

Eskişehir Yöresinde Yetiştirilen Ve Çoğuz Kuzulayan Koyunlarda *FecB* Geni Mutasyonunun
Araştırılması

Mahamat HAMDAN ABDE RAHİM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Haziran 2022

Investigation of The *FecB* Gene Mutation Prolific Ewes Raised in Eskisehir Region

Mahamat HAMDAN ABDERAHİM

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

June 2022

Eskişehir Yöresinde Yetiştirilen Ve Çoğuz Kuzulayan Koyunlarda *FecB* Geni Mutasyonunun
Araştırılması

Mahamat HAMDAN ABDERAHİM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Muhammet KAYA

Bu tez, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu (Proje No: FLY-2021-1594) tarafından desteklenmiştir.

Haziran 2022

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Muhammet KAYA danışmanlığında hazırlamış olduğum ‘Eskişehir yöresinde yetiştirilen ve çoğuz kuzulayan koyunlarda *FecB* geni mutasyonunun araştırılması’ başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu: tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığıma: tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğime; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 24.06.2022

Mahamat HAMDAN ABDERAHİM

İmza

ÖZET

Moleküler genetikteki son gelişmelerle birlikte, tüm çiftliklerde ve özellikle besi hayvanı çiftliklerinde, giderek artan bir şekilde üreme performansı yüksek hayvanların seçimi, sürünün hızlı büyümesi üzerinde büyük bir etki yaratmıştır. Bu konuda hayvanların üretkenliği en önemli faktörlerden biridir. Koyunlarda farklı veya aynı ırklar arasında doğumda kuzu sayısında (çoğuz doğurganlık) büyük farklılıklar gözlemlenebilmektedir. Booroola geni, diğer adıyla, *BMPR-1B*, tek bir nükleotid değişimi ile oluşan bir mutasyondur. Koyunlarda döl verimini etkileyen *FecB* mutasyonu yumurtlama oranı için eklemeli, bir doğumdaki kuzu oranı için kısmi dominant etkilidir. *FecB* geninin, tek bir gen kopyasıyla yumurtlama oranını ve doğumdaki kuzu sayısını arttırdığı belirlenmiştir.

Bu çalışma, Eskişehir İlinde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu'nun elit sürülerinde ikiz veya üçüz kuzulmuş koyunların *BMPR1-B* geninin 7. ekzonu üzerindeki polimorfizmleri DNA dizi analizi yöntemi ile araştırarak ıslahına yardımcı olmak amaçlanmıştır. Yapılan araştırma sonucunda incelenen koyunların *FecB* mutasyonuna sahip olmadıkları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çoğuz kuzulama, DNA dizi analizi, *FecB*, Koyun.

SUMMARY

With recent advances in molecular genetics, the selection of animals with high reproductive performance on all farms, and especially livestock farms, has gained a great influence on the rapid growth of the herd. The productivity of animals is one of the most important factors in this regard. In sheep, large differences can be observed in the number of lambs at birth (multiple fertility) between different or same breeds. The Booroola gene, also known as *BMPR-1B*, is a mutation that occurs with a single nucleotide change. It is additive for ovulation rate and partially dominant for lamb rate per birth, with the *FecB* mutation affecting fertility in sheep. It has been determined that the *FecB* gene increases the ovulation rate and the number of lambs at birth with a single gene copy.

In this study, it was aimed to help the breeding of twin or triple lamb ewes in the elite herds of Central Anatolian Merino bred in Eskişehir province by investigating polymorphisms on the 7th exon of the *BMPR- 1B* gene by DNA sequence analysis method. As a result of the research, it was determined that the examined sheep did not have the *FecB* mutation.

Keywords: DNA sequence analysis, fecundity gene, *FecB*, sheep.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vi
SUMMARY.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Türkiye yerli koyun ırkları	4
2.2. <i>FecB</i> geni ve çoğuz kuzulamada etkisi	6
2.3. <i>BMP15</i> Geni.....	10
2.4. <i>GDF9</i> Geni	10
2.4.1. Dünyada yapılan <i>FecB</i> polimorfizm çalışmaları	13
2.4.2. Türkiye’de yapılan <i>FecB</i> çalışmaları.....	13
2.5. DNA dizi analizi.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Hayvan materyali.....	16
3.1.2. Araç ve gereçler.....	16
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Kan örneklerinin alınması	18
3.2.2. Genomik DNA izolasyonu	18
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu	19
3.2.4. DNA dizi analizi.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5. Genotiplerin belirlenmesi ve gen frekanslarının hesaplanması	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Genomik DNA İzolasyonu	22
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	24
4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçları	24
4.3.1. <i>FecB</i> alleli (Missensen mutasyon).....	26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

4.1. Saflaştırılan DNA örneklerinin %2'lik agaroz jelde kontrolleri.	22
4.2. 300 bç uzunluğundaki PCR ürünlerin agaroz jelde (%2'lik) kontrolü (M, 50 bç Fermentas® GeneRuler SMO241 DNA Marker).	24
4.3. <i>FecB</i> geni 7. ekson üzerinde belirlenen dört SNP noktası	25
4.4. İncelen örneklerde görülen <i>FecB</i> ++ alleli (6:34010859 nüklottteki SNP)	27
4.5. Bazı örneklerin <i>FecB</i> ekson 7 dizi analizi sonuçları	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

1.1.Dünya koyun popülasyonunun yüksek olduğu ülkeler	2
2.1. Eskişehir ilçelerinin koyun sayıları	5
2.2. <i>BMP1B</i> genindeki ovulasyon ve kuzu sayısını etkileyen mutasyonlar.	8
2.3. Dünyada <i>FecB</i> allelinin bulunduğu koyun ırkları	9
2.4. <i>GDF9</i> , <i>BMP15</i> , ve <i>B4GALNT2</i> 'nin farklı koyun ırklarında görülen mutasyonları	12
3.1. Laboratuvarda bulunan ve projede kullanılan araç ve gereç listesi.	17
3.2. Kullanılan primer çifti	19
3.3. PCR çalışmasında kullanılan çözelti içeriği.	20
3.4. PCR döngüleri.	20
4.1 Örneklerin DNA miktar ve kalite değerleri.....	23

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
Ph	Asitlik Derecesi
°C	Derece
L	Litre
g	Gram
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
<i>B4GALNT2</i>	Beta-1,4-N-Asetil-Galaktozaminil Transferaz 2
<i>BMP15</i>	Kemik Morfogenetik Protein 15
<i>BMPR1B</i>	Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü Tip-1B
<i>GDF9</i>	Büyüme Farklılaşma Faktör 9
bç	Baz çifti
A	Adenin
G	Guanin
bd	Bidestile su
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
C	Sitozin
ddNTP	Dideoksinükleotitle

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit
HIRA	Histon Hücre Döngüsü Düzenleyicisi
INHBB	İnhibin Alt Birim Beta-B
Kb	Kilobaz
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikada döngü sayısı
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SSCP	Tek İplikli Konformasyon Polimorfizmi
T	Timin
TE	Tris-EDTA
UV	Ultra Violet
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
μl	Mikrolitre
<i>FecB</i>	Fekondite geni

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde, özellikle gelişmekte olan ülkelerde; nüfusun artması nedeniyle hayvansal ürünlere olan talep artmakta ve artan talebi karşılamak için hayvanların verimlerinin artırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. 2020 istatistiklerine göre Türkiye'de kişi başına günlük alınan protein miktarı son 30 yılda önemli bir değişiklik göstermemiş ve 2016-2018 yılları arasında 110 gr civarında olmuştur. Bu değer (82,73 g) dünya ortalamasına yakın olup gelişmiş ülkeler ortalaması ile aynı seviyededir. Ancak gelişmiş ülkelerden farklı olarak Türkiye'de tüketilen proteinin büyük bir kısmı (%65,29) bitkisel kökenlidir. Gelişmiş ülkelerde ise kişinin günlük tükettiği proteinin yarısından fazlasını hayvansal proteinler oluşturmaktadır (Betül, 2021).

Türkiye'de ve dünya genelinde koyun yetiştiriciliği önemli bir sektördür. Türkiye hayvansal üretim istatistikleri 2021 yılı verilerine göre ülkede 45.177.690 baş koyun bulunmaktadır (TUİK, 2022). Türkiye koyun mevcuduna göre dünya sıralamasında 7. sırada ve Avrupa'da ise ilk sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1) (Hülya, 2020). Verilere göre Türkiye, hayvan sayısı açısından ön sıralarda yer almasına rağmen, yerli ırk sayısının fazla olması ve bu ırkların verimlerinin düşük olması nedeniyle hayvansal ürün üretimi açısından daha geride kalmıştır.

Hayvancılık ekonomik bir süreçtir ve temel amacı verimliliği ve karlılığı artırmaktır. Ancak artan hayvan yem fiyatları ve bakımları göz önüne alındığında, ulusal koyun sürüsündeki keskin artış, yetiştiricilerin ekonomik durumunu etkilemektedir. Bu sorunu aşmak için yüksek performanslı hayvanların seçilmesi gerekmektedir. Yetiştiriciler koyun sürülerinde seleksiyon yaparken ovulasyon oranı, bir doğumda kuzu sayısı, süt verimi ve kuzulama aralığı gibi özelliklere önem vermektedir.

Koyunlarda yumurtlama oranı ve doğum başına düşen kuzu sayısı, doğurganlık özelliği için büyük öneme sahiptir (Yuqing vd., 2019). Ovulasyon oranı ve doğumda kuzu sayısı

üzerinde önemli etkileri olan fekondite (çoğuz gebelik) genlerinin veya mutasyonlarının tanımlanması ve kullanılması, koyun yetiştiricileri ve bilim adamları arasında büyük ilgi uyandırmıştır. Majör çoğuz gebelik genlerinin sürüye entegre edilmesinin amacı, verim özelliklerini olumlu yönde etkileyen gen bölgelerinin yeni sürülere aktarıp daha performanslı ırklar-hatlar elde etmektir.

