

Boz ve Yerli Kara Sığır Irklarında Kalpain 1 p.Ala316Gly Genotiplerine Ait Genetik Varyasyonun Belirlenmesi

• Sena Ardıçlı¹, • Özden Çobanoğlu¹

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı

Received 20-03-2022 Accepted 21-06-2022

Özet

Kalpain 1 (*CAPN1*) geni, mikromolar kalsiyum-aktif nötral proteaz geni olarak bilinir ve postmortem koşullarda miyofibriler proteinleri indirgeyen kalsiyum bağımlı sistein proteazı, μ -kalpaini ayrıştırır. Bu genin kas metabolizması ve gelişimi üzerinde önemli etkileri vardır. Bu gen, çeşitli sığır ırkları arasında geniş çapta çalışılmış olmasına rağmen, Türk yerli sığırları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, bazı Türk yerli sığır ırklarında *CAPN1* p.Ala316Gly polimorfizmine ait genetik varyasyonu belirlemeyi amaçlamıştır. Bu kapsamda 99 Boz ve 41 Yerli Kara ırkı erkek sığır PCR-RFLP metodu kullanılarak genotiplendirilmiştir. Genotipik ve alelik frekanslar, Hardy-Weinberg dengesi (HWE), heterozigotluk (He), polimorfizm bilgi içeriği (PIC), efektif alel sayısı (Ne), fiksasyon indeksi (Fis), olası varyasyon gerçekleşme düzeyi (%V) dahil olmak üzere popülasyon genetik parametreleri değerlendirilmiştir. Ayrıca Shannon-Weaver indeksi, Simpson dominantlık indeksi ve Gini katsayısını içeren biyoçeşitlilik indeksleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, GG genotipinin her iki yerli ırkta da oldukça baskın olduğunu ortaya koydu. Öte yandan, toplam popülasyonda CC genotipinin bulunmadığı gözlenmiştir. Bu durum dikkate değer düzeyde düşük C alel frekansı ile sonuçlanmıştır (Boz ve Yerli Kara için sırasıyla 0.13 ve 0.12). Fisher'in kesin testi, HWE'den sapma olduğunu, popülasyon genetiği parametreleri ise, incelenen ırklarda oldukça düşük bir genetik varyasyon düzeyi olduğunu göstermiştir. Bu gözlem, düşük seviyedeki biyolojik çeşitlilik seviyeleri ile desteklenmiştir. Nitekim *CAPN1* markörü, Boz ve Yerli Kara sığırları için düşük seviyede bilgilendiricilik göstermiştir ancak Türkiye'deki yerli sığır ırklarının genetik karakteri hakkında ileride yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Yerli ırklarda yapılacak moleküler genetik çalışmalar, önemli biyolojik süreçlerle ilgili daha geniş perspektifleri ortaya koymak ve büyüme, kas gelişimi ve yemden yararlanma gibi kompleks özelliklerin daha iyi anlaşılmasını sağlamak için teşvik edilmelidir.

Anahtar kelimeler: Boz ırk, Yerli Kara, *CAPN1*, tek nükleotit polimorfizmi, popülasyon genetiği

Abstract

Calpain 1 (*CAPN1*) gene is known as the micromolar calcium-activated neutral protease gene and it degrades calcium-dependent cysteine protease, μ -calpain, which reduces myofibrillar proteins in postmortem conditions. This gene has important effects on muscle metabolism and development. Although this gene has been widely studied among various cattle breeds, there is limited information on Turkish native cattle. Therefore, the present study aimed at determining the genetic variability of the *CAPN1* p.Ala316Gly polymorphism in some Turkish native cattle breeds. In this respect, 99 Turkish Grey Steppe and 41 Anatolian Black bulls were genotyped by the PCR-RFLP. The genotypic and allelic frequencies, the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), the population genetic parameters including gene heterozygosity (He), the polymorphism information content (PIC), the effective allele numbers (Ne), the fixation index (Fis), and the level of possible variability realization (%V) were evaluated in this study. Moreover, biodiversity indexes including the Shannon-Weaver diversity index, Simpson's dominance index, and Gini coefficient were calculated. Results revealed that the GG genotype was remarkably predominant in both native breeds. On the other hand, it was observed that the CC genotype was absent in the total population. This resulted in notably low C allele frequency (0.13 and 0.12 in Turkish Grey Steppe and Anatolian Black, respectively). The Fisher's exact test showed a deviation from HWE and population genetics parameters indicated remarkably low genetic variabilities in the studied breeds. This observation was supported by the low levels of biodiversity. Taken together, the *CAPN1* marker showed low informativeness in Turkish Grey Steppe and Anatolian Black cattle but further analyzes are needed for the genetic characterization of the native cattle breeds in Turkey. Molecular genetic studies on native breeds should be encouraged to reveal broader perspectives regarding significant biological processes and to achieve a better understanding of complex traits such as growth, muscle development, and feed efficiency.

