

YERLİ KOYUN IRKLARINDA MYOSTATİN GENİ

POLİMORFİZMİ

Esra Betül UĞUZ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Tez No: 2022 - 036

Eylül, 2022

Afyonkarahisar

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YERLİ KOYUN IRKLARINDA MYOSTATİN GENİ
POLİMORFİZMİ**

Hazırlayan
Esra Betül UĞUZ

Danışman
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Tez No: 2022 - 036

AFYONKARAHİSAR

2022

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

29/09/2022

Esra Betül UĞUZ

ÖZET

YERLİ KOYUN IRKLARINDA MYOSTATİN GENİ POLİMORFİZMİ

Koyun önemli bir et ve yün kaynağı olduğundan gelişmekte olan ülkelerde koyun verimliliği çok önemlidir. Büyüme ve farklılaşma faktörü 8 (GDF8) olarak da bilinen myostatinin (MSTN), iskelet kası gelişimi sırasında miyogenezin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı bildirilmiştir. Myostatin genindeki (MSTN) varyasyon, belirli koyun ırklarında kaslılıktaki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma, yerli koyun ırklarında MSTN genindeki g+6723 varyasyonunun ve varyantların büyüme özellikleri ile ilişkisini araştırmayı amaçlamaktadır. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoloji ve Genetik laboratuvarında çalışılan 556904 numaralı tez çalışması için toplanılan yerli koyun ırklarından toplam 111 hayvandan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve MSTN'deki g+6723 varyasyonunun varlığı BseGI restriksiyon enzimi kullanılarak, PCR-RFLP yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda yerel koyun ırklarının hiçbirinde myostatin geni g+6723 polimorfizmine rastlanılmamıştır. MSTN lokusu çalışılan koyun ırklarında Hardy-Weinberg dengesinde değildir ve myostatin geninin çift kaslılık üzerinde anlamlı bir etkisi yoktur.

Anahtar kelimeler: Koyun, Myostatin, Polimorfizm, Yerli ırk

SUMMARY

MYOSTATIN GENE POLYMORPHISM IN LOCAL SHEEP BREEDS

Sheep productivity is crucial in developing countries as sheep are an important source of meat and wool. It has been reported that myostatin (MSTN), also known as growth and differentiation factor 8 (GDF8), functions as a negative regulator of myogenesis during the growth of skeletal muscle. Different levels of muscle development in various sheep breeds have been linked to variations in the myostatin gene (MSTN). This study aims to investigate the relationship between the g+6723 variation in the MSTN gene and the association of variants with growth traits in local heep breeds collected for the thesis study number 556904, which was studied in Afyon Kocatepe University, Institute of Health Sciences, Medical Biology and Genetics laboratory. DNA isolation was made a blood samples taken from a total number of 111 animals from local sheep breeds, and the presence of g+6723 variation in MSTN was investigated by PCR-RFLP method using BseGI restriction enzyme. As a result of the studies, myostatin gene g+6723 polymorphism was not found in any of the local sheep breeds. MSTN locus in studied sheep breeds was not in Hardy-Weinberg equilibrium, and there was no significant effect of myostatin gene on yearling weights.

Keywords: Sheep, Myostatin, Polymorphism, Local breed

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana daima destek olan, bu konuda çalışma fırsatını verip bilgi sahibi olmamı sağlayan, titizlikle yöneten, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Cevdet UĞUZ ‘a,

Hem laboratuvar aşamasında hem de tez yazım aşamasında her daim yardımlarını ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Metin ERDOĞAN’ a, çalışmalarımnda her türlü imkan ve yardımlarını esirgemeyen bölüm hocalarıma,

Tez çalışmalarının gerçekleşmesinde sağladığı katkıdan dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)’ne

Hem laboratuvar aşamasında hem de tez yazım aşamasında her daim yardımlarını ve desteğini gösteren arkadaşlarım Arş. Gör. Eda DEMİRTAŞ ve Minenur KALYONCU’ ya,

Tez sürecim boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Rukiye DİKMEN, Elif BULAT, Arzu GÜNEŞ, Seda DERE İŞSEVEN, Kıymet AKINCI ve Süleyman BOZKURT’ a,

Tez dönemim dahil tüm hayatım boyunca beni hep destekleyen, hep yanımda olan ve beni bugünlere getiren çok kıymetli annem Halime UĞUZ, babam Sadık UĞUZ ‘a tüm kalbimle, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu çalışmada bana yardımcı olan ve adlarını burada tek tek belirlemediğim, emeği geçen herkese teşekkür eder, Türkiye hayvancılığına katkı sağlayacağı düşüncesi ile saygılar sunarım.

Esra Betül UĞUZ

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
SUMMARY	ii
ÖNSÖZ SAYFASI	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
ÇİZELGELER	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Türkiye’de Hayvancılık	2
1.2. Et Verimi	4
1.2.1. Doğum öncesi kas büyümesi ve gelişimi	5
1.2.2. Doğum sonrası kas büyümesi ve gelişimi	6
1.3. Çift Kaslılık ve Çift Kaslı Hayvanların Karkas Özellikleri	7
1.4. Çift Kaslılığın Genetiği	8
1.5. Myostatin Geni (Çift Kaslılık)	8
1.5.1. Myostatin’in yapısı ve proteolitik işlenmesi	11
1.5.2. Myostatin’in hücre dışı düzenlenmesi ve sinyal mekanizmaları	12
1.5.3. Myostatin’in miyoblast proliferasyon ve farklılaşmasındaki rolü	13
1.5.4. Koyunlarda myostatin genindeki polimorfizmler	14
2. MATERYAL ve METOT	17
2.1. Materyal	17
2.2. Metot	18
2.2.1. DNA izolasyonu	19
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
2.2.3. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)	20
3. BULGULAR	21
3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	21
3.2. Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Sonuçları	22
4. TARTIŞMA	23

5. SONUÇ ve ÖNERİLER	25
6. KAYNAKLAR	26
7. EKLER	30
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	30
ÖZGEÇMİŞ	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

GDF 8: Büyüme ve farklılaşma faktörü 8

MSTN: Myostatin

BAP: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü- β

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

MYOG: Miyogenin

MRF4: Kas düzenleyici faktör 4

Lep: Leptin

Ghr: Büyüme hormonu reseptör geni

SP: Sinyal peptidi

ACVR2A/ 2B: Aktivin reseptör tip 2

ALK4: Aktivin reseptör benzeri kinaz 4

MyoD: Miyojenik farklılaşma 1

Myf5: Miyojenik faktör 5

Rb: Retinoblastoma

NZ: Yeni Zelanda

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

AKUHADYEK: Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 1.1: Türkiye 2021 yılı kırmızı et üretim (ton) oranları	3
Şekil 1.2: Embriyonik iskelet kası oluşumunda yer alan fizyolojik mekanizmaların şematik gösterimi	5
Şekil 1.3: Texel çift kaslı koyunların fenotipi	7
Şekil 1.4: Myostatin promotör sekansının koyun (AY918121), keçi (AY827576), sığır (AJ438578), domuz (AY527153), insan (AX058992) ve fare (AY20490) arasında karşılaştırması	10
Şekil 1.5: Myostatinin proteolitik işlenmesi	11
Şekil 1.6: MSTN'nin hücre dışı düzenlenmesi ve sinyal mekanizmaları	12
Şekil 1.7: Miyoblast proliferasyonu ve farklılaşmasında myostatin etkisi	14
Şekil 3.1: Sakız ırkına ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri	21
Şekil 3.2: BseGI enzimi ile kesim sonucu elde edilen genotipler (M; Marker, 1-12; örnekler)	22

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1: Koyunlarda myostatin genindeki polimorfizmler	16
Çizelge 2.1: Kullanılan cihaz ve malzemeler	17
Çizelge 2.2: Kullanılan kimyasal maddeler	18
Çizelge 2.3: Araştırmada kullanılan koyun ırk ve sayıları	18
Çizelge 2.4: Myostatin geni için bağlanma sıcaklığı	19
Çizelge 2.5: PCR inkübasyon koşulları	20

1. GİRİŞ

İnsan diyetinde hayvansal ve bitkisel proteinlerin vücuda dengeli ve yeterli alınması oldukça önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı verilere göre sağlıklı bir insanın günlük protein ihtiyacı vücut ağırlığı (kilogram) başına 1 gramdır ve bu miktarın %42'sinin hayvansal kaynaklı olması gerekmektedir. Dünya nüfusunun hızla artmasıyla gıda ihtiyacı artmakta, arz-talep dengesi olumsuz etkilenmektedir. Tarımsal alanların sınırlılığı, hayvansal kökenli gıda alımının olumsuz etkilenmesi her bir hayvandan daha fazla verim elde etmeyi gerekli kılmıştır.