Çizelge 1.1.Dünya koyun popülasyonunun yüksek olduğu ülkeler (VGraphs, 2022)

Sıra	Ülke	Koyun popülasyonu
1.	Çin	173,095,300
2.	Hindistan	68,099,760
3.	Avustralya	63,529,370
4.	Nijerya	47,743,810
5.	İran	46,587,010
6.	Etiyopya	42,914,860
7.	Türkiye	42,126,780
8.	Sudan	40,946,060
9.	Çad	38,705,280
10.	İngiltere	32,697,000
11.	Pakistan	31,225,000
12.	Cezayir	30,905,560
13.	Moğolistan	30,049,430
14.	Yeni Zelanda	26,028,940
15.	Kenya	25,325,930
16.	Fas	22,088,800
17.	Güney Afrika	21,604,710
18.	Rusya	20,654,960
19.	Brezilya	20,628,700
20.	Mali	20,142,680

Bazı koyun ırklarında ovulasyon oranını ve doğum başına kuzu sayısını artıran bazı genler tespit edilmiştir. Bu genler arasında Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü Tip-1B

(Bone Morphogenetic Protein Receptor Type-1B, *BMPR-1B*), Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (Growth Differentiation Factor 9, *GDF9*), Kemik Morfogenetik Protein 15 (Bone Morphogenetic Protein 15, *BMP15*) ve Beta-1,4-N-Acetylgalactosaminyl Transferase 2 (*B4GALNT2*) bulunur (Pokharel, 2020). 1980’li yıllarda *FecB*, koyunlarda ovulasyon oranını artırmak için tanımlanan ilk majör gendir (Davis vd., 1982). Türkiye’de majör genlerin üzerinde yapılan çalışmalar vardır; ancak bu çalışmalarda mutasyon saptanmamıştır (Özen, 2006; Karlı vd., 2011; Feraye vd., 2011; Deniz vd., 2015; Çelikeloglu vd., 2018).

Türkiye’de yetiştirilen yerel ırkların ıslahı, performansı yüksek ırklarla melezlenerek verimlerinin artırılması yönündedir ve böylece daha yüksek verime sahip melez ırk-hatlar elde edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında araştırılan Orta Anadolu Merinosu, Alman Et Merinos ırkı ile Akkaraman melezlemesi sonucunda elde edilmiştir. Orta Anadolu Merinosu yaklaşık %80 Alman Et Merinosu ve %20’si Akkaraman genotipine sahip bir ırktır. Vücut rengi genelde beyaz olup uzun, ince ve yağsız kuyrukludur. Geniş vücut yapılı, yüzün yanları ve bacakların içi yapağı kaplı değildir. Koyun ve koçlar genelde boynuzsuzdur. Orta Anadolu Merinosu, Akkaraman ırkından daha iridir ve verim özellikleri şunlardır: Doğumda kuzu sayısı: 1,5, kuzu doğum ağırlığı: 4,4 kg, ergin canlı ağırlığı: 55-90 kg, laktasyon döneminde süt verimi: 60-70 kg ve laktasyon dönemi 150 gün sürmektedir. Akkaraman ırkına göre daha büyük ve her yönde daha verimli bir ırktır (Akçapınar ve Ünal, 2001).

Bu tez çalışmasında, Eskişehir İlinde Orta Anadolu Merinosu Koyun Irkının Halk Elinde Islahı Alt Projesinde yetiştirilen Orta Anadolu Merinosu ırkının ıslah çalışmalarına yeni bir yön vermek için, moleküler genetik metotları kullanarak fertilitite, doğumda kuzu sayısını artıran yüksek genetik değerli *FecB* genotipine sahip koyunların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Koyun (*Ovis*), keçilerle birlikte *Caprinae* alt familyasındaki bir memeli cinsidir. Yerli koyunlar coğrafi ve popülasyon açısından en yaygın türdür, ancak birçok yabancı tür de *Ovis* cinsine aittir. Koyun (*Ovis aries*), bir geviş getiren hayvan türüdür. Ruminantia alt takımında *Bovidae* familyasına ait olan *Ovis* cinsinin en yaygın türüdür. İlk evcilleştirilen hayvanlardan biri olan koyun, yapağı, süt ve et için yetiştirilir. Koyun yapağı, yünlü giysiler yapmak için kullanılır. Erkek evcil koyuna koç, yavrusuna kuzu denir. Bilimsel sınıflandırmada yeri şu şekildedir (Fournier, 2006; Ensminger vd., 1986).

Âlem:	Animalia	Familya:	Bovidae
Şube:	Chordata	Alt familya:	Caprinae
Sınıf:	Mammalia	Cins:	Ovis
Takım:	Artiodactyla	Tür:	<i>Ovis aries</i>

Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 31.12.2020 tarihinde yaptığı bir istatistikte en yüksek koyun sayısına sahip 20 ülke sayılmıştır. Bu listenin başında Çin yer alırken, Türkiye Çin, Hindistan, Avustralya, Nijerya, İran ve Etiyopya'nın ardından yedinci sırada yer almıştır (VGraphs, 2022). Koyun popülasyonun en yüksek olduğu ülkeler Çizelge 1.1 (Bkz)'de verilmiştir.

2.1. Türkiye yerli koyun ırkları

TÜİK Hayvansal üretim istatistikleri 2021 yılı verilerine göre, Türkiye 45.177.690 baş koyun sayısına sahiptir. Türkiye'deki 45.177.690 baş koyundan 3.994.791 başının merinos ırkına ait olduğu bildirilmiştir (TÜİK, 2022).

Eskişehir’de ise 1.156.522 baş koyunla 81 il arasında 15. sırada yer almaktadır. 380.648 baş koyun varlığıyla Eskişehir’in Sivrihisar ilçesinin en fazla koyun yetiştirilen ilçe olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.1) (Eskişehir Tarım ve Orman Müdürlüğü, 2021).

Bugün dünyada birçok koyun ırkı neslinin tükenme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Türkiye’de bazı yerli ırklar tam olarak tanımlanmadan ortadan kaybolmuştur. Bazıları da yok olma tehlikesiyle koruma altına alınmıştır (Mehmet vd., 2009). Türkiye’de yetiştirilen koyun ırkları şunlardır: Akkaraman, Morkaraman, Kangal Akkaraman, İvesi, Dağlıç, Kıvırcık, Sakız, Anadolu Merinosu, Karacabey Merinosu, Karayaka, Ramlıç, Pırlak, Pırıt, Karya, Polatlı Koyunu, Bafra Koyunu, Şavak Akkaraman, Tahirova, Koçeri, Zom, Karakaş Koyunu, Eşme Koyunu, Norduz Koyunu, Gökçeada, Acıpayam, Malya, Hemşin, Herik, Tuj, Karagül, Güney Karaman, Çine Çaparı ve Orta Anadolu Merinosu (Anonim, 2022).

Çizelge 2.1. Eskişehir ilçelerinin koyun sayıları ((Eskişehir Tarım ve Orman Müdürlüğü, 2021)

İlçe adı	Koyun varlığı (baş)
Alpu	84.486
Beylikova	53.115
Çifteler	109.111
Günyüzü	58.534
Han	14.213
İnönü	29.155
Mahmudiye	41.887
Mihalgazi	1.830
Mihalıççık	82.782
Odunpazarı	69.795
Sarıcakaya	7.334
Seyitgazi	79.555
Sivrihisar	380.648
Tepebaşı	144.077
TOPLAM	1.156.522

Araştırmamızda materyal olarak seçilen Orta Anadolu Merinosu ırkı, 1952 yıllarında Türkiye'ye getirilen Alman Et Merinos ırkı ile Akkaraman çevirme melezlemesi sonucunda elde edilmiştir. Yapağı yaklaşık %75-80 Alman Et Merinosu ve yaklaşık % 20-25 Akkaraman genotipine sahip bir ırktır (Anonim, 2018).

2.2. *FecB* geni ve çoğuz kuzulamada etkisi

1940'lı yıllarda, Avustralya'daki bir koyun sürüsünün sahipleri olan Jack ve Dick Sears kardeşler, koyunlarının komşularınıninkinden daha fazla çoklu doğum yaptığını fark etmişlerdir. (Fahmy ve Castonguay, 1991). 1958 yılında Common Wealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) tarafından bir araştırma projesi başlatılmıştır. Proje sürüsü üçüz veya dördüz olarak doğan 12 koyun ve Sears kardeşlerin projeye bağışladığı beşli doğan bir koçla oluşturulmuştur (Turner, 1978). Booroola Merinosu'ndaki yüksek üretkenliğin kökeninin 18. yüzyılın sonlarında Hindistan'dan Avustralya'ya getirilen Bengal veya Cape koyunlarından geldiği sonucuna varılmıştır (Turner, 1982).

Bilim adamları başlangıçta geni Fecundity (çoğuz gebelik) genleri olarak adlandırıp, lokus ve allele *Fec* sembolü atamışlardır. Daha sonra, koyunlarda fekdite üzerinde önemli etkileri olan başka gen ve alleller ortaya çıkınca, bulunduğu Booroola popülasyona atfen lokus *FecB* olarak yeniden adlandırılmış ve sembolü *FecB* olarak değiştirilmiştir (Yılmaz ve Wayne, 2013).

Booroola mutasyonu (*FecB* veya *B*) Activin Like Kinase 6 (*ALK-6*) olarak da bilinen ve koyun kromozom 6 üzerinde yer alan *BMPR-1B*-geninde tek bir nükleotid değişimi sonucu oluşmuştur. *BMPR-1B* geni, 7. ekzonda yer alan (GenBank accession No. NC_040257.1; Ensembl ENSOART00020031365.1:c836 A>G;) 746 konumundaki Adenin nükleotidinin Guanin (A>G) ile değişmesidir. Yabanıl koyunlarda (*FecB++*) bu noktadan kodlanan Glutamin amino asidi Booroola geni taşıyan koyunlarda (*FecB^{BB}*) Arginin'e dönüşmüştür. Yumurtlama oranı heterozigotluk durumunda 1,3-1,72 artarken, homozigot mutasyon durumunda 2,7-3,0 artmıştır. Doğumu gerçekleşen kuzu sayısında ise heterozigot mutasyon durumunda 0,9-1,32 artarken, homozigotluk durumunda 1,1-1,7 kat artırdığı belirlenmiştir (Koray vd., 2018).

Goodwine (2020) çalışmasında, *FecB* genin 7. ekzonunda 199T ve 250T olmak üzere, iki farklı mutasyon, ayrıca 8. ekzonda T250K ile 9. eksonda 288Y aminoasit pozisyonlarında başka mutasyonların tespit edildiğini bildirmiştir (Çizelge 2.3). *BMPR1B* geninde ekson 8 için İran'da Mehraban (Abdoli vd., 2013), ekson 9 için ise Çin'de Dorset, Mongolian, Small-Tail Han koyun ırklarında mutasyonlar belirlenmiştir (Jia vd., 2019).