Keywords: Turkish Grey Steppe cattle, Anatolian Black cattle, *CAPN1*, single nucleotide polymorphism, population genetics

* Corresponding author: Sena Ardıçlı, Bursa Uludağ University Faculty of Veterinary Medicine Department of Genetics, 16059, Bursa, Turkey, E-mail: sardicli@uludag.edu.tr, Tel: +905414875448

Giriş

Sığır kromozomu 29'da (BTA29) ekonomik yönden önemli nicel özellikleri etkileyen birçok genetik belirteç yer almaktadır. Özellikle postmortem süreçte karkas özellikleri ve et kalitesi bakımından BTA29 sığır genomunda yapılan birçok araştırma için ilgi kaynağı olmuştur.¹ Bu kromozomda yer alan en ünlü genlerden birisi de Ca^{2+} bağımlı doğal bir sistin proteazı indirgeyen μ -kalpaini kodlayan bir gen olan kalpain 1 (*CAPN1*) genidir. Bu bağlamda, μ -kalpain aktivasyonu, postmortem değişiklikler ve özellikle de et gevrekliği ile ilişkilendirilmiştir.² Bu aktivasyonun regülasyonu ise intrasellüler kalsiyum konsantrasyonu ve endojen bir inhibitör olan kalpastatinin sayesinde gerçekleşmektedir. Kalpain-kalpastatin sistemi, myoblast migrasyonu ve füzyonu, protein dönüşümü aracılığıyla kas gelişiminin düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadır. *CAPN1* geni (GenBank no: AF252504) kromozom 29'un telomerik ucunda^{1,2} 43.400.333-43.427.397 (ileri iplik) pozisyonunda yer almaktadır.³ Bu genomik bölge, sadece et gevrekliğini değil aynı zamanda büyümeyi (sütten kesim ağırlığı, karkas ağırlığı) ve yemden yararlanmayı da etkileyen kantitatif özellik lokuslarını (Quantitative trait loci: QTL) kapsamaktadır.^{4,5} Dolayısıyla, burada belirtilmesi gereken önemli noktalardan birisi, her ne kadar *CAPN1* geninin et gevrekliğine kanıtlanmış major etkileri olsa da, sığırlarda büyüme ve gelişme ile de potansiyel bir bağlantısının bulunmasıdır. Hatta bu genin kas metabolizması ve gelişimi açısından benzer etkileri insanlarda yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir.^{6,7}

CAPN1 geninde sığır yetiştiriciliği için önemli fenotipik özelliklerin genetik altyapısında rol oynayan birçok genetik varyasyon unsuru tanımlanmıştır. Bu genin 716 (ENSBTAT00000087345.1) ve 717 (ENSBTAT00000011678.6) aminoasitten oluşan iki transkripti bulunmakta olup; ilki 22 ikincisi ise 20 ekzondan oluşmaktadır.³ *CAPN1* geni g. 43405875C>G polimorfizmi, ekzon 9 pozisyon 947'de (c. 947C>G) sitozin>guanin ve amino asit pozisyonu 316'da glisin-alanin değişikliğine (p.Ala316Gly) neden olmaktadır. Hatta bu nedenle birçok çalışmada, bu tek nükleotit polimorfizmi (single nucleotide polymorphism: SNP) *CAPN1* 316 olarak da adlandırılmaktadır. Nükleotit değişikliğine ait genomik lokasyon Şekil 1'de sunulmuştur. Bu genetik markör, özellikle de besi sığırcılığı için ticari olarak piyasaya sunulan birçok SNP çipte yer almakta ve et kalitesinin geliştirilmesi odaklı yetiştirme programlarında (özellikle ABD'de) temel genetik faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir.^{1,8,9}

```
Flanking sequence / Primary assembly 29:43405875 (forward strand)
TGCCACCTACCAGCATCCTCGGGGCGTCTGAGCTGGCCCTCATAAGATAACCCCTGGGA - 43405734
CTGGGTCTCTGGACTTGCCCTTTGTGGAGCCTCTGACCTGGCCAGGGAAGGACAGC - 43405794
CCCAGGGATAGAGGCTGGGCGAGTCACTGGCCGCGCCAGCCCTGGCAGTCCCGTTTCTTA - 43405854
CAGCTCCTCGGAGTGGAAACCGTGGACCCCTTACATGCGGGAGCAGCTCCGGGTCAAGAT - 43405914
GGAGGATGGGGAGTTCTGGTGGAGCAGCCCTCTCAGTCTGAGTGGGCACCCAGCTCC - 43405974
CAACCCACCCCTGAAAACAGCTGTGCCATGTCTCTGTATGCTCGACTGGGCATCC - 43406034
TGTTCACTCTCACCTCGACCCCCAGGATGTCTCCGAG
BTA29:g.43405875C>G; c.947C>G; p.Ala316Gly; rs17872000
```

Şekil 1. Bu çalışmada incelenen *CAPN1* markörünün 400 bç çevreleyen (flanking) dizideki lokasyonu. Genomik lokasyon pozisyon 43405858 ekzon başlangıcını; pozisyon 43405875 *CAPN1* rs17872000 (*CAPN1* p.Ala316Gly) polimorfizmini göstermektedir (Kaynak: Ensembl genome browser3).