Hayvansal proteinler bakımından en verimli ve benimsenen besin kaynağı kırmızı ettir. Bu sebeple etin üretim miktarının, kalitesinin ve veriminin artırılması oldukça önemlidir. Et üretimi açısından en verimli hayvanlar, doğum sonrası kas büyüme döneminde hızlı ve minimum yağ birikimi ile kilo alan ve olgun vücut büyüklüğüne ulaşan hayvanlardır. Bu nedenle, hem kas büyümesini ve gelişimini anlayabilmek hem de üretimi iyileştirmek için süreçleri kontrol etmek önemlidir. Hem doğum öncesi hem de doğum sonrası kas gelişimi sırasında kas lifi sayısı ve boyutu kısmen hayvanın genetik yapısı tarafından belirlendiğinden, kas biyolojisinin genetiğinin daha iyi anlaşılması et veriminin artırılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir.

Son yıllarda bazı hayvan türlerinde et kalitesiyle ilişkili potansiyel genleri ve kromozom bölgelerini bulmak için çeşitli araştırmalar yapılmış ve et verimini etkileyen majör genler tanımlanmıştır.

Myostatin (MSTN) çiftlik hayvanlarında et kalitesiyle ilişkilendirilen, kas gelişimini negatif yönde düzenleyen, "çift kaslılık" fenotipinden sorumlu gendir. İskelet kası ana düzenleyicilerinden, büyüme ve farklılaşma faktörü 8 (GDF8) olarak da bilinen MSTN, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesine aittir. Doğum öncesi kas gelişimi sürecinde kas öncüsü proliferasyonu, miyoblast proliferasyonu ve farklılaşması gibi kilit noktalarda kas gelişimini düzenlemektedir.

Koyun (*Ovis aries*) genomunun 2. kromozom uzun kolun sonunda (2q32.2 lokusu) yer alan ve myostatin geninde oluşan tek nükleotid mutasyonu çift kaslılık fenotipinin görülmesine neden olmakta ve birim hayvandan daha çok ve sağlıklı ürün üretilmesine katkı sağlamaktadır.

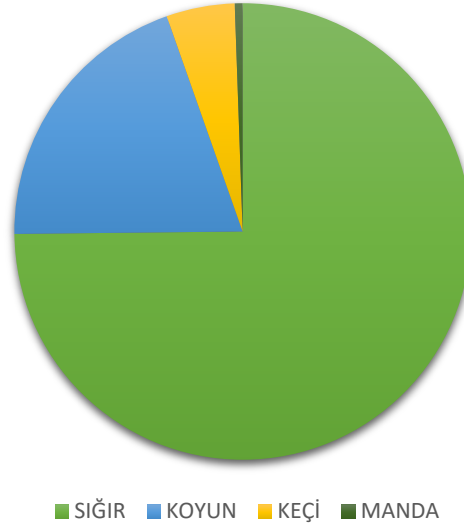
Bu çalışmanın amacı Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoloji ve Genetik laboratuvarında çalışılan 556904 numaralı tez çalışması için toplanılan yerli koyun ırklarındaki myostatin geninin polimorfizm yönünden genetik karakterizasyonu, polimorfik allellerin ırka özgü olup olmadıklarının belirlenmesi ve myostatin genindeki polimorfizmin et verimiyle ilişkisinin araştırılmasıdır.

Türkiye’de myostatin geni polimorfizmine özgü çalışma sayısı oldukça azdır. Bu sebeple bu tez çalışması yerli koyun ırklarındaki genetik varyasyonu ortaya koyacak ve myostatinin et verimiyle ilişkisini açıklamada literatüre katkıda bulunacaktır.

1.1. Türkiye’de Hayvancılık

Hayvancılık sektörü dünyada olduğu gibi Türkiye’de de genel ülke ekonomisi ve tarım sektöründe oldukça önemli bir yere sahiptir. Hızla çoğalan dengeli ve yeterli beslenmesinde, sanayi hammaddesi olarak kullanılmasında ve kırsal kalkınmanın iyileştirilmesinde stratejik bir önemi vardır (Vural vd., 2007, At vd., 2015).

Doğal kaynaklar ve ekolojik koşullar bakımından Türkiye, büyükbaş ve küçükbaş hayvan yetiştiriciliği için uygun şartlara sahiptir (Turan vd., 2017). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)’in istatistiklerine göre 2021 yılında üretilen etin; 74,8%’i sığırdan, 19,8%’i koyundan, 4,8%’i keçi ve 0,6%’sı mandadan sağlanmaktadır (Şekil 1) (İnt. Kay. 1).



Şekil 1.1: Türkiye 2021 yılı kırmızı et üretim (ton) oranları (İnt. Kyn. 1)

Sığırların yüksek süt verimine sahip olması, kaba ve kesif yemleri yüksek miktarda et ve süte dönüştürmeleri, farklı iklim koşullarına uyum sağlaması gibi başlıca avantajlar sebebiyle Türkiye büyükbaş hayvan varlığının ve et üretiminin tamamına yakını sığır popülasyonu oluşturmaktadır.

Küçükbaş hayvancılıkta ise mera alanları, doğal bitki örtüsü, coğrafi özellikleri, kültürel ve sosyo-ekonomik yapısı itibariyle ülkemiz koyun ve keçi yetiştiriciliğine oldukça uygundur. Hali hazırdaki meralardaki bitki örtüsü büyükbaş hayvanların beslenmesine uygun olmadığından mera alanlarının kullanımında küçükbaş hayvanların yetiştirilmesine öncelik sağlanmaktadır. Koyun, keçi gibi küçükbaş hayvanlar, bitkisel üretime uygun olmayan, mera, anız gibi ürünleri et, süt, yapağı, deri, gübre gibi ürünlere dönüştürebildiklerinden hayvancılık sektöründe önemli yere sahiptir (Ergun vd., 2021).

Hayvansal ürünler aynı zamanda insan beslenmesinde oldukça önemli yere sahiptir. İnsan diyetinde hayvansal ve bitkisel proteinlerin vücuda dengeli ve yeterli alınması oldukça önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı verilere göre sağlıklı bir insanın günlük protein ihtiyacı vücut ağırlığı (kilogram) başına 1 gramdır ve bu miktarın %42'sinin hayvansal kaynaklı olması gerekmektedir (TİGEM, 2020) (Gürer, 2021).

Hayvansal proteinler bakımından en verimli ve benimsenen besin kaynağı kırmızı ettir (Akçapınar ve Özbeyaz, 1999)(Yayvan ve Özkul 2018). Türkiye'deki toplam et üretiminin %17,05'i, toplam kırmızı et üretiminin ise %42,48'i koyun ve kuzudan elde edilmektedir (Anonim, 2005).

Türkiye koyun popülasyonu bakımından dünya ülkeleri arasındadır. Ancak hayvan başına elde edilen verim düzeyi düşük olduğundan kişi başı üretim düzeyi yönünden geri plandadır. Bu duruma bakıldığında Türkiye'de yüksek döl verimine sahip, et bakımından verimli koyunların yetiştirilmesi et üretimi ve kalitesinin artırılması açısından önemlidir (Ünal ve Yakan, 2008).

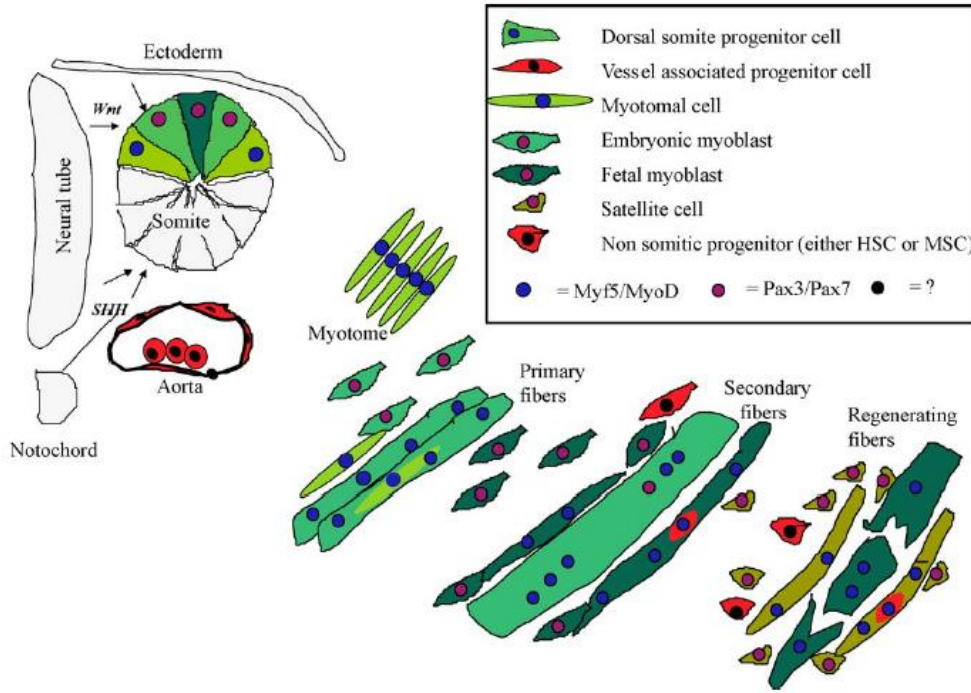
1.2. Et Verimi

Et; iskelet kası, bağ dokusu ve yağdan oluşur (Lawrie ve Ledward, 2008). İskelet kaslarının temel bileşeni kas lifleridir ve bunlar bağ dokusu ile çevrilidir. Kas kütlesi büyük ölçüde kas liflerinin sayısı ve boyutu ile belirlenir. Kas, tipik olarak çiftlik hayvanlarının yağsız vücut ağırlığının %40' ından fazlasını oluşturduğundan, kas büyümesini ve gelişimini belirleyen temel fizyolojik mekanizmaları anlamak önemlidir.