Jia vd. (2019) yürüttükleri çalışmada, (BMPR-1B) geninin (C864T) ekson-9'unda bir polimorfizm ilişkisini ortaya koymayı amaçlamıştır. PCR-SSCP yöntemi kullanarak inceleme yapılmıştır. Çin'in Huajia çiftliğinde yetiştirilen ırklardan Dorset 240 baş, Mongolian ırkından 232 baş ve kısa kuyruklu Han koyundan 124 baş, toplam 596 baş koyundan kan örneği alınmıştır. BMPR-1B geninin C864T mutasyonu, tekiz, ikiz ve çoklu doğumları önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Sonuç olarak çalışmada, BMPR-1B geninin ekson-9'undaki heterozigotluk, incelenen tüm koyunlar için yavru sayısının artmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

Abdoli vd. (2013) çalışmalarında İran'da Mehraban koyun ırkından *BMPR-1B* ekson 8 ve *GDF9* ekson 1 genlerinde mutasyon olup olmadığını araştırılmıştır. Materyal olarak 100 baş Mehraban koyunlarından kan örneği alınmıştır ve PCR-SSCP yöntemi kullanarak *BMPR-1B* ekson 8 ve *GDF9* ekson 1 polimorfizmleri araştırılmıştır. BMPR-1B geninden (CC ve CA genotipleri) tek bir aminoasit değişimini ortaya çıkaran iki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır. BMPR-1B ekson 8 için iki farklı ikincil protein yapısı görülmüştür. Sonuçlar BMPR-1B ekson 8 genotiplerinin bazı üreme özellikleri üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. BMPR-1B ekson 8'in CA genotipi, üreme performansı üzerinde önemli bir pozitif etkiye sahiptir ve yeni bir mutasyon olarak kabul edilmiştir.

Hindistan'daki *FecB* kaynağı olarak bilinen Garole ırkından, Javanese (Endonezya) ve Booroola (Avustralya), Bonpala, Deccani, Kendrapada, Nellore Nilagiri, Shadabadi, (Hindistan) koyunlarına yayılmıştır. Çin'de ise *FecB* kaynağı Hu ırkından Small-Tail Han, Duolang, Zeller black, Vadi, Mongolian, Cele black, Altay, Bayanbulak ırklarına yayıldığı düşünülmektedir (Davis, 2009).

Çizelge 2.2. *BMPR1B* genindeki ovulasyon ve kuzu sayısını etkileyen mutasyonlar (Pokharel, 2020).

Gen	Allel	Ekzon	Mutasyon	Bulunduğu ırk
<i>BMPR-1B</i>	<i>FecB</i> Booroola	7.Ekzon	Q249R	-Booroola Merinosu (Avusturalya). -Small-Tail Han, Hu, Duolang, Zeller black, Vadi, Mongolian, Cele black, Altay, Bayanbulak (Çin). -Javanese (Endonezya). - Garole, Bonpala, Kendrapada, Nilagiri, Shadabadi, Deccani, Nellore (Hindistan). - Kalehkoohi, Mehraban (İran)
			199T	- Kalehkoohi (İran)
			250T	-Mehraban (İran)
		8. Ekzon	T250K	-Mehraban (İran)
		9.Ekzon	288Y	-Dorset, Mongolian, Small-Tail Han (Çin)

Booroola Merinos cinsi koyunlar ve dolayısıyla *FecB*, Avustralya ve Yeni Zelanda'dan Fransa, Kanada, İsrail, Güney Afrika, Uruguay, ABD, İngiltere, Almanya, Macaristan, Polonya, Çekoslovakya ve İspanya'ya canlı hayvanlar, embriyolar veya sperma olarak ihraç edilmiştir (Davis, 2009). Booroola Merinos'larda üretkenlik için önemli bir gen olduğuna dair kanıtlara dayanarak, bu koyunların melezleme programlarında kullanılmasına yönelik büyük bir uluslararası ilgi vardır. *FecB*'nin halen 19 ülkede en az 48 koyun ırkında olduğu bilinmektedir (Çizelge 2.4).

TGF Beta ailesinin üç ana geni olan *GDF9*, *BMP15* ve *BMPR1B*'deki ve daha yakın zamanlarda bulunan *B4GALNT2*'deki çeşitli mutasyonlar ve diğer polimorfizmlerin, farklı koyun ırklarında yumurtlama oranını ve doğumdaki kuzu sayısını etkilediği bilinmektedir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.3. Dünyada *FecB* allelinin bulunduğu koyun ırkları (Davis, 2009)

No	Koyun Irkı	Bulunduğu ülke
1	Merino	Avustralya, Yeni Zelanda, Şili, Uruguay
2	Romanov	Fransa, Kanada
3	South Australian Merino	Avustralya
4	Border Leicester	Avustralya, Yeni Zelanda
5	BLM (Border Leicester–Merino)	Avustralya
6	Romney	Yeni Zelanda, Birleşik Krallık, Brezilya
7	Columbia	ABD, Kanada
8	German Mutton Merino	Almanya, Belçika
9	Scottish Blackface	Birleşik Krallık
10	Merinos d’Arles	Fransa
11	DLS (Dorset–Leicester–Suffolk)	Kanada
12	Finn	Kanada, ABD
13	Dorset Horn	Avustralya, Kanada, Birleşik Krallık
14	Ile de France	Birleşik Krallık
15	Columbia	ABD, Kanada
16	German Mountain	Almanya
17	Hyfer (Dorset–Merino)	Avustralya
18	Suffolk	Birleşik Krallık, ABD, Şili, Kanada
19	Polypay	Kanada
20	Small Tail Han	Çin
21	Assaf	İsrail
22	Borderdale	Avustralya
23	Merinoland	Almanya
24	Corriedale	Yeni Zelanda, Polonya, Uruguay
25	Olkuska	Polonya
26	Western Whiteface	ABD
27	Czechish Merino	Çekoslovakya
28	Dohne Merino	Güney Afrika
29	Polwarth	Uruguay
30	Targhee	ABD
31	Rambouillet	ABD, Kanada
32	Awassi	İsrail
33	Perendale	Yeni Zelanda
34	Welsh Mountain	Birleşik Krallık
35	Cheviot	Birleşik Krallık
36	Texel	Hollanda, Belçika, Birleşik Krallık
37	Poll Dorset	Yeni Zelanda
38	German Blackhead Mutton	Almanya
39	Hungarian Merino	Macaristan
40	Polish Merino	Polonya

2.3. *BMP15* Geni

BMP15 olarak da bilinen *GDF9* (*FecX*) geni koyunlarda folikül gelişimi için önemli ve büyük bir gendir. *TGFβ* süper ailesinin bir üyesidir. Koyunlarda foliküler gelişimi destekleyen ve ovaryum kökenli büyüme faktörü olan bone morphogenetic protein 15'i (*BMP15*) kodlayan bir gendir. *FecX* koyunlarda X kromozomu üzerinde yer alır ve yaklaşık 5400 nükleotit olan bir intron ile ayrılmış iki eksondan oluşur. *BMP15*, foliküllerin büyümesini desteklediği için koyunlarda yumurtlama ve gebelik sayısının belirlenmesinde önemli rol oynar, ancak yumurtlama öncesi aşamadaki gelişimini engeller. X kromozomu üzerinde bulunduğu için erkekler bu genin bir kopyasını taşıyabilir (Koray vd., 2018).

Yapılan çalışmalarda *BMP15* geninde sekiz farklı mutasyon tespit edilmiştir. Bunlar bulundukları popülasyona göre adlandırılmıştır: Rasa Aragonesa koyunlarında *FecX^R*, Galway koyunlarında *FecX^G*, Lacaune koyunlarında *FecX^L*, Romney koyunlarında *FecX^I*, *FecX^H*, Grivette koyunlarında *FecX^{Gr}*, Olkaska koyunlarında *FecX^O* ve Belclare koyunlarında *FecX^B* (Gürsel, 2009).

BMP15 geni için, *FecX^L*, *FecX^H*, *FecX^G*, *FecX^B*, *FecX^L* ve *FecX^R* mutasyonlarını heterozigot olarak taşıyan koyunların yumurtlama oranının artacağı ve kuzu sayısının artacağı homozigot durumunda ise kısırılık sorunlarına neden olacağı bildirilmiştir. *FecX^{Gr}* ve *FecX^O* mutasyonlarını homozigot olarak taşıyan koyunların doğum oranlarının arttığı belirtilmiştir (Kaczor, 2017).

2.4. *GDF9* Geni

GDF9 geni de koyunlarda yumurtlama ve doğum oranını etkilemektedir. Koyunların 5. kromozomunda 2,5 kb büyüklüğünde bir intron ve iki ekzondan ve bunların kodladığı 453 amino asitten oluştuğu bildirilmiştir. *GDF9* geninde çeşitli mutasyonlar (Çizelge 2.5) tanımlanmıştır; *FecG^H* (G8, Ser1184Phe) mutasyonunun homozigot koyunlarda kısırılığa neden olduğu belirlenmiştir. G1 (G260A, R87H), G2 (C471T), G3 (G477A), G4 (G721A, E241K),

G5 (A978G), G6 (G994A, V332I) ve G7 (G1111A, V371M) mutasyonlarının koyunların doğurganlığı üzerindeki etkisi olduğu başlangıçta belirlenemezken, sonraları G1, G4 ve G7 mutasyonlarının homozigotluk durumunda koyunlarda fertiliteye sebep olduğu bulunmuştur. *FecG^H* mutasyonunun etkileri, proteinin aktif bir formunun olmamasından kaynaklanır ve bu da gelişimin erken aşamalarında folikül büyümesinin durmasına neden olur (Kaczor, 2017).

Farklı koyun ırkları ile yapılan çalışmalarda aminoasit düzeyinde *FecG* (G1) arginin-histidin (G>A); *FecG* (G2) mutasyonu valine-valine (C>T), *FecG* (G3) Leu-Leu (G>A) *FecG* (G4) Glutamine-Lösin (G>A), *FecG* (G5) Glütamin-Glütamin (A>G), *FecG* (G6) valin-izolösin (G>A); *FecG* (G7) Valin-Metionin (G>A), *FecG^H* (G8) serinin fenilalanin'e (C>T), *FecG^E* (S1) fenilalanin'den sistein'e (T>G); ve *FecG^T* serinin-arginine (A>C) dönüşmesine neden olduğu söylenmiştir (Hanrahan vd., 2004).

2009 yılında yapılan çalışmada *GDF9* gen mutasyonunun, *BMP15* mutasyonuna göre yumurtlama oranı üzerinde daha fazla etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Gürsel, 2009). Heterozigotlukta *BMP15* ve *GDF9* mutasyonlarını bir arada taşıyanlarda yumurtlama oranının bu mutasyonlardan sadece birini taşıyanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Çelikeloglu vd., 2018).