Türkiye'de sığır yetiştiriciliğinde yapılan genetik çalışmalar, her ne kadar son yıllarda belirli düzeyde hareketlenmiş olsa da, ABD, Kanada ve Avrupa ülkeleri ile karşılaştırıldığında oldukça sınırlı kalmıştır. Bunun yanı sıra, çiftlik hayvanlarında tamamen verim odaklı yetiştirme stratejisi, sadece fenotip temelinde anlamsız ve rastgele yapılan melezleme çalışmaları, verim yönünden düşük ancak adaptasyon ve direnç özellikleri bakımından yüksek değerdeki yerli ırkların yok olma sınırına gelmesine neden olmuştur. Bu yerli sığır ırkları, ulusal biyoçeşitliliğin önemli unsurları ve Türkiye'nin yerli gen kaynaklarıdır. Genel anlamda, verim özellikleri ile sağlık ve fertilitate arasında negatif korelasyon olduğu bilinmektedir.¹⁰ Yerli sığır ırklarında yapılan genetik seleksiyon uygulamalarının anlamı ve değeri tartışmalı bir konu olsa da; verim özelliklerine etkili major genlere ait genetik varyasyonun belirlenmesi, yetersiz çevresel koşullarda bile hayatta kalma kabiliyetine sahip, birçok enfeksiyon ve enfestasyona dirençli bu ırklardaki genetik altyapının değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. *CAPN1* p.Ala316Gly markörü, çeşitli sığır ırklarında geniş çapta araştırılmış olmasına rağmen; Türk yerli sığır ırklarında bu marköre ait genetik varyasyonun belirlendiği çalışma sayısının oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı Boz ve Yerli Kara ırkı sığırlarda *CAPN1* p.Ala316Gly polimorfizmine ait genotipik/alelik varyasyon ve popülasyon genetiği/biyoçeşitlilik parametrelerinin belirlenerek değerlendirilmesidir.

Materyal ve Metot

Hayvan materyali ve örnekleme

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Türkiye'nin iki farklı yerli sığır ırkına ait toplam 140 baş sığır kullanılmıştır. Popülasyon, Türkiye'nin Marmara bölgesinde bulunan iki farklı çiftlikten 99 Boz ve 41 Yerli Kara ırkı erkek sığırdan oluşmaktadır. Her hayvandan DNA izolasyonunda kullanılmak üzere vena jugularisten yaklaşık 4 mL periferik kan örneği K3EDTA'lı ve vakumlu tüplere (Vacuette, Greiner bio-one-Frickenhausen, Almanya) alınmıştır. Kan örnekleri DNA izolasyon işlemine kadar -20°C'de saklanmıştır. Bu çalışmada kan alımı dışında hayvanlara herhangi bir

işlem uygulanmamış ve hayvanların kullanımı, ilgili ulusal düzenlemelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Etik kurul onay numarası: 2010/6-05).

DNA izolasyonu

Çalışmada, DNA izolasyonu için fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) protokolü¹¹ ve ticari DNA izolasyon kiti (Ez-10 spin column genomic DNA kit, Bio Basic Inc. Ontario Kanada) kullanılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinin miktarı (ng/μL) ve saflığı (260/280 absorpsiyon oranı) NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Scientific, Wilmington, DE, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. PCR işlemleri için 260/280 değeri 1,7-1,9 arasında olan yaklaşık 50-90 ng/μL saf DNA kullanılmıştır. Kabul edilebilir saflık aralıklarının dışındaki numuneler yeniden izole edilmiştir.

Genotiplendirme

CAPN1 p.Ala316Gly polimorfizmi için genotiplendirme PCR-RFLP yöntemiyle yapılmıştır. PCR amplifikasyonları toplam 25 μL hacimde olmak üzere; 2,5-3 μL saf DNA örneği, 1 μLx2 primer (0,5 μM), 12,50 μL PCR master mix (OneTaq Quick-Load 2xMM, New England BioLabs (NEB) Inc., Ipswich, MA, ABD, Katalog no: M0486S), 8 μL otoklavlanmış Milli-Q su (Millipore, Bedford, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR işlemlerinde, MyGenie 96 termal blok (Bioneer Corporation, Güney Kore) kullanılmıştır. PCR şartları; 95°C'de 5 dakikalık ilk denatürasyonu takiben; 35 döngü, 95°C'de 45 saniye denatürasyon, 63°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye uzama; 72°C'de 5 dakika son uzama sonrasında da 4°C'de ∞ soğutma olacak şekilde ayarlanmıştır. Kullanılan primer dizileri aşağıda sunulmuştur:

