2005) tarafından bildirilen allel sıklıkları ile benzer bulunmuştur. Angus ve Hereford ırklarındaki bu farklılık sığırların farklı kaynaklardan temin edilmiş olmasından kaynaklanabilir. Literatürde Charolais ırkı için aynı lokusta C allelinin sıklığı 0.546 ile 0.660, T allelinin sıklığı ise 0.340 ile 0.454 arasında değişmektedir (Buchanan ve ark., 2002; Nkrumah ve ark., 2004; Schenkel ve ark., 2005). Sunulan çalışmada bu ırkta gözlenen allel sıklıkları literatürde bildirilen değerler arasındadır.

IGF-1 lokusunda AA, AB, BB genotiplerinin (Tablo 4) tüm ırklarda değişen sıklıklarda bulunduğu tespit edildi. Tüm ırklarda en yüksek sıklığa sahip genotip AB olarak bulunurken B allelinin sıklığının A allelinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Angus ırkında bulunan (A=0.405, B=0.595) allel sıklıkları, Rogberg-Muñoz ve ark. (2013) tarafından bildirilenlerle (A=0.445, B=0.555) benzerlik gösterirken, Ge ve ark. (2001) tarafından bildirilen allel sıklıklarından (A=0.639, B=0.361) farklı bulunmuştur. Hereford ırkında bu polimorfizmin allel sıklıklarının araştırıldığı bir çalışma bulunmamakla birlikte sunulan çalışmada Hereford ırkında görülen allel sıklıkları Curi ve ark. (2005)'in besi sığırlarında bulunduğu değerlerle (A=0.249, B=0.751) benzerdir.



Şekil 1. a) 155 bp'lik PCR ürünlerinin Leptin/*PstI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan genotipler, b) 249 bp'lik PCR ürünlerinin IGF-1/*SnaBI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan genotipler, c) 187 bp'lik PCR ürünlerinin Ghrelin/*Bfal* enzimi ile kesimi sonucu oluşan genotipler (%3'lük agaroz jel, M: 100bp DNA ladder).

Tablo 3. Leptin lokusunda gözlenen genotip ve allel sıklıkları.

İrklar	N	Genotip Sıklıkları			Allel Sıklıkları		P
		CC	CT	TT	C	T	
Angus	114	0.263	0.500	0.237	0.513	0.487	ns
Hereford	37	0.552	0.382	0.066	0.743	0.257	*
Charolais	51	0.382	0.472	0.146	0.618	0.382	ns
Black Hereford	9	0.333	0.444	0.222	0.556	0.333	ns
Limousin	30	0.433	0.267	0.300	0.567	0.450	*
Brahman	21	0.333	0.286	0.381	0.476	0.571	ns
Tümü	262	0.326	0.490	0.184	0.571	0.429	**

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: Önemsiz.

Tablo 4. IGF-1 lokusunda gözlenen genotip ve allel sıklıkları.

İrklar	N	Genotip Sıklıkları			Allel Sıklıkları		P
		AA	AB	BB	A	B	
Angus	105	0.164	0.482	0.354	0.405	0.595	ns
Hereford	85	0.112	0.446	0.442	0.335	0.665	**
Charolais	45	0.218	0.498	0.284	0.467	0.533	*
Black Hereford	29	0.379	0.207	0.414	0.483	0.517	**
Limousin	26	0.154	0.538	0.308	0.423	0.577	ns
Brahman	16	0.125	0.438	0.438	0.344	0.656	ns
Tümü	306	0.160	0.480	0.360	0.400	0.600	ns

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: Önemsiz.

Charolais ırkında görülen allel sıklıkları (A=0.467 ve B=0.533), Jeanmas ve ark. (2014) tarafından bildirilen ve içlerinde Charolais ırkının da bulunduğu besi sığırları melezlerindeki allel sıklıklarından (A=0.180, B=0.820) farklı bulunmuştur. Allel sıklıkları aynı ırkın farklı populasyonlarında da farklılık gösterebilmektedir.

Örneğin De la Rosa-Reyna ve ark. (2010) tarafından yürütülen bir araştırmada Charolais ırkının Coahuila populasyonundaki allel sıklıkları A=0.260, B=0.740 iken Nuevo León populasyonunda A=0.460, B=0.540 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada gözlenen allel sıklıkları Nuevo León sürüsünde gözlenenlere benzer bulunmuştur.

Tablo 5. Ghrelin lokusunda gözlenen genotip ve allel sıklıkları.

Irklar	N	Genotip Sıklıkları			Allel Sıklıkları		P
		AA	AG	GG	A	G	
Angus	119	0.865	0.135	0.000	0.929	0.071	ns
Hereford	83	0.885	0.115	0.000	0.940	0.060	ns
Charolais	44	0.912	0.088	0.000	0.955	0.045	ns
Black Hereford	21	0.857	0.143	0.000	0.929	0.071	ns
Limousin	24	0.833	0.167	0.000	0.917	0.083	ns
Brahman	21	0.952	0.048	0.000	0.976	0.024	*
Tümü	312	0.879	0.117	0.004	0.938	0.062	ns

*: P<0.05; **: P<0.01; ns: Önemsiz.