Fransız Lacaune koyunlarında yumurtlama oranını etkileyen *FecL^L* alleli kromozom 11'de bulunur ve *B4GALNT2* (beta-1,4-N-asetilgalaktozaminiltransferaz 2) genine yakın veya içinde yer alan iki olası SNP'ye neden olan mutasyonu içerir (Martin ve diğerleri, 2014). *FecL^L* mutasyonunu taşıyan homozigot koyunlar oldukça üretkendir ve yetiştiricilerin ihtiyaçlarına uygundur (Ben Jemaa vd., 2019).

TGF β süper ailesi dışındaki genlerde de doğurganlık özellikleriyle ilişkili polimorfizmler gözlenmiştir. Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki coilin (COIL), Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörü (FSHR), Çözünür Guanilat Siklaz Alfa 1 Alt Birimi 1 (GUCY1A1), Histon Hücre Döngüsü Düzenleyici (HIRA), İnhibin Beta B Alt Birimi (INHBB); genler 1, SLC5A1,

Smad1, prolaktin (PRL) ve prolaktin reseptörü (PRLR) üzerinde yer alan mutasyonlar yumurtlama hızını etkilemektedir (Martin vd., 2014).

Çizelge 2.4. *GDF9*, *BMP15*, ve *B4GALNT2*'nin farklı koyun ırklarında görülen mutasyonları (Pokharel, 2020, Kaczor, 2017)

Gen	Mutasyon	Allel	Bulunduğu ırk	Referans
<i>GDF-9</i>	S39F	<i>FecG^H</i>	Belclare, Cambridge	Hanrahan vd., 2004.
	S109R	<i>FecT^T</i>	İcelandic	Nicol vd., (2009)
	F345C	<i>FecG^E</i>	Santa Ines	Silva vd., 2011.
	V371M	<i>FecG^F</i>	Finnsheep, Norwegian White, Belclare	Mullen ve Hanrahan, 2014, Vage vd., 2013 Mullen vd., 2013
	R315C	<i>FecG^V</i>	Vacaria	Souza vd., 2014.
	R87H	<i>FecG^I</i>	Baluchi	Moradband vd., 2011
<i>BMP15</i>	V299D	<i>FecX^I</i>	Romney, Inverdale	Galloway vd., 2000
	Q291Ter	<i>FecX^H</i>	Romney	Galloway vd., 2000
	S367İ	<i>FecX^B</i>	Belclare	Hanrahan vd., 2004
	T400I	<i>FecX^{RA}</i>	Rasa Aragonesa	Calvo vd., 2020
		<i>FecX^N</i>	Noire du Velay	Chantepie vd., 2020
	Q239R	<i>FecX^G</i>	Belclare Cambridge Small-Tail Han Hu Moghani Ghezel Afshari, Baluchi, Makui, Mehraban	Hanrahan vd., 2004 Hanrahan vd., 2004 Wang vd., 2015 Wang vd., 2015 Barzegari vd., 2010 Javanmard vd., 2011
		<i>FecX^R</i>	Rasa Aragonesa	Monteagudo vd., 2009
	C321Y	<i>FecX^L</i>	Lacaune	Bodin vd., 2007
	N337H	<i>FecX^O</i>	Olkuska	Demar vd., 2013
	T317İ	<i>FecX^{Gr}</i>	Grivette Mouton Vendeen Romanov, Dorper, Ovella Galega	Galloway vd., 2000. Demar vd., 2013 Vera vd., 2018
<i>B4GALNT2</i>	G301T, c.302-304delCTA	<i>FecX^{Bar}</i>	Lori Bakhtiari Mehreban-Lori Barbarine Barbarine	Abdoli vd., 2018 Nadri vd., 2016 Lassoued vd., 2017 Vacca vd., 2010
		<i>FecL^L</i>	Lacaune	Drouilhet vd., 2009
		<i>FecL^L</i>	D'man	Ben Jemaa vd., 2019

2.4.1. Dünyada yapılan *FecB* polimorfizm çalışmaları

Koyunlarda yumurtlama oranı ve doğum başına düşen kuzu sayısı, doğurganlık özelliği için büyük öneme sahiptir. Booroola Merinosu, ovulasyon oranı ve doğumda kuzu sayısı üzerinde varlığı belirlenen ilk majör gendir (Yuqing vd., 2019).

Booroola (*FecB*) mutasyonunun kaynağının Hindistan'daki Garole ırkı olduğu tahmin edilmektedir (Fogarty, 2009). Bengal koyunları 18. yüzyılın sonlarında Avustralya'ya ithal edilmiş ve açıklamalara göre, ithal edilen koyunların verimli oldukları ve Garole'ye benzer özellikleri gösterdikleri söylenmiştir (Turner, 1982).

FecB genini taşıyan koyunların kullanılması, bir nesilde doğurganlıkta önemli bir artış sağladığından, *FecB*'nin diğer ırklara yayılması için birkaç ülkede melezleme deneyleri yapılmıştır (Fogarty, 2009). *FecB* mutasyonu, Hindistan'daki Kendrapada ırkında (S. Kumar vd., 2008), Çin'in Hu ve Han ırklarında (Mei-Yu vd., 2020), Javanese ırkında (Davis, 2005) (Pan vd., 2015) ve İran'ın Kalehkoohi ırkında (Morteza vd., 2014) bulunduğu bildirilmiştir. *FecB* kaynağı olarak bilinen Garole ırkı melezleme yoluyla fertiliteleri iyileştirmek için *FecB* mutasyonu Hindistan'daki Deccani ırkına (Kothapalli vd., 2017) ve Malpura ırklarına da (Gopal vd., 2011) aktarılmıştır.

2.4.2. Türkiye'de yapılan *FecB* çalışmaları

BMPr-1B genindeki *FecB* mutasyonu Türkiye'de yapılan birçok çalışmada PCR-RFLP yöntemiyle araştırılmıştır ancak *FecB* alleli tespit edilememiştir.

Özen (2006) çalışmasında, Türkiye'de Sakız koyun ırkında *BMPr-1B* geninde *FecB* allelinin olup olmadığını araştırmak için farklı Sakız koyun popülasyonlarından (Bandırma, İzmir-Çeşme ve Urla, Çanakkale-Ayvacık) 388 ve Sakız-Kıvırcık melezinden 18 baş olmak üzere toplam 406 baş koyundan kan örneği almıştır. PCR-RFLP yöntemi kullanılarak *BMPr-*

1B genindeki *FecB* mutasyonu araştırılmıştır. Sonuç olarak, 406 koyunun hiçbirisi *BMPR-1B* geninin *FecB* allelini taşımadığı belirlenmiştir.

Taki ve Murat (2010) çalışmalarında, Türkiye'de yetiştirilen altı yerli koyun ırkında *FecB* allelinin varlığını PCR-RFLP yöntemi ile incelemiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetiştirilen yerli ırklardan Akkaraman (19 baş), Morkaraman (19 baş), Dağlıç (18 baş), İvesi (18 baş), Tuj (18 baş) ve Karakaş (19 baş) koyunlarından alınan toplam 111 örnekte *FecB* alleli tespit edilememiştir. 2011 yılında yapılan aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında, Türkiye'de yetiştirilen Kangal ve Güney Karaman koyunlarında *FecB*, *FecX^G* ve *FecX^H* allellerinin varlığı incelenmiştir. Bu allelleri tespit etmek için Kangal ırkından 42 ve Güney Karaman ırkından 29 baş toplam 71 baş koyun örneği PCR-RFLP yöntemi kullanarak incelenmiştir. İncelenen 71 numunenin *FecB*, *FecX^G* veya *FecX^H* alellerinden herhangi birini taşımadığı tespit edilmiştir.

Esen vd. (2011) çalışmalarında Türkiye'deki yerli koyun ırklarında *BMP-15*, *BMPR-1B* ve *GDF-9* genlerindeki mutasyonları belirleme çalışmasında, Kıvırcık (50 baş), Sakız (50 baş), İvesi (50 baş) ve İmroz (50 baş) yerli koyun ırklarından toplam 200 baş koyundan kan örneği toplamışlar ve PCR-RFLP metoduyla araştırma yapmışlardır. Sonuç, *BMP15* genindeki *FecX^G* (AB) mutasyonun ve *GDF-9* geninde yer alan *FecG^H* (AB) mutasyonlarındaki genotipler heterozigot bulunmuştur. Bunların dışında kalan örneklerin araştırılan mutasyonlara sahip olmadıklarını belirlemişlerdir.

Deniz vd. (2015) yaptıkları çalışmalarında Sakız koyunlarında *FecB*, *FecX^G*, *FecX^I* ve *CAST* genlerindeki DNA polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi kullanarak araştırmıştır. Çalışma sonucunda örneklenen 71 baş Sakız koyunlarının *FecB*, *FecX^G* veya *FecX^I* mutasyonlarını taşımadıklarını belirlemişlerdir.

Koray vd. (2018) Pırlak koyunlarında *BMPR-1B*, *BMP-15* ve *GDF-9* genlerindeki olası polimorfizimleri 2018 yılında araştırmak için 2016-2017 yılları arasında Afyon'da sekiz tekli doğum ve sekiz çoklu doğum yapan koyunlar üzerinde çalışma gerçekleştirmiştir. İlgili genler

temelinde yapılan PCR ve DNA dizileme analizleri, Pırlak koyunlarının incelenen genlerdeki mutasyonlara sahip olmadıkları belirlenmiştir.

2.5. DNA dizi analizi

DNA dizi analizleri veya dizileme işlemi, DNA'nın birincil (temel) yapılarını, yani DNA'nın nükleotid dizilerinin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları, birçok canlı türünün genomunun yanı sıra birçok organizmadaki genlerin yapısı ve organizasyonu hakkında çok şey öğrenmeyi sağlamıştır. Genomdaki mutasyonların tespitinde DNA dizileme analizi yaygın olarak kullanılır (Aydemir ve Özdemir, 2022).

1977'de araştırmacılar ilk DNA dizilerini, İki-boyutlu kromatografiye dayalı özenli yöntemlerle elde etmiştir. Otomatik yöntemler ise daha sonra geliştirilmiştir. Floresan boyatabanlı yöntemler gibi DNA dizilemesi çok daha kolay hale gelmiş ve süreç insan genom haritalama projesi ile hızlanmıştır (Sanger, 1978). Sanger yöntemi, enzimatik DNA sentezine dayanmaktadır. Dizisi sekanslanacak olan DNA ipliği, sentezlenecek yeni dizi için bir şablon olarak kullanılır. Bu yöntemin ana rolü, DNA polimerazın substrat olarak dNTP'lerin yanı sıra ddNTP'leri kullanabilmesidir (Dönmez vd., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünün laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmada, koyunlardan toplanan kan örneklerinden genomik DNA'nın izolasyonu, *BMPR-1B* geni 7. eksonunun PCR ile amplifikasyonu ve PCR örneklerinin dizi analiz yöntemleri ile mutasyonların belirlenmesi aşamaları yer almaktadır.