Et üretimi açısından en verimli hayvanlar, doğum sonrası kas büyüme döneminde hızlı ve minimum yağ birikimi ile kilo alan ve olgun vücut büyüklüğüne ulaşan hayvanlardır. Bu nedenle, hem kas büyümesini ve gelişimini anlayabilmek hem de üretimi iyileştirmek için süreçleri kontrol etmek önemlidir. Hem doğum öncesi hem de doğum sonrası kas gelişimi sırasında kas lifi sayısı ve boyutu kısmen hayvanın genetik yapısı tarafından belirlendiğinden, kas biyolojisinin genetiğinin daha iyi anlaşılması et veriminin artırılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir.

1.2.1. Doğum öncesi kas büyümesi ve gelişimi

Kasın embriyonik gelişimi sırasında somit kökenli mezodermden türetilen miyojenik öncü hücrelerden miyoblastlar gelişir. Kasa özel bazik sarmal-ilmek-sarmal (bHLH) transkripsiyon aktivatörleri MyoD ve/veya Myf5'in yukarı regülasyonu (up-regulation) mezodermal öncü hücrelerin miyojenik farklılaşması için gereklidir. Farklılaşma sinyallerine yanıt olarak, bHLH ailesine ait olan miyogenin (MYOG) ve kas düzenleyici faktör 4 (MRF4), miyoblast farklılaşmasına yardımcı olur (Cossu ve Biressi 2005). Tek çekirdekli miyositler birleşerek çok çekirdekli miyotüpleri, miyotüpler de olgunlaşarak kas liflerini oluşturur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Embriyonik iskelet kası oluşumunda yer alan fizyolojik mekanizmaların şematik gösterimi (Cossu ve Biressi 2005). Somit kökenli miyojenik hücreler yeşilin farklı tonlarıyla, kök progenitör hücreler kırmızıyla nükleer transkripsiyon faktörleri farklı renklerle gösterilmiştir.

Kas lifi sayısını belirleyen son aşama, çoğalan miyoblastların birincil ve ikincil miyotüpler ve miyofibriller halinde terminal farklılaşması ve füzyonu sırasında meydana gelir (Schiaffino ve Reggiani 1996). Heterojen miyoblast popülasyonları, ayrı ayrı, ardışık kas lifleri nesillerine yol açar. Bu nedenle, doğum öncesi kas lifi sayısındaki (hiperplazi) bir artış, kasların boyutunun en önemli belirleyicisidir.

1.2.2. Doğum sonrası kas büyümesi ve gelişimi

Doğum sonrası iskelet kasındaki artışlar kas lifi boyutundaki artıştan (hipertrofi) kaynaklanmaktadır. Kas liflerinin sayısı doğum sonrası kas büyümesinin miktarını büyük ölçüde belirlemesine rağmen, doğum sonrası kas büyümesinde kas liflerinin toplam sayısı aynı kalır (Wegner vd., 2000).

Et üretimi bağlamında en verimli hayvanlar, doğum sonrası kas büyüme döneminde hızlı bir şekilde ve minimum yağ birikimi ile kilo alan ve olgun vücut büyüklüğüne ulaşan hayvanlardır. Bu nedenle hem kas büyümesini ve gelişimini anlayabilmek hem de üretimi iyileştirmek için fetal kas lifi sayısının artırılması oldukça önemlidir. Hem doğum öncesi hem de doğum sonrası kas gelişimi sırasında kas lifi sayısı ve boyutu kısmen hayvanın genetik yapısı tarafından belirlendiğinden, kas biyolojisinin genetiğinin daha iyi anlaşılması et üretiminde veriminin artmasına sebep olacaktır.

Son yıllarda, sığır, koyun, tavuk dahil olmak üzere farklı çiftlik hayvanlarında et kalitesiyle ilişkili potansiyel genleri veya kromozom bölgelerini bulmak için bu alanda birçok araştırma yapılmıştır (Dehnavi 2012). Bazı hayvan türlerinde et verimini etkileyen majör genler tespit edilmiştir (Yayvan vd., 2018). Koyunlarda et verimi üzerinde etkili callipyge geni (Cockett vd., 1993), Belçika Texel koyunlarında çift kaslılık (double muscling) geni (Marcq vd., 2002), Avustralya Poll Dorset koyununda carvell geni (Banks, 1997), kalpastatin geni, weaver geni, leptin (Lep), growth hormon reseptör geni (Ghr) ve pituitary-spesifik transkripsiyon faktör geni domuzlarda etin kalitesi ve veriminde önemli etkisi olan halotan duyarlılık ve rendement napole genleri (Archibald ve Imlah, 1985; Le Roy vd., 1990) bunlara örnektir.

1.3. Çift Kahlık ve ift Kahlı Hayvanların Karkas zellikleri

Hayvanlar kaslarının yapısına ve kas kütlesinin derecesine bağlı olarak çift kahlı (muskuler hipertrofi veya double muscling, kasların hiperplazisi şeklinde) olarak tanımlanmaktadır. Kas değerlendirmesi, kas aralarındaki olukların durumu, leğen kemiğinin eğimi ve leğen kemiğine bağlı diğer parçaların durumu gibi karakteristik özelliklere bakılarak yapılmaktadır (Arthur, 1995).

Çift kahlı hayvanlar normal özellikteki hayvanlara göre birçok karkas özelliği barındırır. Bunlar genellikle kas hipertrofisi, kasların olgunluğu, yağ birikmesinde azalmış potansiyel ve küçük sindirim kanallarının olmasından kaynaklanmaktadır. Bugüne kadar yayınlanan çalışmaların çoğunda çift kahlılık karkaslarında kas ve deri oranının yüksek, yağ ve kemik oranının ise düşük olduğu belirtilmiştir (z, 2009).



şekil 1.3: Texel ift kahlı koyunların fenotipi (Miar vd., 2014)

1.4. Çift Kaslılığın Genetiği

Culley'in (1807) ilk olarak sığırlarda gösterdiği çift kaslılığı Kaiser 1888'de ayrıntılı olarak tanımlamıştır. 1929 yılında Wriedt, çift kaslılığın genetik belirleyicisinin tek bir gen olduğunu ileri sürmüştür. Yıllar boyunca bu konuda çalışmalar yapılmış ve birçok model önerilmiştir (Wriedt, 1929; Kronacher, 1934; Sopena Quesada ve Blanco Cachafeiro, 1971). Ancak tüm bu çalışmalar neticesinde çift kaslılığın otozomal, majör tek bir genin kalıtımı sonucu ortaya çıktığı konusunda uzlaşmıştır. Çift kaslılık genetiği üzerine ortak görüş 'single major gen modeli' kabullenilmesine rağmen bu genin etki mekanizması üzerinde farklı görüşler vardır. Bir grup bilim insanı, myostatin geninin dominant karakterli, diğer grup ise resesif karakterli olduğunu savunmaktadır (Hanset ve Michaux, 1985a, 1985b; Arthur, 1995). Fakat bu mekanizma için farklı görüşler de (kısmi dominantlık, eksik resesiflik vb.) bulunmaktadır.

Hayvanlarda et verimi ve kalitesini arttırmak için çift kaslılık fenotipiyle ilişkili myostatin geninin ve bu genin etki mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir.

1.5. Myostatin Geni (Çift Kaslılık)

Myostatin (MSTN) çiftlik hayvanlarında et kalitesiyle ilişkilendirilen, bir genetik belirteç olarak kullanılmak üzere hedeflenen, myostatin proteininin üretiminden sorumlu, kas gelişimini negatif yönde düzenleyen, "çift kaslılık" fenotipinden sorumlu gendir (McPherron & Lee, 1997) (Kambadur vd., 1997).

İskelet kası ana düzenleyicilerinden, büyüme ve farklılaşma faktörü 8 (GDF8) olarak da bilinen MSTN, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) süper ailesine aittir (Aiello vd., 2018, McPherron ve Lee, 1997). Bu süper aile, yetişkin hayvanlarda embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve doku homeostazının korunmasında önemli roller oynayan çok sayıda büyüme ve farklılaşma faktörünü kapsar (Hickford vd., 2010). Hücre bölünmesini pozitif veya negatif yönde düzenlemektedir. Myostatin

geninin iskelet kaslarında gelişmeye katkı sağladığı il kez farelerde gösterilmiştir (Yayvan ve Özkul 2018).