Ghrelin lokusunda incelenen ırklar arasında GG genotipi gözlenmezken, AG genotipinin sıklığı ise oldukça düşük tespit edildi. Bu bulgunun nedeni bu lokustaki G allelinin sıklığının oldukça düşük olmasıdır (Tablo 5). Bu çalışma ile benzer şekilde besi sığırları (Sherman ve ark., 2008) ile süt sığırlarında (Kowalewska-Łuczak ve ark., 2011) G allelinin sıklığının 0.070 ile 0.120 arasında değiştiği bildirilmiştir.

Hardy-Weinberg denge durumu açısından ırklar bir bütün olarak incelendiğinde leptin lokusu yönünden dengeden sapma (P<0.01) tespit edilmiştir (Tablo 3). İrk içindeki denge durumlarının da görüldüğü Tablo 3, 4 ve 5 değerlendirildiği zaman Hereford ve Limousin ırklarında (P<0.05) leptin lokusu yönünden, Hereford (P<0.01), Charolais (P<0.05) ve Black Hereford (P<0.01) ırklarında ise IGF-1 lokusu yönünden Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlenmiştir. Bu sapmaların sebebi çalışmada kullanılan örneklemin sınırlı sayıda olmasının yanında leptin lokusunun C ve T allellerinin (Kononoff ve ark., 2005; Cheong ve ark., 2006; Lusk, 2007; Schenkel ve ark., 2005) ve IGF-1 lokusunun A ve B allellerinin (Johnston ve ark., 2001; Ge ve ark., 2004; Curi ve ark., 2005) çeşitli verim özellikleriyle ilişkileri nedeniyle yürütülmüş olan seleksiyon olabilir.

Bunun dışında Ghrelin/Bfal polimorfizmi ile ilgili çalışmaların büyükbaş hayvan ıslahı ve yetiştiriciliğinde yeterince çalışmadığı ve G allelinin besi sığırlarında oldukça düşük sıklıkta (G=0.062) olduğu belirlenmiştir.

Leptin, ghrelin ve IGF-1 lokusları yönünden sürülerin Hardy-Weinberg denge durumu incelenmiş, leptin lokusu yönünden besi sığırları sürüsünde dengeden sapma (P<0.01) tespit edilmiştir. İrkların kendi içindeki denge durumlarına bakıldığında leptin gen lokusunun Hereford ve Limousin ırklarında (P<0.05), IGF-1 gen lokusunun Hereford (P<0.01), Charolais (P<0.05) ve Black Hereford (P<0.01) ırklarında Hardy-Weinberg

dengesinden saptığı görülmüştür. Bu sapmaların sebebi çalışmada kullanılan ırkların besi öncesinde besi performansları öngörülerek seçilmiş olmalarından kaynaklanabilir.

Teşekkür

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: BAP-697-176-2014).

Kaynaklar

- Akyüz B, Arslan K, Bayram D, Işcan KM, 2013: Allelic frequency of kappa-casein, growth hormone and prolactin gene in Holstein, Brown Swiss and Simmental cattle breeds in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(3), 439-444.
- Anton I, Kovács K, Holló G, Farkas V, Lehel L, Hajda Z, Zsolnai A, 2011: Effect of leptin, DGAT1 and TG gene polymorphisms on the intramuscular fat of Angus cattle in Hungary. *Livestock Science*, 135, 300-303.
- Buchanan FC, Fitzsimmons CJ, Van Kessel AG, Thue TD, Winkelman-Sim DC, Schmutz SM, 2002: Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, 34(1), 105-116.
- Cheong HS, Yoon D, Kim LH, Park BL, Chung ER, Lee HJ, Shin HD, 2006: Leptin polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(11), 1529.
- Colinet FG, Portetelle D, Renaville R, 2009: Short Communication: Molecular characterization of the bovine GHRL gene. *Archiv Tierzucht*, 52 (1), 79-84.
- Curi RA, De Oliveira HN, Silveira AC, Lopes CR, 2005: Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in