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan materyali

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından desteklenen Eskişehir İlinde Orta Anadolu Merinosu Koyun Irkının Halk Elinde Islahı Alt Projesi (II) (2011OAM26-02) Eskişehir'in Sivrihisar ilçesine bağlı çeşitli çiftliklerde yetiştirilen 175 Anadolu Merinosu koyunlarından alınan kanlar materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Araç ve gereçler

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji laboratuvarında bulunan araç ve gereçler kullanılmıştır. Laboratuvarında bulunan ve çalışmada kullanılan araç ve gereçler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Laboratuvarında bulunan ve projede kullanılan araç ve gereç listesi.

Adı /Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Termal Yazıcı /Sony Dijital Graphic printer	DNA ile PCR ürünlerinin görüntülenmesi
Güç Kaynakları / Thermofisher Scientific EC300XL	Elektroforez sistemlerinin elektrik ortamlarının sağlanması
Santrifüj/ Thermofisher Scientific 14.600 rpm	DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında örneklerin kısa süreli santrifüj edilerek çöktürülmesi
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı/MS-300 HS	Tampon çözeltilerin hazırlanması
Jel Elektroforez Takımları / Cleaver Scientific Max. 250 mA Jel Elektroforez Takımları / Owl Separations Systems 7303 A2 Class II	DNA ve PCR ürünlerinin tespiti
Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi	DNA ve PCR ürünlerinin jelde görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarılması
Mikro Dalga Fırını / Arçelik MD 5653	Agaroz jellerin hazırlanması
Derin Dondurucu -20 °C Derin Dondurucu Buzdolabı/ +4 °C	Örnek ve çeşitli sarf malzemelerinin muhafazası
Saf Su Cihazı/ Ultra Saf Su Cihazı	DNA İzolasyonu ve PCR reaksiyonları için kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması
Çeker Ocak /Hedlab Class II	Çeşitli tampon çözeltilerin hazırlanması
pH metre /HI 2211	Tampon çözeltilerin hazırlanması için gerekli pH'nın ayarlanması
Çalkalayıcı (Vortex)/ Fisher Scientific FB1502	Tampon çözeltilerin hazırlanması ve DNA izolasyonu
Hassas Terazı/ Radwag AS220/C/2	Tampon çözeltilerin hazırlanmasında sarf malzemelerin tartılması
Çalkalayıcı Sıcak Su Banyosu/Thermomixer Comfort	DNA izolasyonu

3.2.Yöntem

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

Genetik çalışmalarda kullanılmak için alınan kan örnekleri steril enjektörlerle vena jugularisten 5 ml EDTA vakumlu tüplere alınmıştır. Kan örnekleri soğuk zincir yoluyla laboratuvara getirilerek DNA izolasyon aşamasına gelene kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA molekülünün izolasyonunda fenol-kloroform ekstrasyon yöntemi kullanılmıştır (Sambrook vd., 1989). DNA izolasyon protokolü laboratuvar ortamında optimize edilerek aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- K3 EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ($\cong 10$ ml) kullanma aşamasına gelene kadar -20°C'de saklanmıştır.
- 500 µl kan örneği alınarak 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine konulmuş 1,5 ml (2X) Lysis çözeltisi eklenmiştir. Ara sıra karıştırılarak buz içerisinde bir gece inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün tüpler ters düz çevrilerek 10 dakika hafifçe karıştırıp ve ardından tüpler 7500 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.
- Bir sonraki adımda süpernatant boşaltılır ve ardından 500 µl EDTA/solusyonu, 100 µl SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) pelete eklenip ve vorteks ile iyice karıştırılmıştır.
- Daha sonra 55°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan alınan örneklere 500 µl Fenol konulmuş, tüpler alt üst edilerek 10 dakika yavaşça nazikçe karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 10000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Daha sonra üst faz alınıp başka bir 2 ml'lik tüp içerisinde konulmuş ve üzerine 500 µl fenol-kloroform-isoamil alkol eklenmiştir.

- Tekrar tüpler ters çevrilerek yavaşça karıştırıldıktan sonra +4°C'de 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
- Üst faz ucu kesik pipet ucu ile alınarak yeni 1,5 ml'lik cam tüpün içerisinde konulmuştur.
- Üzerine 50 µl 3M Na Asetat ve 2 katı hacim kadar ethanol (% 96'lık) eklenmiş, tüpler nazikçe karıştırılmıştır.
- 5000 rpm'de 3 dak. santrifüj yapılarak süpernatant dökülmüştür.
- Pelet % 70'lik alkolde yıkanarak, tekrar 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dökülerek tüp ters çevirilerek kurutma kâğıdı üzerine yerleştirilerek, DNA'nın kuruması sağlanmıştır.
- Elde edilen DNA 100 µl dd su ile çözündürülüp -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

PCR (Polimeraz Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) "in vitro" koşullarda spesifik bir DNA ya da RNA parçasının enzimatik olarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntem ayrıca, DNA'nın tek bir bölgesini enzimatik olarak amplifiye etmek için uygulanan reaksiyonların genel adıdır. PCR işlemi DNA replikasyonunun sürekli yinelenmeleri olarak kısaca ifade edilebilir.

Çalışmada, *BMPR-1B* geninde tespit edilen mutasyonun meydana geldiği bölgeyi amplifiye etmek için Çizelge 3.2'de verilen primerler, Çizelge 3.3'de PCR karışımı ve Çizelge 3.4'te verilen PCR döngüsü kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Kullanılan primer çifti (Dutta vd., 2014).

<i>BMPR-1B</i>	F: 5'-GTCGCTATGGGGAAGTTTGGATG-3'
	R: 5'-CAAGATGTTTTTCATGCCTCATCAACACGGTC-3'

Çalışmada PCR reaksiyon solüsyonunda bir numune için toplam (Çizelge 3.3) 50 µl hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR işleminin tamamlanmasından sonra, mutasyonun meydana geldiği gen bölgesinin amplifiye olup olmadığını

kontrol etmek için %2'lik agaroz jeller kullanılmıştır. PCR sonuçlarının kontrolü yapıldıktan sonra, hizmet alımı ile DNA dizi sekans analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR çalışmasında kullanılan çözelti içeriği

1X'lik PCR Reaksiyon Karışımı	Miktar
Genomik DNA (50 ng)	1,5 µl
10X PCR Tamponu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH. 8.8)	2,5 µl
10 x dNTP (0,2 mM)	2,0 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	2,0 µl
İleri Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Ters Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz(1 U)	0,25 µl
Deiyonize bdH ₂ O	40,75 µl
Toplam	50 µl

Çizelge 3.4. PCR döngüleri

Başlangıç denatürasyonu		94 °C de 3 dak
Denatürasyon	35 Döngü	94 °C de 30 sn
Primerlerin bağlanması (Annealing)		61 °C de 40 sn
Uzama (extention)		72 °C de 40 sn
Son uzama (Final Extension)		72 °C de 05 dak

3.2.4. DNA dizi analizi

PCR örneklerinin temizlenmesi ve DNA dizi analizi işlemleri hizmet alımı yoluyla yapılmıştır.

3.2.5. Genotiplerin belirlenmesi ve gen frekanslarının hesaplanması

Çalışmada elde edilen PCR ürünleri sekanslanarak *BMPR-1B* geninin 7. eksonundaki mutasyonlar incelenmiştir. DNA örnekleri kullanılarak amplifiye edilmiş PCR ürünleri agaroz jelde tespit edilmiş ve DNA dizileme sonucunda örneklerin genotipleri belirlenmiştir. Dizilerin analiz edilmesi ve genotiplerin belirlenmesi Codon Code Aligner (CodonCode Corporation., 2019) ve MEGAX (Kumar vd., 2018) uygulamalarının kullanılmasıyla yapılmıştır.

Koyunlarda *FecB* geninin frekansı ve standart hatasını hesaplamak için gen sayma yöntemi (counting the number of genes) (Nei, 1987) kullanılmıştır. Gen frekansları hesaplanırken PopGene (Yeh vd., 1997) programı kullanılmıştır.

$$P_i = \frac{(2f_1 + f_2)}{2N} \quad (3.1)$$

$$S_{P_i} = \sqrt{\frac{P_i(1-P_i)}{2N}} \quad (3.2)$$

P_i : i'inci alelin sıklığı.

f_1 : i'inci alel için homozigot genotipli örneklerin sayısı.

f_2 : i'inci alel için heterozigot genotipli örneklerin sayısı.

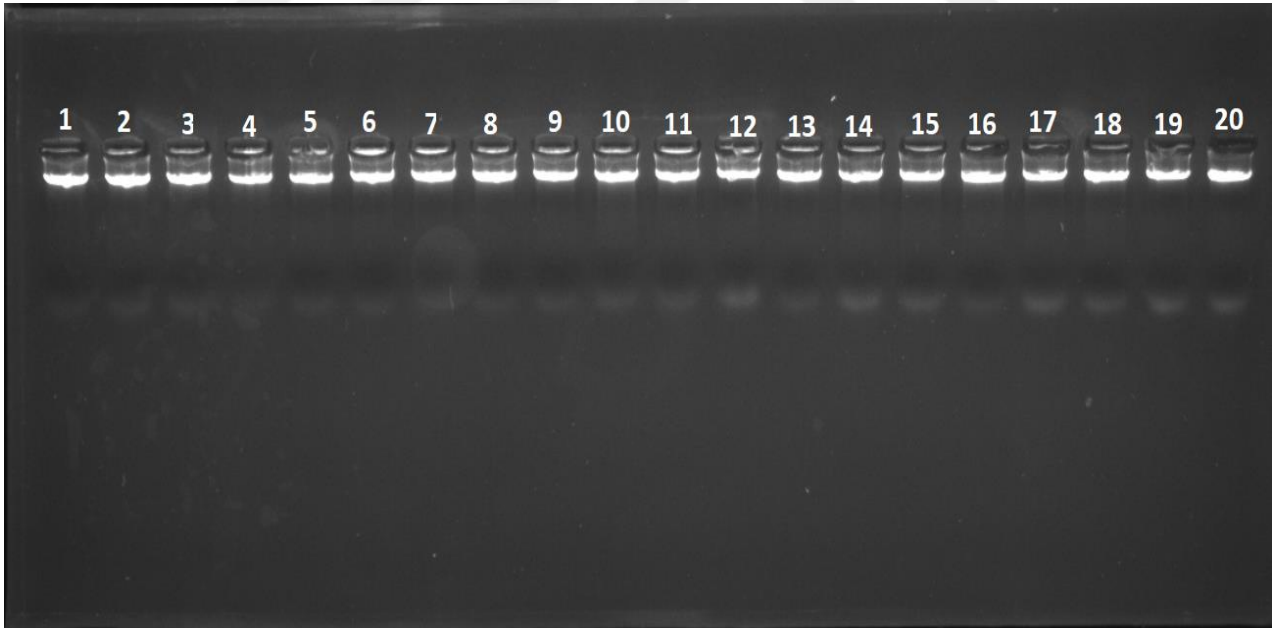
N : i'inci lokus bakımından toplam örnek sayısı.