F: 5'- GACTGGGGTCTCTGGACTT - 3'

R: 5'- GGAACCTCTGGCTCTTGA - 3'

PCR ürünleri, %2 agaroz jel elektroforezi (100 Volt; 45 dakika) yardımıyla kontrol edilmiştir. PCR amplifikasyon aşamasını takiben, PCR ürünleri BtgI enzimi (NEB, Ipswich, MA, ABD) ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Bu bağlamda, PCR ürünlerine (15 μL), 0,50 μL restriksiyon enzimi eklenmiş ve inkübasyon işlemi (16 saat) gerçekleştirilmiştir. Enzim kesimi, %3 agaroz jel elektroforezinde (90 Volt; 1 saat) kontrol edilmiş ve sonuçlar, jel dokümantasyon ve analiz sistemi (DNR MiniLumi Bio-Imaging Systems, İsrail) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Genotipik veri setinin değerlendirilmesi

Genotipik ve alelik frekanslar, Falconer ve Mackay'a¹² göre hesaplanmıştır. Hardy-Weinberg dengesi (Hardy-Weinberg Equilibrium: HWE), Fisher'in kesin testi ile değerlendirilmiştir.

dirilmiştir. Popülasyon genetiği parametreleri, daha önceki çalışmalarda gösterildiği şekilde aşağıda yer alan formüller yardımıyla hesaplanmıştır.¹³⁻¹⁵

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

P_i, i alelinin frekansı, n ise alel sayısıdır.

Shannon-Weaver indeksi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$H' = - \sum_{i=1}^n P_i^2 \ln P_i$$

P_i, tür/takson/alel i'ye ait bireylerin oranı ve ln, doğal logaritmadır.

Simpson dominantlık indeksi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:¹³

$$D = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

P_i, tür/takson/alel i'ye ait bireylerin oranıdır.

Gini katsayısı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

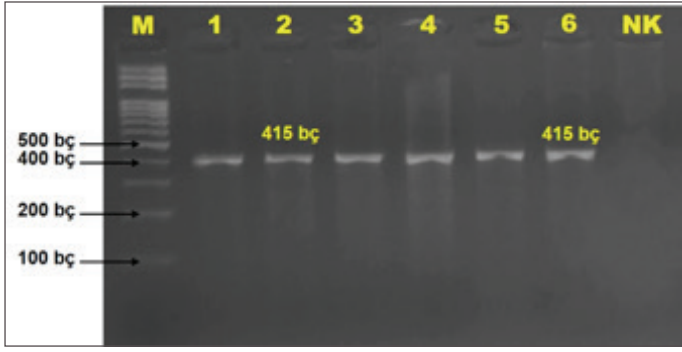
$$Gini \text{ katsayısı} = \frac{2 \sum_i in_i}{n \sum_i n_i} - \frac{N + 1}{N}$$

Bulgular

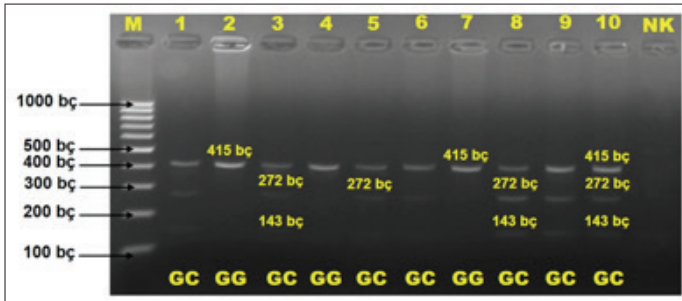
CAPN1 p.Ala316Gly polimorfizmine ait 415 bç fragmanın amplifikasyonunun %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir. BtgI enzim kesimi ile ilgili olarak, ampikon üç fragmente (415 bç, 272 bç ve 143 bç) bölünmüştür. Şekil 3'de gösterildiği gibi bu üç bant heterozigot genotip için belirleyicidir. GG genotipi kesime uğramamış olan 415 bç'lik fragment ile karakterizedir. Elektroforezde, 272 ve 143 bç ile karakterize olan CC genotipi ise bu çalışmada gözlenmemiştir.

Boz ve Yerli Kara sığırlarında, CAPN1 p.Ala316Gly polimorfizmine ait genotip ve alel frekansları Tablo 1'de sunulmuştur. Bu çalışmada her iki sığır ırkı için de CC genotipinin bulunmadığı ve bu durumun da belirgin şekilde düşük C alel frekanslarıyla sonuçlandığı gözlenmiştir (Boz

ve Yerli Kara ırkları için sırasıyla 0,1313 ve 0,1220). Fisher'in kesin testi, hem ırk-spesifik hem de toplam sığır popülasyonunda HWE'den bir sapma olduğunu göstermiştir (Tablo 2).



Şekil 2. CAPNI p.Ala316Gly polimorfizmine ait 415 bç fragmentin amplifikasyonunun %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: Markör; NK: Negatif kontrol; bç: baz çifti.