- beef cattle. *Livestock Production Science*, 94(3), 159-167.
- Curi RA, Krauskopf MM, Hadlich JC, Fortes MRS, Vankan DM, Silva JAI, Mota MDSD, 2012: Candidate SNPs for carcass and meat traits in Nelore animals and in their crosses with *Bos taurus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(2), 294-301.
- Daughaday WH, Rotwein P, 1989: Insulin-like growth factors I and II peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Reviews*, 10(1), 68-91.
- De la Rosa Reyna XF, Montoya HM, Castrellón VV, Rincón AMS, Bracamonte MP, Vera WA, 2010: Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet Mol Res*, 9(2), 875-883.
- Eken M, 2010: Güney Anadolu Kırmızısı ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırkı sığırlarda büyüme hormonu salgılatıcı hormonu ve reseptörü genlerinin polimorfizmlerinin belirlenmesi. Doktora tezi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RC, 2001: Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 79(7), 1757-1762.
- Gil FMM, de Camargo GMF, de Souza FP, Cardoso DF, Fonseca PDS, Zetouni L, Tonhati H, 2013: Polymorphisms in the ghrelin gene and their associations with milk yield and quality in water buffaloes. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3326-3331.
- Gurses M, Yuce H, 2012: Determination of kappa casein gene polymorphisms and their effects on milk composition in some native cattle breeds of Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(7), 1023-1027.
- Gürses M, 2010: Bazı kültür ve yerli sığır ırklarında leptin geni polimorfizmlerinin belirlenmesi ve süt verimi ile bileşimi üzerine etkileri. Doktora tezi, FÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Jeanmas A, Sopannarath P, Tumwasorn S, Loongyai W, 2014: Association of SNP marker in the IGF1 gene with carcass traits in crossbred cattle among Thai Native, Brahman and Charolais. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 48, 605-610.
- Johnston DJ, Herd R, Reverter A, Oddy VH, 2001: Heritability of IGF-I in beef cattle and its association with growth and carcass traits. In Proc. Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, 14, 163-166.
- Kaplan S, 2010: Yerli anadolu mandalarında ve esmer sığırlarda PCR-RFLP yöntemi ile prolaktin geni polimorfizminin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, SÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW, 1997: A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7(3), 235-249.
- Kononoff PJ, Deobald HM, Stewart EL, Laycock AD, Marquess FLS, 2005: The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83(4), 927-932.
- Kowalewska-Łuczak I, Szembek M, Kulig H, 2012: Ghrelin gene polymorphism in dairy cattle. *Journal of Central European Agriculture*, 12(4), 737-744.
- Lusk JL, 2007: Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with body weight and backfat growth curve parameters for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 85(8), 1865-1872.
- Melucci LM, Panarace M, Feula P, Villarreal EL, Grigioni G, Carduza F, Corva PM, 2012: Genetic and management factors affecting beef quality in grazing Hereford steers. *Meat Science*, 92(4), 768-774.
- Nkrumah JD, Li C, Basarab JB, Guercio S, Meng Y, Murdoch B, Moore SS, 2004: Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behavior, carcass quality and body composition. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(2), 211-219.
- Nobari K, Ghazanfari S, Nassiry MR, Tahmoorespur M, Jorjani E, 2010: Relationship between leptin gene polymorphism with economical traits in Iranian Sistani and Brown Swiss Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(22), 2807-2810.
- Öner Y, Pullu M, Akin O, Elmaci C, 2011: Bursa bölgesinde yetiştirilen İsviçre Esmeri ve Siyah Alaca ırkı sığırlarda beta laktoglobulin (β -lg) ve büyüme hormonu (bGH) gen polimorfizmlerinin HaellIII ve MspI restriksiyon enzimleri kullanılarak incelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(3), 371-376.
- Pomp D, Zou T, Clutter AC, Barendse W, 1997: Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science*, 75(5), 1427.
- Rogberg-Muñoz A, Cantet RJ, Fernández ME, Lirón JP, Prando A, Birchmeier AN, Giovambattista G, 2013: Longitudinal analysis of the effects of IGF1-SnaBI genotypes on the growth curve of Angus bull calves. *Livestock Science*, 154(1), 55-59.
- Schenkel FS, Miller SP, Ye X, Moore SS, Nkrumah JD, Li C, Williams JL, 2005: Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83(9), 2009-2020.
- Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, Moore SS, 2008: Polymorphisms and haplotypes in the bovine NPY, GHR, GHRL, IGF2, UCP2, and UCP3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency and carcass merit in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 86(1), 1-16.
- Siadkowska E, Zwierzchowski L, Oprzadek J, Strzalkowska N, Bagnicka E, Krzyzewski J, 2006: Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 24(3), 225-37.

- Taniguchi Y, Itoh T, Yamada T, Sasaki Y, 2002: Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. *IUBMB Life*, 53(2), 131-135.
- Trujillo AI, Peñagaricano F, Grignola MP, Nicolini P, Casal A, Espasandín AC, Chilibröste P, 2012: Using high resolution melting analysis to identify variation of NPY, LEP and IGF-1 genes in Angus cattle. *Livestock Science*, 146(2), 193-198.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, 1994: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

**Bu araştırma makalesi "Leptin, Ghrelin ve IGF-1 Gen Polimorfizmlerinin Etçi Sığır Irklarında Besi Performansı, Bazı Karkas Özellikleri ve Et Kalitesi Üzerine Etkisi" isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

***Yazışma Adresi:** Aydın DAŞ
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı, Şanlıurfa - Türkiye.
e-mail: adas@harran.edu.tr