S_{P_i} : i'inci alel frekansının standart bozukluğu.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Genomik DNA İzolasyonu

Eskişehir İlinde Orta Anadolu Merinosu elit sürülerinde yetiştirilen ve çoğuz kuzulayan koyunlarda *FecB* genini araştırmak için çoğuz ve tek kuzulayan toplam 175 baş koyundan kan örneği alınarak fenol-kloroform yöntemi kullanarak DNA izole edilmiştir. Saflaştırılan gDNAların miktar ve kalitesi tespit etmek için spektrofotometre yoluyla 260/280 nm dalga boyunda kontrolü yapılmış ve elde edilen miktar ve kaliteleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. İzole edilen toplam 175 DNA örneği, %2’lik agaroz jelde kontrolü edilmiştir. Agaroz jel elektroforez kontrolünden sonra bazı DNA örneklerin jel görüntüsü Şekil 4.1 ’de verilmiştir.



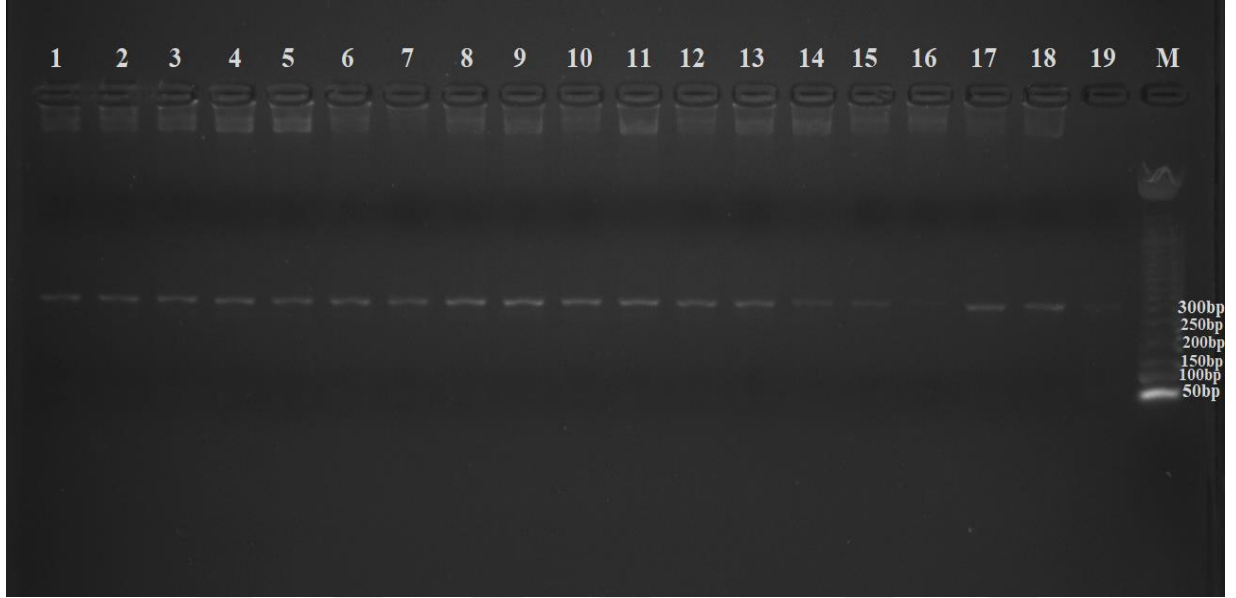
Şekil 4.1. Saflaştırılan DNA örneklerinin %2’lik agaroz jelde kontrolleri.

Çizelge 4.1 Örneklerin DNA miktar ve kalite değerleri

ID	ng/ul	260/280	260/230	ID	ng/ul	260/280	260/230	ID	ng/ul	260/280	260/230
1	53,02	2,2	1,97	64	68,97	1,92	1,75	136	50,08	1,78	2,11
2	42,61	2,05	2,3	65	42,33	1,9	1,94	137	55,57	1,92	2,26
3	51,14	2,02	2,1	66	57,86	1,89	1,81	138	40,61	1,88	2,01
4	54,13	2,02	1,94	67	53,73	1,9	1,68	139	48,79	1,92	2,11
6	63,98	2	2,07	68	51,07	1,92	2,08	140	43,39	1,84	1,77
7	46,64	2,08	2	69	58,35	1,9	1,76	142	54,27	1,62	2,02
8	75,21	1,97	2,09	70	29,05	1,97	1,66	146	51,61	1,35	1,7
9	49,84	2,04	2,22	71	38,09	1,96	2,1	150	36,12	1,81	2,01
10	46,97	2,03	2,11	72	45,47	1,93	2,32	151	21,39	1,58	1,58
11	51,96	2,03	2,07	73	34,28	1,94	2,44	152	49,19	1,82	2,14
12	47,38	2	2,22	74	102,94	1,95	2,14	153	5,32	1,15	1,33
13	53,52	1,95	2,23	74	54,66	1,92	2,1	155	9,95	1,38	1,54
14	48,13	2,04	2,48	75	65,83	1,94	1,69	157	57,42	1,72	2,04
15	61,11	1,98	2,13	76	37,8	1,9	1,56	158	8,67	1,75	1,63
16	46,58	2,05	1,77	77	52,61	1,82	1,84	159	20,52	1,67	1,7
17	44,75	2,05	2,04	78	50,69	1,86	1,51	161	29,34	1,7	2
18	41,55	2,1	2,42	79	36,5	1,86	1,27	164	18,17	1,66	1,96
19	53,05	2,04	2,1	80	59,94	1,88	1,38	164	20,24	1,62	2,08
20	55,78	1,95	1,77	81	51,29	1,87	1,95	165	28,92	1,68	2
21	56,68	2,01	1,7	82	56,07	1,83	1,75	166	69,86	1,76	2,09
22	58,23	1,99	2,21	83	54,11	1,91	1,96	166	30,2	1,67	1,94
23	47,85	2,05	2,08	84	57,1	1,83	1,71	166	55,85	1,69	2
24	47,76	2,01	2,32	85	55,72	1,84	1,96	167	27,06	1,71	1,98
25	54,02	2,07	2,05	86	48,4	1,89	1,76	168	14,98	1,56	1,9
26	35,54	2,22	1,28	88	52,64	1,87	1,79	169	21,98	1,7	1,78
27	41,96	1,96	1,86	89	65,77	1,86	1,76	171	20,55	1,66	1,62
28	46,25	2,06	2,09	90	44,41	1,88	1,45	171	11,96	1,91	2,1
29	35,52	2,1	1,6	101	44,39	1,75	1,56	172	47,36	1,87	1,85
30	50,36	1,96	2,26	102	31,05	1,62	1,07	173	54,89	1,94	2,32
31	35,77	2,12	1,72	103	44,39	1,87	0,47	174	59,35	1,89	2,25
32	53,86	2,03	2,13	104	49	1,85	1,91	175	52,61	1,91	2,32
34	42,16	2,17	1,92	105	52,1	1,83	1,72	176	49,73	1,9	2,18
35	41,9	2,11	2,02	106	65,96	1,7	1,96	177	55,4	1,86	2,31
36	45,54	1,96	1,33	107	51,3	1,63	1,7	178	54,83	1,79	2,24
37	46,77	2,01	1,88	108	52,64	1,82	1,98	179	54,13	1,85	2,22
38	40,56	1,91	1,65	109	53,61	1,77	2,01	180	61,17	1,84	2,44
39	31,92	2,03	1,84	110	48,14	1,67	1,92	181	64,09	1,83	2,65
40	27,3	1,91	1,24	111	53,63	1,72	1,79	182	1,7	0,98	0,35
41	66,27	1,9	1,57	112	42,72	1,66	1,55	183	46,37	1,82	1,88
42	48,58	2	1,88	113	49,99	1,71	1,78	184	61,22	1,8	1,97
43	18,95	1,87	0,78	114	46,74	1,77	1,56	185	55,66	1,87	2
44	56,34	1,92	1,92	115	51,03	1,53	1,15	186	52,88	1,84	2,2
45	46,5	1,87	2,07	116	39,48	1,77	1,72	187	53,1	1,97	2,35
46	24,99	1,87	1,27	117	39,76	1,78	1,83	188	55,64	1,82	2,09
47	61,66	1,9	1,98	118	43,96	1,83	1,48	189	53,74	1,84	2,07
48	60,11	1,89	1,87	119	46,27	1,77	1,72	191	49,61	1,78	1,73
49	68,75	1,87	1,87	120	46,71	1,79	1,67	192	57,47	1,82	1,96
50	54,46	1,83	1,34	121	46,76	1,79	1,85	193	58,74	1,71	1,79
51	70,08	1,94	1,98	122	44,84	1,72	0,56	194	80,43	1,59	1,6
52	58,69	1,85	2,03	123	36,23	1,87	1,44	194	45,05	1,84	1,82
53	42,74	1,78	2,14	124	48,29	1,73	1,71	196	56,48	1,84	1,97
54	60,51	1,88	2,05	125	51,53	1,84	2,16	197	14,02	1,49	0,94
55	53,03	1,87	2,11	126	46,45	1,8	1,94	197	13,51	1,76	1,04
56	15,55	1,78	0,82	127	46,44	1,77	1,98	198	54,29	1,85	1,71
57	21,05	1,87	1,24	128	62,64	1,81	1,12	199	39,02	1,84	1,82
58	46,19	1,94	2,11	129	60,4	1,86	2,12	201	33,44	1,81	1,22
59	53,75	1,95	1,84	130	33,12	1,78	1,73	202	52,57	1,91	1,77
60	58,83	1,93	1,75	131	48,82	1,91	1,96	203	44,99	1,81	1,67
61	25,13	1,89	1,64	132	54,31	1,84	1,99	204	50,22	1,78	1,67
62	52,09	1,94	2,08	134	18,15	2,07	1,87	209	32,24	1,8	1,63
63	13,61	1,65	1,22	135	62,08	1,94	2,3	209	40,73	1,87	1,7

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR uygulandıktan sonra 300 bp büyüklüğündeki PCR örneklerinin jel görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir. Çalışma materyalinden çoğaltılan tüm PCR örnekleri agaroz jelde bakıldıktan sonra dizi analizi işlemi için gönderilmiştir.