Şekil 3. BtgI enzim kesimi sonuçlarının %3 agaroz jelde görüntüsü. M: Markör; NK: Negatif kontrol; bç: baz çifti; Örnekler: 2 ve 4 GG; 1, 3, 5, 6, 8-10 GC.

Popülasyon genetiği parametreleri ve biyoçeşitlilik indeksleri Tablo 2'de sunulmuştur. Boz ırkı sığırlarda He, Ne ve PIC sırasıyla 0,2281, 1,2955 ve 0,2021 olarak bulunmuştur. Yerli Kara ırkında ise bu parametreler sırasıyla 0,2142, 1,2726 ve 0,1913 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Fıs ve %V değerleri ve biyoçeşitlilik indeksleri (H', D ve Gini katsayısı) de düşük bir genetik varyasyona işaret etmektedir. Benzer sonuçların tüm sığır popülasyonu (n=140) için de geçerli olduğu görülmektedir (Tablo 2).

Tablo 1. Kalpain 1 p.Ala316Gly markörüne ait genotipik ve alelik frekanslar.

İrk	n	Genotip frekansı (%) *			Alelik frekansı	
		GG	GC	CC	G	C
Boz	99	73,74 (73)	26,26 (26)	0	0,8687	0,1313
Yerli Kara	41	75,61 (31)	24,39 (10)	0	0,8780	0,1220
Toplam	140	74,29 (104)	25,71 (36)	0	0,8714	0,1286

* Her bir genotip için hayvan sayısı parantez içinde sunulmuştur.

Tablo 2. Kalpain 1 p.Ala316Gly markörü için popülasyon genetiği parametreleri ve biyoçeşitlilik indeksleri (n=140).

İrk	HWE test ¹	He ²	Ne	PIC	Fıs	%V	H'	D ³	Gini katsayısı
Boz	P<0,001	0,2281	1,2955	0,2021	-0,1398	0,2210	0,5758	1,6431	0,2374
Yerli Kara	P<0,01	0,2142	1,2726	0,1913	0,5331	0,2071	0,5555	1,6080	0,2561
Toplam	P<0,01	0,2241	1,2889	0,1990	-0,6064	0,2169	0,5701	1,6250	0,2429

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium (Hardy-Weinberg Dengesi); He: Heterozigotluk; Ne: Number of effective alleles (Etketif alel sayısı); PIC: Polymorphism Information Content (Polimorfizm bilgi içeriği); Fıs: Fiksasyon indeksi; %V: olası varyasyon gerçekleşme seviyesi; H': Shannon-Weaver çeşitlilik indeksi; D: Simpson dominantlık indeksi.

ICC genotipi taşıyan birey bulunmadığı için (n<5) HWE testi, Pearson χ^2 yerine Fisher'in kesin testi ile değerlendirilmiştir.

2Dialelik lokuslarda "1-Teorik heterozigotluk=Homozigotluk" geçerlidir.

3Resiprokal Simpson indeks hesaplanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda Türkiye'de yerli sığır ırklarının genetiği ile ilgili proje ve çalışmalar yapılmasına rağmen bu çalışmalar tutarlı bir şekilde sürdürülememiştir. Bu yerli ırklar, Türkiye'deki biyoçeşitliliğin temel bileşenlerindedir ve dolayısıyla ulusal ve uluslararası düzeyde korunması gereken yerel gen kaynaklarıdır. Öte yandan, yerli ırklar, zorlu çevre koşulları ve düşük beslenme şartlarında hayatta kalmak için yüksek adaptasyon kabiliyeti sergiler. Bu çalışmada Türkiye'nin önemli yerli ırklarından olan Boz ve Yerli Kara sığırlarında CAPNI p.Ala316Gly polimorfizmine ait genetik varyasyon düzeyi araştırılmıştır. Bulgular incelendiğinde hem Boz hem de Yerli Kara ırkında CC genotipinin bulunmadığı görülmektedir. Benzer şekilde Simental ırkı sığırlarda yapılan bazı çalışmalarda da CC genotipi gözlenmemiştir.^{16,17} Li ve ark.¹⁷, bu genotipin aynı zamanda Hereford ve Limuzin ırklarında da bulunmadığını bildirmiştir. Ardıçlı ve ark.¹⁸ da Angus, Angus × Hereford × Nellore, Brahman, Hereford, Limuzin ve Şarole ırklarını içeren toplam 108 baş sığırdaki bu genotip frekansının sıfır olduğunu belirlemiştir. Curi ve ark.¹⁹, Nellore (Bos indicus) ve Nellore × Bos taurus melezlerinde yaptıkları çalışmada CAPNI 316 markörünü incelemiş ve Nellore, Angus × Nellore (1/2 B. taurus + 1/2 B. indicus), Canchim (5/8 B. taurus + 3/8 B. indicus), Brangus melezleri (9/16 B. taurus + 7/16 B. indicus) ve Braunvieh melezlerinden (3/4 B. taurus + 1/4 B. indicus) oluşan 300 baş sığırdaki CC genotipinin bulunmadığını bildirmiştir. Bu araştırmacılar aynı zamanda Rubia Gallega × Nellore sığırlarında G alelinin sabit olduğunu (G: 1); saf Nellore ırkında ise sabite yakın (G: 0,991) olduğunu göstermiştir. Boz ırkı sığırlarda bu polimorfizmin incelendiği bir çalışmada ise CC genotipi gözlenmiş ancak