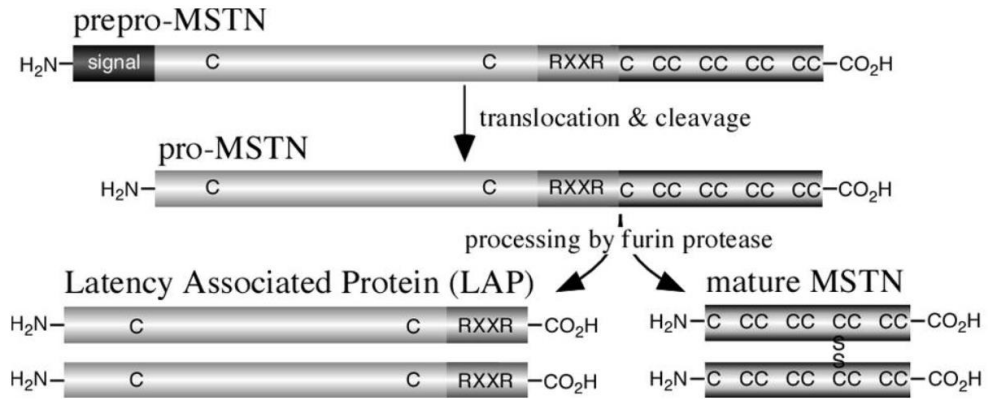
Farelerde kromozom 1 (C1.1) (McPherron ve Lee, 1997), insanlarda kromozom 2 (2q32.2) (Schuelke vd., 2004), sığırlarda kromozom 2 (2q14-q15) (Grobet vd., 2003), koyunlarda kromozom 2 (Clop vd., 2006), domuzlarda kromozom 15 (Sonstegard vd., 1998) ve atlarda kromozom 18 (Lowe ve Eddy, 1997) üzerinde yer aldığı bulunmuştur.

Du vd., 2005'te yayınladıkları çalışmada 1.211 kb myostatin promotör dizisinin NCBI ve DNAMAN yazılımı ile hizalama analizinde; koyun ve keçi (AY827576), sığır (AJ438578), domuz (AY527153), insan (AX058992) ve farede (AY204900) myostatin geni yukarı akış (upstream) bölgeleri arasındaki benzerlik sırasıyla %98,1, 95,8, 86,9, 80,2 ve %67,7 olarak bulunmuştur (Şekil 1.4) . Bu sonuçlar evrimsel süreçte myostatin geninin yüksek derecede korunduğunu göstermektedir (Du vd., 2005).

1.5.1. Myostatin'nin yapısı ve proteolitik işlenmesi

MSTN, iskelet kasında birincil olarak 375 aminoasitlik bir pro-peptid olarak sentezlenen homodimerdir (Grochowska 2020, Miar vd., 2014). Pro-peptidin bir salgılama sinyal peptidi (SP), bir pro-peptid pro-proteolitik işleme bölgesi ve türler arasında yüksek oranda korunan bir karboksi-terminal aktif peptidi vardır.

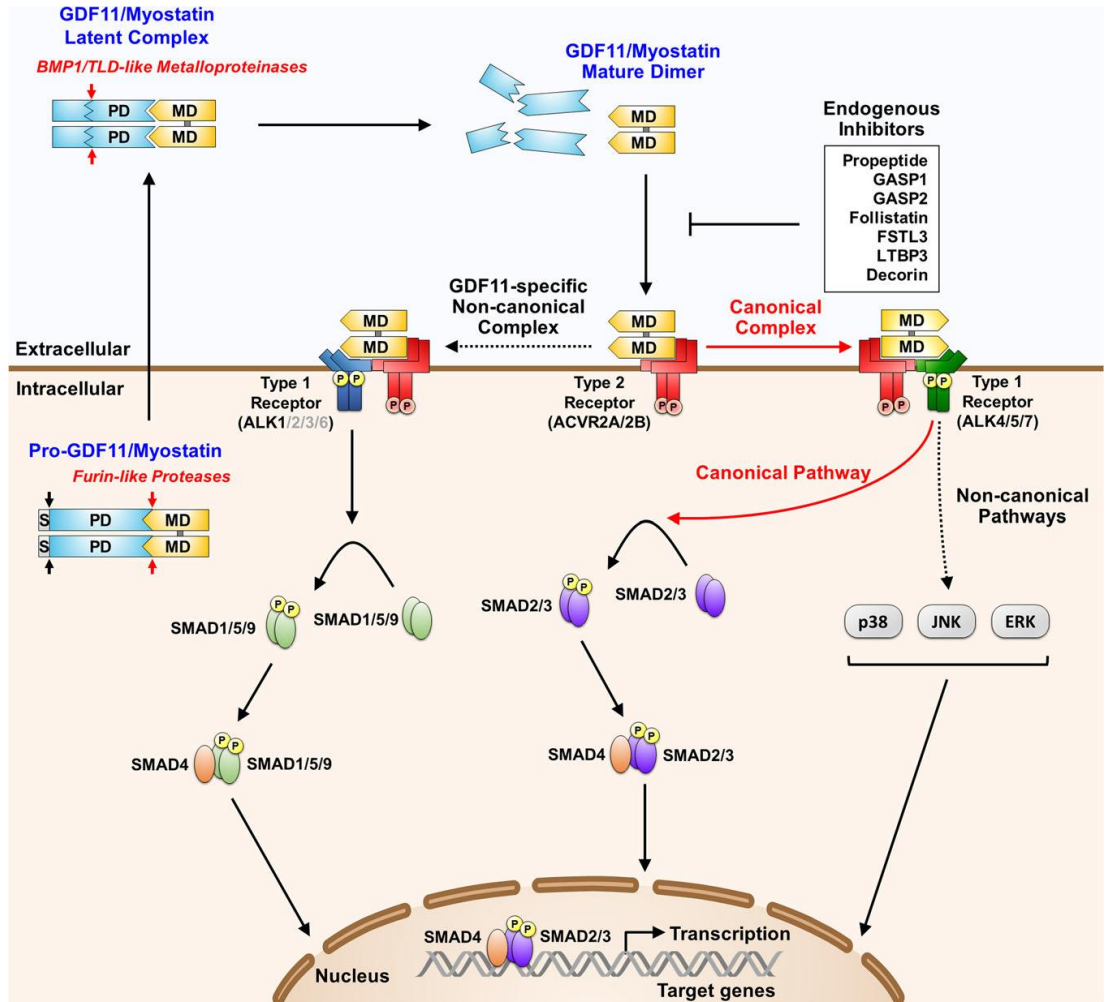
MSTN, TGF- β ailesinin diğer üyeleri gibi, başlangıçta öncü protein olarak sentezlenir. Biyolojik olarak aktif olgun ligandlar üretmek için proteazlar tarafından bölünür. Sinyal peptitlerinin sinyal peptidazları tarafından çıkarılmasının ardından furin benzeri proteazlar (furin-like proteases) tarafından RSRR rezidüleri tanınarak parçalanır. Parçalanma sonunda N-terminal propeptitleri ve 12kDa'luk C-terminal olgun peptitler oluşur (Şekil 1.5) (Rodgers ve Garikipati 2008). Hem olgun hem de işlenmemiş myostatin, disülfid bağlantılı dimerler oluşturur. Tek aktif formu işlenmiş myostatin dimerdir (Miar vd., 2014).



Şekil 1.5: Myostatinin proteolitik işlenmesi (Rodgers ve Garikipati 2008).

1.5.2. Myostatin'in hücre dışı düzenlenmesi ve sinyal mekanizmaları

Olgun MSTN ligandları önce aktivin tip 2 reseptörlerine (ACVR2A veya ACVR2B) bağlanır ve tip 1 reseptörleri, aktivin reseptör benzeri kinaz 4 (ALK4) veya ALK5 ile heteromerik reseptör kompleksi oluşturarak SMAD2/SMAD3 fosforilasyonuna sebep olur. Fosforilasyon sonucu aktive olan Smad2/3, Smad4 ile birleşerek kompleks oluşturur ve nükleusa hareket eder. Hücre çekirdeğinde Smad bağlanma bölgesine bağlanarak miyojenik farklılaşma 1 (MyoD), miyojenik faktör 5 (Myf5) ve miyogenin gibi bazı kas düzenleyici faktörlerin (MRF'ler) ekspresyonunu etkiler ve miyoblast proliferasyonu ve farklılaşmasını engeller (Şekil 1.6) (Du vd., 2007).