Şekil 4.2. 300 bp uzunluğundaki PCR ürünlerin agaroz jelde (%2’lik) kontrolü (M, 50 bp Fermentas® GeneRuler SMO241 DNA Marker).

4.3. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Numunelerin DNA dizi analizi yapıldıktan sonra alınan veriler Codon Code Aligner (CodonCode Corporation) ve MEGA X (Kumar vd., 2018) uygulamalarıyla 175 Orta Anadolu Merinos ırkı örneklerinde *FecB* geninin 7. eksonundaki polimorfizimler incelenmiştir.

Ensemble genbankasındaki verilere göre *BMPR-1B* geni 7. Ekson üzerinde dört SNP (6:34011011, 6:34011008, 6:34010859, 6:34010855) bulunmaktadır (Şekil 4.3.)

No.	Exon / Intron	Start	End	Start Phase	End Phase	Length	Sequence
	Exons/ Introns	Translated sequence	Flanking sequence	Intron sequence	UTR		CAAAC11CCTTGATAACATGCTTTGCGAAGTTCAGGAAATTAAGTGTGGGCACCAAGA AAGAGGATGGTGAGAGTACAGCCCCCACCCTCTCCAAAGATCTTGCATGTAAATGCC ACCACCATTTGCCAGAAGACTCGGTCAACAATATTTGCAG
	Variants	3 prime UTR	Missense	Synonymous			
	Markup	loaded					
	Intron 3-4	34,029,900	34,029,389				
4	ENSOARE00020169058	34,029,388	34,029,286	0			
	Intron 4-5	34,029,285	34,019,017				
5	ENSOARE00020169086	34,019,016	34,018,920	1			
	Intron 5-6	34,018,919	34,017,590				
6	ENSOARE00020169166	34,017,589	34,017,451	2			
	Intron 6-7	34,017,450	34,011,020			6,431	
7	ENSOARE00020169220	34,011,019	34,010,827	0	1	193	
	Intron 7-8	34,010,826	34,009,818			1,009	
8	ENSOARE00020169286	34,009,817	34,009,520	1		298	
	Intron 8-9	34,009,519	34,009,192			11,327	
9	ENSOARE00020169361	33,998,192	33,998,192			176	
	Intron 9-10	33,998,016	33,994,271			3,745	
10	ENSOARE00020169446	33,994,271	33,994,271			131	

Şekil 4.3. *FecB* geni 7. ekson üzerinde belirlenen dört SNP noktası

4.3.1. *FecB* alleli (Missensen mutasyon)

BMPR-1B geni 7 eksonu forward eksen üzerinde cDNA'nın 836. nükleotidi olarak yer alan A>G nükleotidi ve CAG>CGG kodunun değişmesi ile oluşan mutasyon sonucunda kodlanan 279 aa olan Q aminoasiti yerine R aa kodlandığı için proteinde çerçeve kayması olmaktadır. Çalışma örneklerinin DNA dizi analiz sonucunda bu allel tespit edilememiştir (Şekil 4.4; 4.5), incelenen Orta Anadolu merinoslarında *FecB* alleli olmadığı belirlenmiştir.

Koyunlarda çoğuz gebelik üzerine etkisi bilinen *FecB* alleli, dünyada ilk defa Booroola koyunlarında belirlenmiş farklı ülke yerli ırklarında da varlığı tespit edilmiştir. Islah amacıyla farklı ülke koyun popülasyonlarına melezleme yoluyla *FecB* alleli aktarılmıştır (Davis, 2009). Türkiye yerli koyun ırklarında (Sakız ırkı gibi çoğuz doğum yapan ırklar dahil) çoğuz doğuma etkili *BMPR-1B* alleli tespit edilememiştir.

Eskişehir İlinde Orta Anadolu Merinosu Koyun Irkının Halk Elinde Islahı Alt Projesinde yetiştirilen ve Eskişehir yöresinde yetiştirilen ve çoğuz kuzulayan 175 baş orta Anadolu Merinosu koyunlarında *FecB* allelinin bulunmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. İncelen örneklerde görülen *FecB*⁺⁺ alleli (6:34010859 nükleotidteki SNP)



Şekil 4.5. Bazı örneklerin *FecB* ekson 7 dizi analizi sonuçları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Koyunlarda majör fekdite genlerinin çoğuz kuzulama özellikleri üzerinde büyük bir etkisi olduğu bilinmektedir. Üretkenliği ile tanınan Orta Anadolu Merinosu Koyun Irkının Halk Elinde Islahı Alt Projesinde yetiştirilen elit sürülerde doğumdaki kuzu sayısının artırılmasına katkı sağlaması amacıyla *BMPR-1B* geninin 7. eksonu DNA dizi analiz yöntemi ile incelenerek muhtemel mutasyonlar araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *FecB* alleleline sahip hiçbir koyun tespit edilmemiştir.