bu genotipe ait frekansın son derece düşük (0,012) olduğu belirlenmiştir.²⁰ Araştırmacılar aynı zamanda bu çalışmada olduğu gibi G alel frekansının C aleline göre oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir (C: 0,11 ve G:0,8). Esasen, bu genetik markörün çeşitli sığır popülasyonlarında incelendiği birçok çalışmada, CC genotip frekansının diğer genotiplere göre oldukça düşük olduğunu bildirilmiştir.²¹⁻²⁷ Yukarıdaki bahsi geçen çalışmaların hepsinde CC genotipinin bulunmama ya da çok düşük frekansa sahip olma durumu doğal olarak C alel frekanslarında belirgin düşüşe neden olmuştur. Bu polimorfizm hakkındaki çalışmaların birçoğunda aynı zamanda GG genotipinin de yüksek frekansa sahip olduğu gözlenmiştir. Parra-Bracamonte ve ark.²⁸, Brahman sığırlarda benzer şekilde *CAPNI* 316 CC genotipinin bulunmadığını belirlemişler ancak beklenmedik şekilde yüksek bir heterozigot genotip frekansı (0,92) gözlemişlerdir. Alel ve genotip frekanslarının ırklar arasında ve hatta aynı ırkın farklı popülasyonları arasında değiştiği bilinmektedir.²⁹ Genotipik ve alelik frekanslar, çoğunlukla sığırların B. taurus veya B. indicus kökenli olmalarına göre de ayırt edici farklılıklar gösterebilmektedir. Ancak, *CAPNI* p.Ala316Gly polimorfizmindeki oldukça yüksek GG genotipi/G aleli frekansı ve son derece düşük CC genotip frekansının farklı ülke ve ırklardan sığırlarda (hatta melezlerde) genel bir gözlem olduğunu ifade etmek yanlış olmayacaktır.

Dominant alel frekansının 0,95'ten düşük olduğu durumlarda ilgili lokus polimorfik olarak kabul edilebilir.³⁰ Dolayısıyla bu çalışmada, incelenen *CAPNI* markörünün her iki ırk için de polimorfik olduğu görülmektedir. Ancak genotipik frekanslardaki dengesizlik, hem HWE testi için hem de popülasyon genetiği parametreleri ve biyoçeşitlilik indeksleri bakımından düşük varyasyon seviyelerinin elde edilmesine yol açmıştır. Bulgular ırk-spesifik değerlendirme ve tüm popülasyonda HWE'den sapma olduğuna işaret etmektedir. Genetik çalışmalarda, popülasyon genetiği parametreleri, belirli bir gen veya genlerdeki genetik varyasyon tarafından tanımlanan popülasyon yapısının değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.²³ Bu bağlamda, heterozigotluk seviyeleri, hayvanların yetiştirme dinamikleri bakımından ipuçları taşımaktadır. Örneğin; heterozigotluk seviyelerindeki belirgin bir şekilde azalması sürüdeki yükselen akrabalık durumunun bir sonucu olabilir. Bu durum suni tohumlamanın yaygın olarak kullanıldığı kültür ırklarında gözlenebileceği gibi; çoğunlukla ekstansif koşullarda beslenen yerli sığır ırklarında sürüdeki erkek sayısının sınırlı olduğu durumlar için de geçerli olabilir. Ne, popülasyonlarda lokus alel etkisinin etkinliğini ifade eder.³¹ PIC değerleri ise genetik markörlerin değerlendirildiği çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan indekstir. Bir

genetik markörün segregasyon analizindeki kullanışlılığı, onun polimorfizm bilgi içeriği ile doğrudan ilişkilidir.³² PIC değerleri düşük ($PIC < 0.25$), orta ($0.25 < PIC < 0.50$) ve yüksek ($PIC > 0.50$) olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır.¹³ Fıs ve %V değerleri de popülasyon dinamiklerinin değerlendirilmesinde önemli belirteçlerdir. Bu bilgiler ışığında, mevcut çalışma için *CAPNI* p.Ala316Gly markörünün hem ırk-spesifik hem de tüm popülasyon göz önüne alınarak yorumlandığında, düşük varyasyon seviyeleri ve popülasyon genetiği parametreleri bakımından da yetersiz değerde olduğu görülmektedir (Tablo 2). Yerli ırklarda verim özellikleri bakımından yapılacak seleksiyon uygulamalarının gerekliliği konusunda farklı görüşler mevcuttur. Ancak, bu çalışma *CAPNI* p.Ala316Gly markörünün Boz ve Yerli Kara ırkları için genetik varyasyon ve popülasyon genetiği temelinde çok sınırlı bir değere sahip olacağını göstermektedir. Ancak kesin bir yargıya varmak mevcut hayvan sayıları göz önüne alındığında doğru olmayacaktır.