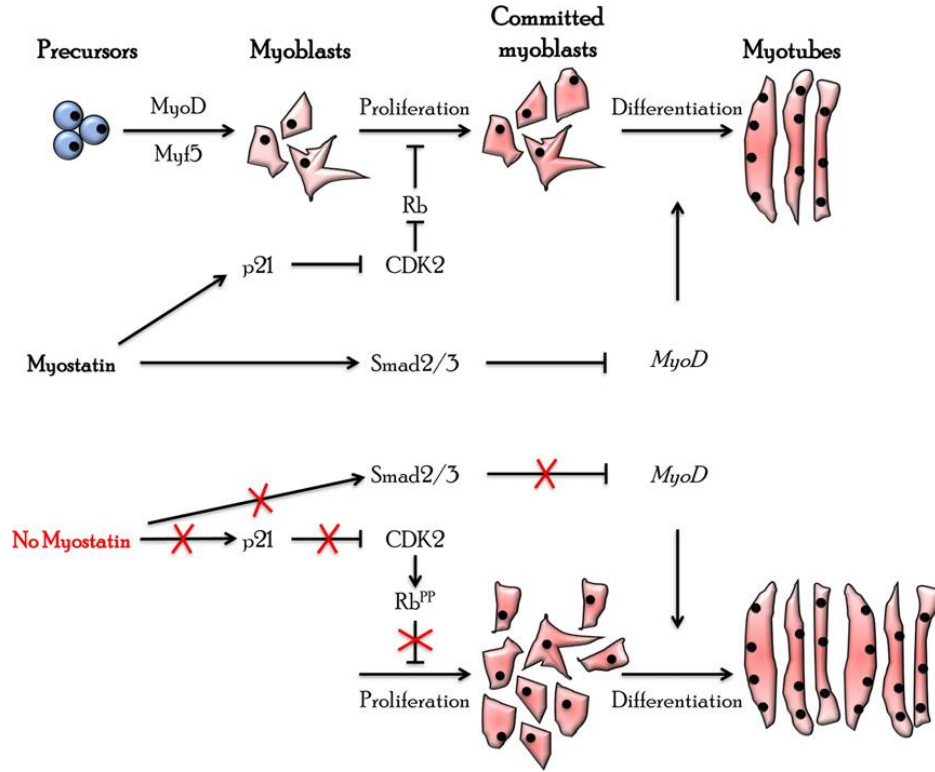
Şekil 1.6: MSTN'nin hücre dışı düzenlenmesi ve sinyal mekanizmaları (Suh ve Lee 2020)

1.5.3. Myostatin'in miyoblast proliferasyon ve farklılaşmasındaki rolü

Myostatin, doğum öncesi kas gelişimi sürecinde kas öncüsü proliferasyonu, miyoblast proliferasyonu ve farklılaşması gibi kilit noktalarda kas gelişimini düzenler (Aiello vd., 2018).

Embriyonik miyogenez sırasında, Myf5 ve MyoD ile aktive edilmiş öncü hücreler, proliferasyonlarından önce miyoblastlara farklılaşır. MSTN sinyaline yanıt olarak, sikline bağımlı bir kinaz inhibitörü p21'in ifadesi artar ve siklin-E·Cdk2 ve retinoblastoma (Rb) protein aktivitesini inhibe eder. Bu durum miyoblastların G1 fazında tutuklanmasına ve buna bağlı olarak miyoblast proliferasyonunun inhibisyonuna neden olur (Şekil 1.7) (Thomas vd., 200). Buna karşılık, miyogenez sırasında MSTN ifadesi olmadığında, p21 ifadesi için gerekli sinyal kaybolur ve Rb proteini hiper-fosforile formda kalır. Böylece MSTN'nin yokluğu proliferasyonun devam ederek miyoblastların çoğalmasına ve kas lifi boyutunun artmasına neden olur (McCroskery vd., 2003).

Miyoblast farklılaşması ve miyotüp oluşumu, kas transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonuna ve G1 fazındaki tutuklanmanın ortadan kalkmasına bağlıdır (Şekil 1.7) (Gu vd., 1993). Bu durum miyojenik düzenleyici faktörler Pax-3, Myf5 ve MyoD'nin azaltılmış ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Amthor vd., 2006). Joulia vd., 2003 yılında yaptıkları çalışmada, MYOG'un myostatinin önemli bir hedefi olduğunu gösterilmiştir. MSTN'nin aşırı ekspresyonu MyoD ve MYOG' nin mRNA ifadesini azaltarak miyojenik farklılaşmayı tersine çevrilebilir şekilde inhibe edebilir. Buna karşılık, MSTN'nin inhibisyonu, MyoD' nin yüksek ekspresyonuna ve dolayısıyla kas liflerinin oluşumunun artmasına neden olur (Joulia vd., 2003).



Şekil 1.7: Miyoblast proliferasyonu ve farklılaşmasında myostatin etkisi (Aiello vd., 2018).

1.5.4. Koyunlarda myostatin genindeki polimorfizmler

Myostatinin tanımlanması ve kas büyümesinin negatif belirteci olarak biyolojik işlevinin keşfedilmesinden sonra MSTN'deki varyasyonların fare, sığır, insan, köpek, tavuk, domuz ve koyun dahil olmak üzere çeşitli türlerde "çift kaslı" fenotip ile ilişkili olduğu bulunmuştur (McPherron ve Lee, 1997, Bellinge vd., 2005, Kambadur vd., 1997, Schuelke vd., 2004, Mosher vd., 2007, McFarland vd., 2007, Zhang vd., 2011, Stinckens 2005, Clop vd., 2006, Hickford vd., 2010).

MSTN geni, koyunlarda (*Ovis aries*) 2. kromozom uzun kolun sonunda (2q32.2 lokusu) yer almaktadır (Bellinge vd., 2005). Son yıllarda Texel, Norveç Spælsau, ticari Yeni Zelanda (NZ) koyun ırkları ve Letonya Darkhead gibi çeşitli koyun ırklarında MSTN geninde toplam 77 SNP (single nucleotide polymorphism-tek nükleotid polimorfizmi) rapor edilmiştir (Çizelge 1.1) (Kijas vd., 2007, Han vd., 2013). Bu polimorfizmlerin çoğu genin kodlanmayan bölgelerinde (intron) bulunmaktadır.

Belçika Texel koyunları, istisnai yapıları, genişleyen kas lifleri , artan yağsız, daha yüksek verimli karkaslar üretme potansiyelleri nedeniyle terminal melezi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Texel koyunlarında kantitatif lokus analizinde, kas kütlesinde etkisi olan kromozom 2 üzerinde MSTN'nin 3'-UTR'nin (çevrilmemiş bölge) bir varyantı (g.6723G>A) karakterize edilmiştir. Bu, iskelet kasında yüksek oranda eksprese edilen mikroRNA'lar olan miR1 ve miR206 için bir hedef bölge oluşturmaktadır (Kijas vd., 2007). c.*1232A, g.391G>T ve diğer 18 SNP dahil olmak üzere başka genetik varyantlar da bulunmuştur: g.2449C>G, g.2379C>T, g.1405A>T, g.1402G>A, g.1214C >T, g.1129C>T, g.41A>C, g.39T>C, g.474C>T, g.613T>C, g.616G>A, g.619T>C, g.622T>C , g.632G>T, g.696C>T, g.3135C>T, g.4036A>C ve g.4044C>T (Kijas vd., 2007) (Aiello vd., 2018).

Çizelge 1.1: Koyunlarda myostatin genindeki polimorfizmler

Irk	Polimorfizm		Referans
	Pozisyon	Mutasyon	
Texel	g.6723	G>A	Kijas vd., (2007)
	g.391	G>T	
	g.2449	C>G	
	g.2379	C>T	
	g.1405	A>T	
	g.1402	G>A	
	g.1214	C>T	
	g.1129	C>T	
	g.41	A>C	
	g.39	T>C	
	g.474	C>T	
	g.613	T>C	
	g.616	G>A	
	g.619	T>C	
	g.622	T>C	
	g.632	G>T	
	g.696	C>T	
	g.3135	C>T	
g.4036	A>C		
g.4044	C>T		
Norwegian White Sheep	c.960	del	Wang vd., (2016)
	c.2360	G>A	
New Zealand Romney	c.101	G>A	Wang vd., (2016)
	c.-959	C>T	
	c.-784	A>G	
	c.373+18	A>G	
	c.373+563	A>G	
	c.373+607	G>A	
	c.374-654	T>C	
	c.374-54	T>C	
	c.748-54	A>G	
	c.*83	A>G	
	c.*455	C>A	
	c.*709	insA	
	c.*123A	T>G	
	c.-2449	G>C	
c.-2379	T>C		
Charollais	c.*123A		Kijas vd., (2007)
White Suffolk	c.*123A		Kijas vd., (2007)
Poll Dorset	c.*123A		Kijas vd., (2007)
Lincoln	c.*123A		Kijas vd., (2007)
Stavropol Merino	c.373 + 396	T>C	Trukhachev vd., (2018)
	c.374-362	A>T	
	c.374-16	delT	
	c.747 + 185	C>A	
	c.748-194	C>A	
	c.782_783	insT	
	c.940	G>T	
c.*310	G>T		

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz ve malzemeler Çizelge 2.1’de, kimyasal maddeler ise Çizelge 2.2’te verilmiştir.

Çizelge 2.1: Kullanılan cihaz ve malzemeler

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	Marka/ Model
Derin Dondurucu Buzdolabı (-20°C ve -80°C)	
+4°C Buzdolabı	
Distile su cihazı	Nüve
Ultra Saf Su Cihazı	Milipore, MiliQ Synthesis
Mikrodalga Fırın	Arçelik
pH Metre	WTW inoLab
Çalkalayıcı-Sıcak Su Banyosu	GFL
Çalkalayıcı (Vortex)	IKA ve Dragon
Manyetik Karıştırıcı	IKA
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Thermo
Dijital Hassas Terazı (0.001 Duyarlı, 320 gr)	Sartorius
Nanodrop/ Spektrofotometre	Thermo
Qubit (Floresan Spektrofotometre)	Invitrogen
Buz Makinesi	Uğur
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	
DNA Dizileme Cihazı	
Gradient Thermal Cyclers (PCR)	ABI Veriti
Agaroz jel Elektroforez Takımları	Thermo
Güç Kaynağı	Thermo
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi	Vilber
UV Transilluminatör	
Etüv	
200, 600, 1500 µl hacimli Eppendorf tüpler	Axygen
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0,1-1000 µl)	Axygen
5, 10 ve 25 ml hacimli Steril Serolojik Pipetler	

Mor kapaklı (EDTA'lı) kan alma tüpü (10 cc)

8'li strip tüp

Axygen

Çizelge 2.2: Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma/ Kodu
Qubit DNA BR assay kit	Thermo-Q10211
Poteinaz-K	P8044-1G
Etanol absolute	Sigma-1009832511
Primer (HPLC grade) 100 nmol	
Agaroz	
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	BİOTİUM-41003
BseGI (BtsCI) Restriksiyon enzimi	Thermo-ER0871

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoloji ve Genetik laboratuvarında çalışılan 556904 numaralı tez çalışması için toplanılan Morkaraman (n=29), Sakız (n=30), Kıvırcık (n=28) ve Pırlak (n=24) ırkına ait hayvanlardan alınan kan örnekleri materyal olarak kullanılmıştır.

Çizelge 2.3: Araştırmada kullanılan koyun ırk ve sayıları

İrk	Sayı
Morkaraman	29
Sakız	30
Kıvırcık	28
Pırlak	24
Toplam	111

2.2. Metot

Bu tez çalışmasında kullanılan koyun kan örnekleri Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKUHADYEK) tarafından etik açıdan uygun bulunup (49533702/36) (EK 1), antikoagülanlı tüpe alınmıştır.

2.2.1. DNA izolasyonu

Çizelge 2.3'te belirtilen koyun ırklarından alınan kan örneklerinden aşağıda belirtilen şekilde, spin kolon yöntemiyle DNA izolasyonu yapılmıştır. 1,5 ml'lik DNase ve RNase içermeyen mikrosantrifüj tüplerine sırasıyla 10 µl Proteinaz-K (20mg/ml), her bir hayvandan alınan kan örneğinden 200 µl ve Ekstraksiyon bufferdan 200 µl eklenerek 10-15 saniye boyunca vortekslenmiş, 15 dakika 56°C etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler kısa santrifüj edilmiştir. Sonrasında üzerlerine 210 µl Binding buffer ilave edilerek 15 saniye vortekslenmiştir. Tüp içerisindeki sıvı spin-kolona aktarılmış ve 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpüne geçen sıvı dökülmüştür. 650 µl yıkama solüsyonu I kolona eklenmiş ve 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpüne geçen sıvı dökülmüştür. Ardından 500 µl yıkama solüsyonu-II kolonlara eklenmiş ve 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpüne geçen sıvı dökülmüştür. 250 µl yıkama solüsyonu-II kolona eklenmiş ve 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne geçen sıvı dökülmüştür. Kolon, yeni 1,5 ml steril DNase/Rnase içermeyen mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerine 200 µl TE buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığında inkübasyondan sonra tüpler 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR analizinde kullanılacak primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi için önce gradient PCR gerçekleştirilmiştir. Myostatin g+6723 primerine ait Tm derecesi Çizelge 2.4'te belirtilmektedir. PCR reaksiyonu için 2,5 µl 5x OneTaq Buffer, 0,25 µl dNTP, 2,5 mM 0,25 µl forward primer ve 2,5 mM 0,25 µl reverse primer, 0,06 µl OneTaq Taq polimeraz, 1,0 µl \cong 20 ng DNA ve 7,89 µl ultra distile su ilave edilerek total hacmin 12,5 µl olduğu bir PCR karışımı elde edilmiştir.

Çizelge 2.4: Myostatin geni için primer bağlanma sıcaklığı

Primer	Tm (°C)	Sekans
g+6723 forward	58	5'-GGTTCGTGATGGCTGTATAATGTGA-3'
g+6723 reverse		5'-GATTCAGATAATAGAGTTAAATCATTGGTTGCTT-3'

PCR koşulları kitte belirtilen şekilde Çizelge 2.5'teki gibi uygulanmıştır.

Çizelge 2.5: PCR inkübasyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
94	30 saniye	1
94	20 saniye	
58	30 saniye	30
68	60 saniye	
68	5 dakika	1
8	∞	

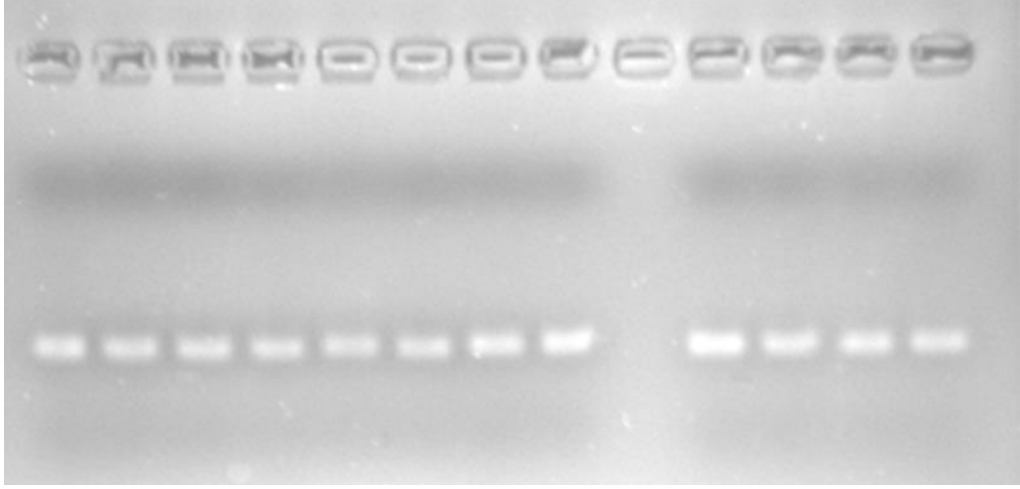
2.2.3. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Amplifikasyonun gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla jelde görüntülenen PCR ürünleri, polimorfizmin belirlenmesi amacıyla RFLP işlemine tabi tutulmuştur. Restriksiyon enzim kitinde belirtilen protokole uygun olarak; 5 µl PCR ürünü, 9 µl nükleaz içermeyen su, 1 µl 1X Tango Buffer ve 0,5 µl BseGI restriksiyon enzimi karıştırılarak reaksiyon hazırlanmıştır. PCR ürünleri Thermal Cycler cihazında (Applied Biosystems), 55°C'de 2 saat inkübe edilerek enzimin aktivasyonu sağlanmıştır. Ardından, 80°C'de 20 dk inkübe edilerek enzimin inaktivasyonu sağlanmıştır. Bu işlemden sonra, %3'lük agaroz jelde 30 dakika yürütülerek fragment oluşumu bakımından incelenmiştir. İşlem sırasında, reaksiyon sonunda oluşabilecek fragmentlerin boyutlarının belirlenmesi için DNA ladder kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

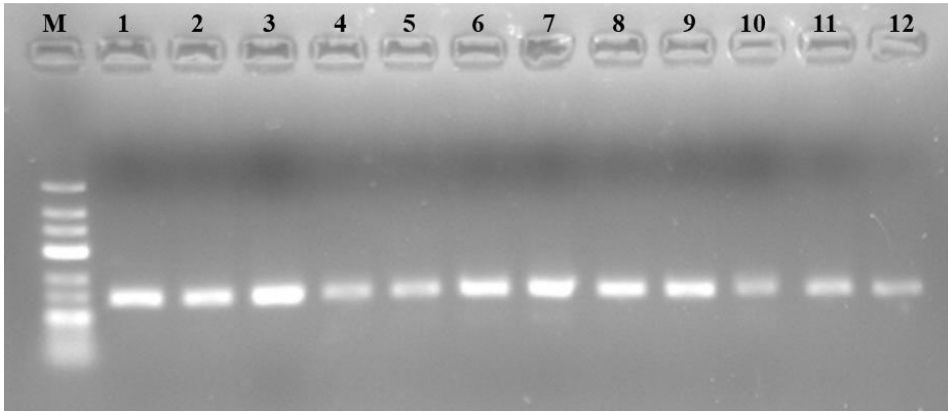
Bu tez çalışmasında Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Enstitüsü, Medikal Biyoloji ve Genetik laboratuvarında çalışılan 556904 numaralı tez çalışması için toplanılan Morkaraman (n=29), Sakız (n=30), Kıvırcık (n=28) ve Pırlak (n=24) ırkına ait hayvanlardan alınan kan örneklerinin miyostatin geni ekzon-3 bölgesi üzerinde belirlenen g+6723 forward ve g+6723 reverse primerleriyle çoğaltılması sonucu elde edilen 141bç'lik PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 3.1: Sakız ırkına ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri

3.2. Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Sonuçları

PCR ile çoğaltılan DNA bölgelerinin BseGI restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra elde edilen agaroz görüntülerinden biri ise Şekil 4.2’de gösterilmiştir. (Şekil 4.2).