Popülasyon genetiği endeksleri ile birlikte biyoçeşitlilik seviyeleri, analitik popülasyon dinamiklerinin önemli göstergeleridir. Biyoçeşitlilik indeksleri, nükleotit değişimlerinden türler veya daha büyük taksonomik birimler yoluyla ekosistemlere kadar çoklu genetik organizasyon seviyelerindeki varyasyonu tanımlamak için kullanılabilir.³³ Yerli sığır ırkları, yüksek verim odaklı yetiştirme programlarına uygun değildir ve bu nedenle sayıları giderek azalmaktadır. Fakat yine bu nedenle bu ırklar, kantitatif özellikler yönünden ya hiç ya da çok düşük seleksiyon baskısına tabi tutulmaktadır. Bu durum ise genetik varyasyonu korumalarını mümkün kılmaktadır. Ancak bu çalışmada her iki ırk için de düşük biyoçeşitlilik indeks seviyeleri hesaplanmıştır. Bu durumun popülasyondaki bireylerin birçoğunun tek bir genotipte yoğunlaşmasının bir yansıması olduğu görülmektedir (GG genotipi taşıyan hayvan sayısı Boz ve Yerli Kara ırklarında sırasıyla 73 ve 31'dir).

Sonuç olarak, bu çalışmada *CAPNI* p.Ala316Gly polimorfizminin genetik varyasyon düzeyleri Boz ve Yerli Kara ırkı sığırlarda ortaya konmuştur. Elde edilen veriler, bu ırklar için incelenen *CAPNI* markörünün sınırlı düzeyde varyasyon seviyelerine sahip olduğunu ve herhangi bir genotip-fenotip ilişkisi analizi için yetersiz olabileceğini göstermiştir. Literatürde, *CAPNI* p.Ala316Gly polimorfizmi CC genotipinin özellikle et kalitesi ile önemli düzeyde ilişkisi olduğu ve besi sığırı yetiştiriciliğinde bu genotipin frekansını artırmak amacıyla seleksiyon yapıldığı görülmektedir. Çoğunlukla ekstansif koşullarda yetiştirilen yerli sığır ırkları, kültür ırklarındaki gibi yoğun bir seleksiyon baskısına maruz kalmamaktadır. Bu nedenle temelde et kalitesine olumlu etkileri nedeniyle yapılan seleksiyona bağlı

olarak besi sığırlarındaki frekansı göreceli olarak artırılan CC genotpinin Boz ve Yerli Kara sığırlarda gözlenmemiş olması sürpriz değildir. Daha güvenilir sonuçlar için daha geniş popülasyonlarda genetik analizlerin yapılması uygun olacaktır. Ancak, bu ırklara ait saf bireylerin sayısının her geçen gün azaldığı göz önüne alındığında, verilerin hem yerli sığır ırklarında yapılacak sonraki genetik çalışmalara hem de bu ırkların genetik karakteri hakkındaki mevcut bilgiye katkı sunabileceği düşünülmektedir. Yerli sığır ırkları, Türkiye'nin biyoçeşitliliğinin önemli unsurları ve aynı zamanda ulusal gen kaynaklarımızdır. Yerli ırklarda yapılan genetik analizlerdeki temel amaç, verim özelliklerinin artırılmasına yönelik seleksiyon çalışmaları değil; büyüme ve gelişme, üreme özellikleri ve direnç mekanizmaları gibi kompleks fenotipik özelliklerin genetik altyapısı hakkında bilgi edinmek ve yerli ırkların genetik özelliklerini/farklılıklarını ortaya koymaktır. Avrupa sığır ırklarının geliştirilmesinde de önemli katkıları olan bu ırklarda yapılan moleküler genetik çalışmaların yaygınlığı Türkiye'de artırılmalı ve genom düzeyinde ayrıntılı çalışmalar yapılmalıdır.

Beyan

Bu çalışma, "III. International Agricultural, Biological, and Life Science Conference (AGBIOL 2021)" isimli kongrede sözlü bildiri olarak sunulmuştur (1-3 Eylül 2021, Edirne, Türkiye).

Kaynaklar

1. Page B, Casas E, Heaton M, et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 2002;80(12):3077-3085.
2. Smith T, Casas E, Rexroad Iii C, Kappes S, Keele J. Bovine *CAPNI* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of Animal Science* 2000;78(10):2589-2594.
3. Ensembl genome browser. 2022 [cited 18.03.2022]; Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>
4. Casas E, White S, Riley D, et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science* 2005;83(1):13-19.
5. Pintos D, Corva P. Association between molecular markers for beef tenderness and growth traits in Argentinian angus cattle. *Animal Genetics* 2011;42(3):329-332.
6. Kappes SM, Keele JW, Stone RT, et al. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 1997;7(3):235-249.
7. Solinas-Toldo S, Lengauer C, Fries R. Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* 1995;27(3):489-496.
8. Warner R, Wheeler TL, Ha M, et al. Meat tenderness: Advances in biology, biochemistry, molecular mechanisms and new technologies. *Meat Science* 185 (2022):108657.
9. White S, Casas E, Wheeler T, et al. A new single nucleotide polymorphism in *CAPNI* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *Journal of Animal Science* 2005;83(9):2001-2008.
10. Laben R, Shanks R, Berger P, Freeman A. Factors affecting milk yield and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 1982;65(6):1004-1015.
11. Green MR, Sambrook J. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. p. 47-48.
12. Falconer DS, Mackay TFC. *Introduction to quantitative genetics*, Pearson Education Ltd, Harlow, England; 1996.
13. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 1980;32(3):314-331.
14. Crow JF, Kimura M. *Properties of a finite population. An introduction to population genetics theory*. Caldwell, New Jersey: The Blackburn Press; 1970. p. 319-365.
15. Nei M, Roychoudhury A. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 1974;76(2):379-390.
16. Ardıçlı S, Dincel D, Samli H, Balci F. Effects of polymorphisms at *LEP*, *CAST*, *CAPNI*, *GHR*, *FABP4* and *DGAT1* genes on fattening performance and carcass traits in Simmental bulls. *Archives Animal Breeding* 2017;60(2):61-70.
17. Li X, Ekerljung M, Lundström K, Lundén A. Association of polymorphisms at *DGAT1*, *leptin*, *SCD1*, *CAPNI* and *CAST* genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Science* 2013;94(2):153-158.
18. Ardıçlı S, Ustüner H, Arslan Ö, Kandazoğlu O. Variability of *CAPNI* g. 5709 C> G and *MYF5* g. 1911 A> G Polymorphisms in Beef Cattle Imported from Brazil to Turkey. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2019;59(2):72-78.
19. Curi RA, Chardulo LAL, Giusti J, Silveira AC, Martins CL, de Oliveira HN. Assessment of *GH1*, *CAPNI* and *CAST* polymorphisms as markers of carcass and meat

- traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*–*Bos indicus* cross beef cattle. *Meat Science* 2010;86(4):915-920.
20. Kök S, Atalay S, Eken HS, Savasci M. The genetic characterization of Turkish grey cattle with regard to UoG Cast, *CAPNI* 316 and *CAPNI* 4751 markers. *Pakistan Journal of Zoology* 2017;49(1):281-287.
 21. Allais S, Journaux L, Levéziel H, et al. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science* 2011;89(1):1-11.
 22. Ardıçlı S, Samli H, Dincel D, Soyudal B, Balci F. Individual and combined effects of *CAPNI*, *CAST*, *LEP* and *GHR* gene polymorphisms on carcass characteristics and meat quality in Holstein bulls. *Archives Animal Breeding* 2017;60(3):303-313.
 23. Ardıçlı S, Samli H, Vatansever B, Soyudal B, Dincel D, Balci F. Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein–Friesian bulls. *Archives Animal Breeding* 2019;62(1):9-32.
 24. Miquel MC, Villarreal E, Mezzadra C, et al. The association of *CAPNI* 316 marker genotypes with growth and meat quality traits of steers finished on pasture. *Genetics and Molecular Biology* 2009;32(3):491-496.
 25. Bonilla C, Rubio M, Sifuentes A, et al. Association of *CAPNI* 316, *CAPNI* 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genetics and Molecular Research* 2010;9(4):2395-2405.
 26. Gill JL, Bishop SC, McCorquodale C, Williams JL, Wiener P. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution* 2009;41(1):1-12.
 27. Van Eenennaam A, Li J, Thallman R, et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science* 2007;85(4):891-900.
 28. Bracamonte MP, Rincón AMS, Rivas EGC, Medhin AT, Gonzalez JCM. Polymorphism in Calpain gene of registered Brahman cattle from Mexico. *Latin American Archives of Animal Production* 2007;15(1):33-38.
 29. Carvalho TDd, Siqueira F, Torres Júnior RAdA, et al. Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2012;41(10):2162-2168.
 30. Menezes MPC, Martinez AM, Ribeiro MN, Pimenta Filho EC, Bermejo JVD. Genetic characterization of Brazilian native breeds of goats using 27 markers microsatellites. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2006;35:1336-1341.
 31. Trakovická A, Moravčíková N, Kasarda R. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. *Acta Biochimica Polonica* 2013;60(4): 783-787.
 32. Machado MA, Azevedo ALS, Teodoro RL, et al. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*). *BMC Genomics* 2010;11(1):1-11.
 33. Konopiński MK. Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ* 2020;8:e9391.