Şekil 3.2: BseGI enzimi ile kesim sonucu elde edilen genotipler (M; Marker, 1-12; örnekler)

Bu çalışmada Morkaraman, Sakız, Kıvırcık ve Pırlak ırkından hayvanlarda Myostatin g+6723 polimorfizmine rastlanılmamıştır (Şekil 4.2). Populasyonun monomorf olduğu, yani myostatin lokusu bakımından polimorfizm göstermediği anlaşılmıştır.

4. TARTIŞMA

Koyun yetiştiriciliği, dünyanın hemen hemen her yerinde yapılmakta olup, kazancın büyük çoğunluğunu et verimi oluşturmaktadır. Yetiştiriciliği yapılan koyunların döl ve et veriminin iyileştirilmesine katkı sağlanmasına çalışılmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde elzem hayvan sayısı değil, hayvan başına düşen verimliliğin ve kalitenin artırılmasıdır. Son yıllarda bu özellikleri geliştirmek için araştırmalar yapılmakta ve bu araştırmalarda hayvanların genetik yapısı üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Koyunlarda et kalitesi ve verimini etkileyen birçok genetik faktör vardır. Bu genetik faktörlerden biri de myostatin genidir ve birçok memeli türünde tanımlanmıştır. Çift kaslı olarak nitelendirilen bu hayvanların karkaslarında kas ve deri oranı yüksek, yağ ve kemik oranı düşüktür. Bu sebeple karkas veriminde artış görülmektedir. MSTN geninin yüksek polimorfizmi, koyunlarda daha önce tanımlanmış olan 28 polimorfizm ile kanıtlanmıştır (Stefaniuk vd., 2014).

Yerli küçükbaş ırklarında doğal genetik varyasyonun dağılımı ve et verimi üzerine etkisini daha iyi anlamak için yapılan bu tez çalışması, 4 farklı koyun ırkında MSTN'nin genetik çeşitliliğini araştırmaya odaklanmıştır. Bu teknik, genomik DNA'daki varyasyonun tespiti için güvenilir, hassas ve düşük maliyetlidir (Hayashi, 1991).

Bu araştırmada Türkiye'deki yerli koyun ırklarında özellikle; Morkaraman, Sakız, Kıvırcık ve Pırlak ırkında myostatin geninde meydana gelen g+6723 polimorfizmi saptanamamıştır. Bu 3'-UTR mutasyonu (g+ 6723 G A) yeni bir mikro RNA yeri oluşturmakta fonksiyonel olmayan bir protein üretilmektedir. Mutasyon sonucu kaslarda myostatin geninin baskılayıcı özelliği kaybolduğu için çift kaslılık meydana gelmektedir (Clop vd., 2006).

Polimorfik myostatin genine sahip hayvanlarda; canlı ağırlık, karkas ağırlığı, kas ve kemik oranı daha yüksekken, karkastaki yağlılık oranı önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (Masri vd., 2011).

Boman vd., yaptığı çalışmada (2010) hem c.2360G>A hem de c.960delG mutasyonlarının Norveç Beyaz kuzularında daha az yağlı ve daha yüksek kas kütlesine sahip bir karkas verdiğini göstermektedir. c.2360G>A mutasyonunun etkileri başka çalışmalarda da incelenmiştir. Laville vd., Belçika Texel koyunlarında konformasyon skorunu ve karkas ağırlığını artıran ve yağ skorunu azaltan bir QTL etkisi bildirmiştir (Laville vd., 2004). Kijas vd., ise Avustralya koşullarında, g.+6723G>A mutasyonunun kaslanma ve yağlanma üzerinde önemli etkileri olduğunu, ancak canlı ağırlık ve büyüme üzerinde sadece küçük bir etkiye sahip olduğunu bulmuştur (Kijas vd., 2007).

Niceliksel özellik nükleotidinin (QTN) saptanması, genetik kazancı artırmak için bir işaretleyici destekli seçim (MAS) kullanma olasılığını meydana getirir. Günümüzde koyun tüm genom dizisinin mevcudiyeti sayesinde, et üretim özelliklerini artırmak için koyun yetiştirme programlarında genomik seleksiyon uygulanabilir. Çift kaslı özellik için genetik kazanç oranı, miyostatinin kas fenotipi üzerindeki kısmen çekinik etkisinden dolayı, sadece allelik frekansına değil, aynı zamanda popülasyondaki A aleli için homozigot hayvanlarının oranına da bağlıdır. Sonuç olarak, bu SNP'nin seçimi koyun yetiştiricileri için büyük ölçüde faydalı olabilir (Miar 2014).

Dehnavi vd., İran'ın Zel koyun ırkının miyostatin lokusu için intron 2'de bir polimorfizme sahip olduğunu göstermiştir. Ancak bu popülasyondaki bu lokusun, özellikle kilo alımını ve et özelliklerini iyileştirmek için marker olarak yararlı olmayabileceğini göstermiştir (Dehnavi 2012).

Başka bir çalışmada Clop vd., tarafından tanımlanan sekiz SNP'yi kapsayan 414 bç'lik bir intron -1 fragmanındaki allelik varyasyonun Yeni Zelanda (NZ) Romney koyunundaki üretim özellikleriyle olan ilişkileri araştırılmıştır. Bulunan SNP'lerin çoğunlukla c.373 + 240 ila c.373 + 249 bölgesinde kümелendiği ve intronun bu bölümünün daha az fonksiyonel kısıtlamaya uğradığını düşündürmektedir. Burada rapor edilen sonuçlar, NZ Romney'de gelişmiş karkas özellikleri için marker destekli seçimin gelecekteki bir olasılık olduğunu önermektedir (Hickford vd., 2010).

Osman vd., yayınladığı bir çalışmada Mısır'daki başlıca koyun ırklarında altı SNP tanımlandı. Tanımlanan SNP'ler Ossimi, Rahmani ve Najdi ırklarında monomorfik (sırasıyla AA ve TT), Barki ırkında ise polimorfiktir. Sonuçlar, MSTN içindeki polimorfizmlerin Mısır koyun ırklarında büyüme özelliklerini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir (Osman vd., 2021).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak varyasyonların genomik seçim stratejilerine dahil edilmesi, hedeflenen seçimin daha hızlı genetik iyileştirme elde etmesine izin verirken, bunların doğruluğunu ve sağlamlığını artıracaktır. Orta vadede, gelişmiş kas oluşumuna katkıda bulunan gelişimsel ve biyokimyasal yolların keşfi, koyun eti endüstrisinde genetik seçimde önemli ve tamamlayıcı bir rol oynayabilecek yeni ve kabul edilebilir biyokimyasal ve immünolojik müdahalelerin kullanımı için yeni fırsatlar yaratacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Aiello D, Patel K, Lasagna E. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal genetics*. 2018 Dec;49(6):505-19.
- Akçapınar, H., Özbeyaz, C. (1999). Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri. *Kariyer Matbaacılık*. ISBN: 975- 96978-0-7, Ankara.
- Amthor H, Otto A, Macharia R, McKinnell I, Patel K. Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006 Mar;235(3):672-80.
- Anonim (2005). Statistical databases. Erişim: <http://www.fao.org>, Erişim tarihi: 22.11.2007.
- Archibald, A. L., Imlah, P. (1985). The halothane sensitivity locus and its linkage relationships. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 16: 253-263.
- Arthur, P. F. (1995). Double muscling in cattle: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46: 1493-1515
- Banks, R. (1997). The Meat Elite Project: establishment and achievements of an elite meat sheep nucleus. *Adv. Anim. Breed. Genet.*, 12.
- Bellinge RH, Liberles DA, Iaschi SP, O'brien PA, Tay GK. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal genetics*. 2005 Feb;36(1):1-6.
- Boman IA, Klemetsdal G, Nafstad O, Blichfeldt T, Våge DI. Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Genetics Selection Evolution*. 2010 Dec;42(1):1-7.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics*. 2006 Jul;38(7):813-8.
- Cockett, N. E., Jackson, S. P., Green, R. D., Shay, T. L., George, M. (1993). Identification of genetic markers for and the location of a gene (callipyge) causing muscle hypertrophy in sheep. *Texas Tech Univ. Agricultural Science Technology Representative*, T-5-327, 4-6.
- Cossu G, Biressi S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. In *Seminars in cell & developmental biology* 2005 Aug 1 (Vol. 16, No. 4-5, pp. 623-631). *Academic Press*.
- Dehnavi E, Ahani Azari M, Hasani S, Nassiry MR, Mohajer M, Khan Ahmadi A, Shahmohamadi L, Yousefi S. Polymorphism of myostatin gene in intron 1 and 2 and exon 3, and their associations with yearling weight, using PCR-RFLP and PCR-SSCP techniques in Zel sheep. *Biotechnology Research International*. 2012;2012.
- Du R, Chen YF, An XR, Yang XY, Ma Y, Zhang L, Yuan XL, Chen LM, Qin J. Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep: Full Length Research Paper. *DNA Sequence*. 2005 Jan 1;16(6):412-7.
- Du R, An X, Chen Y, Qin J. Functional analysis of the Myostatin gene promoter in sheep. *Science in China Series C: Life Sciences*. 2007 Oct;50(5):648-54.
- Duzgunes O, Kesici T, Gurbuz F. İstatistik Metodlari. *Ankara Universitesi Ziraat Fakultesi Yayinlari*. 1983;2.

- Ergun, O.F., Bayram, B. Türkiye'de Hayvancılık Sektöründe Yaşanan Değişimler. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 2021;10(2):158-75.
- Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R, Georges M. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*. 2003 Apr;35(4):227-38.
- Gürer B. Türkiye'de nüfusun yeterli ve dengeli beslenmesi açısından hayvansal gıda arz ve talebinin değerlendirilmesi. *Gıda*. 2021 Nov 1;46(6):1450-66.
- Grochowska E, Borys B, Mroczkowski S. Effects of intronic SNPs in the myostatin gene on growth and carcass traits in colored Polish merino sheep. *Genes*. 2019 Dec 18;11(1):2.
- Gu W, Schneider JW, Condorelli G, Kaushal S, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell*. 1993 Feb 12;72(3):309-24.
- Han J, Forrest RH, Hickford JG. Genetic variations in the myostatin gene (MSTN) in New Zealand sheep breeds. *Molecular biology reports*. 2013 Nov;40(11):6379-84.
- Hanset, R., Michaux, C. (1985a). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. *Experimental Data. Genetics Selection Evolution*, 17 (3): 359-368.
- Hanset, R., Michaux, C. (1985b). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. *Population Data. Genetics Selection Evolution*, 17 (3): 369-386.
- Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*. 1991 Aug 1;1(1):34-8.
- Hickford JG, Forrest RH, Zhou H, Fang Q, Han J, Frampton CM, Horrell AL. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. *Animal genetics*. 2010 Feb;41(1):64-72.
- Jouliia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental cell research*. 2003 Jun 10;286(2):263-75.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P., & Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7, 910-916.
- Kijas JW, McCulloch R, Edwards JE, Oddy VH, Lee SH, Van der Werf J. Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. *BMC genetics*. 2007 Dec;8(1):1-1.
- Kronacher, C. (1934). *Genetik und Tierzuchtung. Handbuch der Vererbungswissenschaft*, 3: 139. Le Roy, P., Naveau, J., Elsen, J. M., Sellier, P. (1990). Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. *Genetic Research Cambridge*, 55: 33-40
- Laville E, Bouix J, Sayd T, Bibé B, Elsen JM, Larzul C, Eychenne F, Marcq F, Georges M. Effects of a quantitative trait locus for muscle hypertrophy from Belgian Texel sheep on carcass conformation and muscularity. *Journal of Animal Science*. 2004 Nov 1;82(11):3128-37.
- Lawrie, R. A., & Ledward, D. A. (2008). In *Lawrie's Meat Science* (6th ed.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

- Le Roy, P., Naveau, J., Elsen, J. M., Sellier, P. (1990). Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs. *Genetic Research Cambridge*, 55: 33-40.
- Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic acids research*. 1997 Mar 1;25(5):955-64.
- Marcq, F., Larzul, C., Marot, V., Bouix, J., Eychenne, F., Laville, E., Georges, M., Bibe, B., Leroy, P. L., Elsen, J. M. (2002). Preliminary results of a whole genome scan targeting QTL for carcass traits in a Texel Romanov intercross. Proceedings of the 7th World Congress on Applied Livestock Production, Montpellier, 19-23 August, France, Abstract 02-14.
- Masri AY, Lambe NR, Macfarlane JM, Brotherstone S, Haresign W, Bünger L. Evaluating the effects of the c.* 1232G> A mutation and TM-QTL in Texel× Welsh Mountain lambs using ultrasound and video image analyses. *Small Ruminant Research*. 2011 Aug 1;99(2-3):99-109.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology*. 2003 Sep 15;162(6):1135-47.
- McFarland DC, Velleman SG, Pesall JE, Liu C. The role of myostatin in chicken (*Gallus domesticus*) myogenic satellite cell proliferation and differentiation. *General and comparative endocrinology*. 2007 May 1;151(3):351-7.
- McPherron, A. C., & Lee, S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94, 12457-12461.
- Miar Y, Salehi A, Kolbehdari D, Aleyasin SA. Application of myostatin in sheep breeding programs: A review. *Molecular Biology Research Communications*. 2014 Mar;3(1):33.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS genetics*. 2007 May 25;3(5):e79.
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. *Columbia university press*; 1987.
- Ata, N., Yılmaz, H. Türkiye’de uygulanan hayvansal üretimi destekleme politikalarının süt sığırcılığı işletmelerine yansımaları: Burdur ili örneği. *Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2015 Jun 1;10(1):44-54.
- Öz, A. (2009). Yerli Sığır ırklarında miyostatin gen polimorfizminin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana
- Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine reviews*. 2008 Aug 1;29(5):513-34.
- Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews*. 1996 Apr 1;76(2):371-423.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *New England Journal of Medicine*. 2004 Jun 24;350(26):2682-8.
- Sonstegard TS, Rohrer GA, Smith TP. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Animal Genetics*. 1998 Feb;29(1):19-22.

- Sopena Quesada, A., Blanco Cachafeiro, M. E. (1971). Reproduction de la femelle ulardeen race Asturienne. *Annales de Génétique et de Sélection Animale*, 4: 13.
- Stefaniuk M, Kaczor U, Kulisa M. MSTN gene polymorphism in livestock animals. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* (Online). 2014 May 20;68:633-9.
- Stinckens A, Bijttebeir J, Luyten T, Van den Maagdenberg K, Harmegies N, De Smet S, Georges M, Buys N. Detection of polymorphisms in the myostatin gene in Belgian Pietrain pigs. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 2005;70(2):37-41.
- Suh J, Lee YS. Similar sequences but dissimilar biological functions of GDF11 and myostatin. *Experimental & molecular medicine*. 2020 Oct;52(10):1673-93.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Dec 22;275(51):40235-43.
- TİGEM (2020). Hayvancılık sektör raporu. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Ankara. <https://www.tigem.gov.tr/DosyaGaleriData/View/a374cc25-acc1-44e8-a546-63b4c8bce146> (Erişim: 29.08.2021)
- Trukhachev V, Yatsyk O, Telegina E, Krivoruchko A, Zhou H, Hickford JG. Comparison of the myostatin (MSTN) gene in Russian Stavropol Merino sheep and New Zealand Merino sheep. *Small Ruminant Research*. 2018 Mar 1;160:103-6.
- Turan, Z., Şanver, D., Öztürk, K. (2017). Türkiye’de hayvancılık sektöründen süt inekçiliğinin önemi ve yurtiçi hasılaya katkısı ve de dış ülkelerle karşılaştırılması. *Ömer Halisdemir Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 10(3), 60-74.
- Ünal, N., Yakan, A. (2008). Bafra (Sakız x Karayaka G1) kuzularında farklı kesim ağırlıklarında besi performansı, kesim, karkas ve bazı et kalite özellikleri. TÜBİTAK Projesi. Proje no: 106058. Ankara.
- Vural H, Fidan H. Türkiye’de hayvansal üretim ve hayvancılık işletmelerinin özellikleri. *Turkish Journal of Agricultural Economics*. 2007 Dec 1;13(2).
- Wang J, Zhou H, Hu J, Li S, Luo Y, Hickford JG. Two single nucleotide polymorphisms in the promoter of the ovine myostatin gene (MSTN) and their effect on growth and carcass muscle traits in New Zealand Romney sheep. *Journal of Animal Breeding and genetics*. 2016 Jun;133(3):219-26.
- Wegner J, Albrecht E, Fiedler I, Teuscher F, Papstein HJ, Ender K. Growth-and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of animal science*. 2000 Jun 1;78(6):1485-96.
- Wriedt, C. (1929). Die Vererbung des Doppellender-Kharacters die Rindern. *Zeitschrift fuer Induktive Abstammungs und Vererbungslehre*, 51: 482-6
- Yayvan, Y., Özkul, B.Y. Koyunlarda Myostatin Geni ve Önemi. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*. 2018;7(1):42-8.
- Zhang GX, Zhao XH, Wang JY, Ding FX, Zhang L. Effect of an exon 1 mutation in the myostatin gene on the growth traits of the Bian chicken. *Animal genetics*. 2012 Aug;43(4):458-9.
- İnt. Kay. 1, <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf>, (20.09.2022)