Türkiye’de son yıllarda PCR-RFLP yöntemiyle *FecB* geninin varlığı çeşitli koyun popülasyonlarında araştırılmış ama bulunmamıştır. Yapılan tez çalışmasında Orta Anadolu Merinosları elit sürülerinde geçmiş doğumlarına (tekiz, ikiz ve üçüz kuzulayan) bakarak 175 koyundan örnekleme yapılmış. *FecB* alleli bulunamamış ancak bu genin 7. eksonunda yer alan 3 SNP belirlenmiştir. Koyunların evcilleştirme alanı olan Türkiye’nin coğrafi konumu ve tarihteki göçlerin odağında yer almasından dolayı *FecB* allelinin orijini olan Hindistan West Bendal’de bulunan Garole koyunlarının (Davis, 2009) çeşitli yollarla Türkiye yerli ırklarına genetik katkı yapabileceği tahmin edilmektedir. Bu nedenle Türkiye’de genetik polimorfizm çalışmalarında çoğunlukla uygulanan PCR-RFLP yerine koyunlarda çoğuz doğumla ilgili genlerin DNA dizi analizleri ile araştırılarak hayvanların ıslahına yardımcı olabilecek verilerin elde edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca Tarım ve Orman Bakanlığının koyun yetiştiricilerine yaptığı desteklemeler nedeniyle koyunlardan alınan verilerin şüpheli olmasından dolayı bakanlığın kendi araştırma ve yetiştirme popülasyonlarındaki çoğuz gebelik ve kısır koyunlar kullanılarak çoğuz doğumlarla ilgili gen ve allellerin incelenmesi yetiştirici ve araştırmacılara yol gösterecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdoli, R., Mirhoseini, S.Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., Zamani, P., Gondro, C., 2018, Genome-wide association study to identify genomic regions affecting prolificacy in Lori-Bakhtiari sheep, *Animal Genetics*, p.1-4.
- Abdoli, R., Zamani, P., Deljou, A., Rezvan, H., 2013, Association of *BMPR-1B* and *GDF9* genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes, *Gene* 524, p.296–303.
- Adkinson, A. Y., Adkinson, R. W., 2013, The *FecB* (Booroola) gene and implications for the Turkish sheep industry, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 37(6), p. 621-624.
- Akçapınar H, Ünal N., 2001, Orta Anadolu Merinoslarında önemli verim özellikleri ve selkesiyonla geliştirilmesi imkanları I. önemli verim özellikleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, s. 45 - 58.
- Anonim, 2018, Türkiye Yerli Koyun Irkları, <https://www.tarimdanhaber.com/hayvancilik/turkiye-yerli-koyun-irklari-h3736.html>
Erişim Tarihi: 16/06/2022
- Anonim, 2022, Türkiye Damızlık Koyun Keçi Yetiştiricileri Merkez Birliği, <http://turkiyekoyunkeci.org/tr/Irklar>, Erişim Tarihi: 16/06/2022
- Aydemir, Ö., Özdemir, M., 2022, Dna Dizi Analiz Yöntemleri, <https://studylibtr.com/doc/766674/dna-dizi-analiz-yontemleri>, Erişim Tarihi: 22/06/2022.
- Barzegari, A., Atashpaz, S., Ghabili, K., Nemati, Z., Rustaei, M., Azarbaijani, R., 2010, Polymorphisms in *GDF9* and *BMP15* associated with fertility and ovulation rate in Moghani and ghezel sheep in Iran, *Reproduction in Domestic Animals*, 45, p.666-669.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ben Jemaa, S., Ruesche, J., Sarry, J., Woloszyn, F., Lassoued, N., & Fabre, S., 2019, The high prolificacy of D'man sheep is associated with the segregation of the *FecL^L* mutation in the *B4GALNT2* gene, *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), p. 531-537.
- B. G., 2021, Türkiye’de nüfusun yeterli ve dengeli beslenmesi açısından hayvansal gıda arz ve talebinin değerlendirilmesi, *The Journal Of Food*, s. 1450-1466.
- Bodin, L., Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., et al., 2007, A novel mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune Sheep, *Endocrinology* 148(1), p. 393–400.
- Calvo, J.H., Chantepie, L., Serrano, M., Sarto, M.P., Iguacel, L.P., et al., 2020, A new allele in the *BMP15* gene (*FecX^{RA}*) that affects prolificacy cosegregates with *FecX^R* and *FecX^{Gr}* in Rasa aragonesa sheep, *Theriogenology*, 144, p.107-111.
- Chantepie, L., Bodin, L., Sarry, J., Woloszyn, F., Plisson-petit, F., et al., 2020, Genome-wide identification of a regulatory mutation in BMP15 controlling prolificacy in sheep, *Frontiers in Genetics*, 11, p.585.
- Chong, Y., Liu, G., Jiang, X., 2019, Effect of *BMPR-1B* gene on litter size of sheep in China: A meta-analysis, *Animal Reproduction Science*, 210, p. 106175.
- CodonCode Corporation., 2019, www.codoncode.com, Erişim Tarihi: 5.08.2022
- Çelikeloglu, K., Erdoğan, M., Hacan, Ö., Koçak, S., Bozkurt, Z., Tekerli, M., 2018, Pırlak koyunlarında *BMPR-1B*, *BMP15* ve *GDF9* genlerinde olası polimorfizmlerin araştırılması, *Kocatepe Veterinary Journal*, 11(4), s.356-362.
- Davis, G. H., 2009, The Booroola gene: Origin, distribution, use and management of the *FecB* mutation. Use of the *FecB* (Booroola) gene in sheep-breeding programs, p. 22-31.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Davis, G.H., Montgomery, G.W., Allison, A.J., Kelly, R.W., Bray, A.R., 1982, Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep, New Zealand Journal of Agricultural Research, 25, p.525-529.
- Davis, G.H., Mcevan, J.C., Fennessy, P.F., Dodds, K.G., Farquhar, P.A., 1991, Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep, Biology of Reproduction, 44, p. 620-624.
- Davis, G. H., 2005, Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genetics Selection Evolution, 37(Suppl. 1), p. 11-23.
- Demar, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., et al., 2013, Genome-wide association studies identify two novel *BMP15* mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep, plos Genetics., 9(4), e1003482, p.1-14.
- Dincel, D., Ardicli, S., Soyudal, B., Er, M., Alpay, F., Şamlı, H., & Balci, F., 2015, Analysis of *FecB*, *BMP15* and *CAST* Gene Mutations in Sakiz Sheep, Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 21(4). p. 483-488
- Dönmez, D., Şimşek, Ö., Kaçar, Y. A., 2015, Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ve bitkilerde kullanımı, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, (1), s.30-37.
- Drouilhet, L., Lecerf, F., Bodin, L., Fabre, S., Mulsant, P., 2009, Fine mapping of the *FecL* locus influencing prolificacy in Lacaune sheep, Animal Genetics, 40, p. 804–812.
- Dutta R, Laskar S., Borah P., Kalita D., Das B., Zaman G., Barman N.N., Saikia D.P., 2014, Polymorphism and nucleotide sequencing of *BMPR-1B* gene in prolific Assam hill goat, Molecular Biology Reports, 41(6), p. 3677–3681.
- Ensminger, M. E., Parker, R. O., 1986, Sheep & goat science (No. Ed. 5). The Interstate Printers & Publishers, Inc.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ertuğrul, M., Dellal, G., Soysal, İ., Elmacı, C., Oya, A. K. I. N., Sezen, A. R. A. T., Yılmaz, O., 2009, Türkiye yerli koyun ırklarının korunması, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(2), p. 97-119.
- Eskişehir Tarım ve Orman Müdürlüğü 2021, 2021 Çalışma raporu. Eskişehir: Eskişehir Tarım ve Orman Müdürlüğü
https://eskisehir.tarimorman.gov.tr/Belgeler/2021_Faaliyet_Raporu/2021_Faaliyet_Raporu.pdf, Erişim Tarihi: 16/06/2022.
- Fahmy, M. H., Castonguay, F., 1991, Research and commercialization of the Booroola gene in Canada. Colloques de l'INRA (France).
- Feraye, E. G., Iraz. A., Hanefi. D., Ahmet. M., & Kemal. Ö., 2011, Türkiye'deki Yerli Koyun Irklarında *BMP-15*, *BMPr-IB* ve *GDF-9* Genlerindeki Mutasyonların Belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 725-729.
- Fogarty, N. M., 2009, A review of the effects of the Booroola gene (*FecB*) on sheep production, Small Ruminant Research, 85(2-3), p. 75-84.
- Fournier, A., 2006, L'élevage des chèvres. Editions Artémis.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., 2000, Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner, Nature Genetics, 25(3), p. 279–283.
- Gootwine, E., 2020, Invited review: opportunities for genetic improvement toward higher prolificacy in sheep, Small Ruminant Research, 186, p. 106090.
- Gowane, G. R., Chopra, A., Prince, L. L. L., Mishra, A. K., Arora, A. L., 2011, Genetic analysis for growth traits of prolific Garole× Malpura (GM) sheep, Tropical Animal Health and Production, 43(2), p. 299-303.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gürer, B., 2021, Türkiye’de nüfusun yeterli ve dengeli beslenmesi açısından hayvansal gıda arz ve talebinin değerlendirilmesi. *Gıda*, 46(6), s. 1450-1466.
- Gürsel, E., 2011, Determination of *BMP-15*, *BMPR-1B* and *GDF-9* gene mutations of the indigenous sheep breeds in Turkey, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(5), p. 725-729.
- Gürsel, F. E., 2009, Mutations in *BMPR-1B*, *BMP-15* and *GDF-9* genes and their effects on fecundity and ovulation rate in sheep. *Veteriner Fakültesi Dergisi (İstanbul)*, 35(2), p. 57-66.
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., 2004, Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70, p.900-909.
- Hülya. O., 2020-3-13, Küçükbaş hayvan varlığında Avrupa birincisiyiz. <http://www.turktarim.gov.tr/Haber/416/kucukbas-hayvan-varliginda-avrupa-birincisiyiz>, Erişim Tarihi: 14/06/2022.
- Javanmard, A., Azadzadeh, N., Esmailzadeh, A.K., 2011, Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds, *Veterinary Research. Communications.*, 35(3), p.157–167.
- Jia, J., Chen, Q., Gui, L., Jin, J., Li, Y., Ru, Q., Hou, S., 2019, Association of polymorphisms in bone morphogenetic protein receptor-1B gene exon-9 with litter size in Dorset, Mongolian, and Small Tail Han ewes, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.*, 32(7), p. 949-955.
- Kaczor, U., 2017, Genes involved litter size in Olkuska sheep. *Genetic Polymorphisms*, 251.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karlı, T., Şahin, E., Karlı, B. A., Eren, M. G., Balcıoğlu, M. S., 2011, kangal ve güney karaman koyunlarında *FecB*, *FecX^G*, *FecX^H* allellerinin PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırılması. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 51(2), s. 71-80.
- Karlı, T., & Balcıoğlu, M. S., 2011, Türkiye’de Yetiştirilen Altı Yerli Koyun Irkında *BMPR-IB* (Booroola) Geninde *FecB* Allel Varlığının PCR-RFLP Yöntemiyle Araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner fakültesi dergisi, p. 1033-1036.
- Kumar, S., Mishra, A. K., Kolte, A. P., Dash, S. K., Karim, S. A., 2008, Screening for Booroola (*FecB*) and Galway (*FecX^G*) mutations in Indian sheep, Small Ruminant Research, 80(1-3), p. 57-61.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018, MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, Molecular Biology and Evolution 35(6), p. 1547-1549.
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., 2017, *FecX^{Bar}* a novel *BMP15* mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine sheep, BMC Genetics, p.1-10.
- Mahdavi, M., Nanekarani, S., Hosseini, S. D., 2014, Mutation in *BMPR-IB* gene is associated with litter size in Iranian Kolehkoobi sheep, Animal reproduction science, 147(3-4), p. 93-98.
- Martin, P., Raoul, J., Bodin, L., 2014, Effects of the *FecL* major gene in the Lacaune meat sheep population, Genetic Selection. Evolution., 46(1), p. 1-11
- Melo, E.O., Silva, B.D.M., Castro, E.A., Silva, T.A.S.N., Paiva, S.R., 2008, A novel mutation in the growth and differentiation factor 9 (*GDF9*) gene is associated, in Homozygosis, with increased ovulation rate in Santa Ines Sheep, Biol. Reprod., 78, p. 141–141.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Monteagudo, L.V., Ponz, R., Tejedor, M.T., Laviña, A., Sierra, I., 2009, A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed, *Animal Reproduction Science*, 110, p.139-146.
- Nadri, S., Zamani, P., Ahmadi, A., 2016, Novel Mutation in Exon 1 of the *BMP15* gene and its association with reproduction traits in sheep, *Animal Biotechnology*, 27(4), p.256-261.
- Nei, M., 1987, *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nicol, L., Bishop, S.C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.E., et al., 2009, Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte specific *GDF9* gene results in sterility in Thoka sheep, *Reproduction*, 138, p.921–933.
- Özen Polat, Y., 2006, Sakız koyun ırkında *BMPr-IB* geninde çoklu doğuma neden olabilecek *FecB* alleli varlığının PCR-RFLP yöntemi ile araştırılması, Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey).
- Pan, Z., Zhang, B., Hu, W., Di, R., LIU, Q., Wang, X., Chu, M., 2015, The genetic diversity of both *FecB* gene and microsatellite GC101 is associated with reproduction selection in sheep, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 39(3), p. 254-260.
- Pokharel, K., 2020, *Functional Fertility Genomics in Sheep*, *Dissertationes Scholae Doctoralis Ad Sanitatem Investigandam Universitatis Helsinkiensis*.
- Praveena, K., Ramana, D. B. V., & Pankaj, P. K. 2017, Booroola Gene (*FecB*) Polymorphism and its Liaison with Litter Size in Indigenous Sheep Breeds of Telangana, India. *Journal of Animal Research*, p. 227-231.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qi, M. Y., Xu, L. Q., Zhang, J. N., Li, M. O., Lu, M. H., Yao, Y. C., 2020, Effect of the Booroola fecundity (*FecB*) gene on the reproductive performance of ewes under assisted reproduction. *Theriogenology*, 142, p. 246-250.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd edition), 3 vol., Cold-Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Coulson, A. R., 1978, The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *MRC Laboratory of Molecular Biology*, 87(1), p. 107-110.
- Silva, B.D., Castro, E.A., Souza, C.J., Paiva, S.R., Sartori, R., 2011, A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (*GDF9*) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep, *Animal Genetics*, 42(1), p.89-92.
- Souza, C.J.H., McNeilly, A.S., Benavides, M.V., Moraes J.C.F., 2014, Mutation in the protease cleavage site of *GDF9* increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes, *Animal Genetics*, 45(5), p.732-739.
- Turner, H. N., 1982, Origins of the CSIRO Booroola. In 'The Booroola Merino'. (Eds L. R. Piper, BM Bindon and R. D. Nethery.) p. 1-7.
- Turner, H. N., 1978, Selection for reproduction rate in Australian Merino sheep: direct responses, *Australian Journal of Agricultural Research*, 29(2), p. 327-350.
- TÜİK., 2022, Hayvansal Üretim İstatistikleri, Aralık 2021. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-%C3%9Cretim-%C4%B0statistikleri-Aral%C4%B1k-2021-45593&dil=1> Erişim Tarihi: 14/06/2022.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ünal, N., Akçapınar, H., 2001, Orta Anadolu Merinoslarında önemli verim özellikleri ve seleksiyonla geliştirilmesi imkanları I. önemli verim özellikleri. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 41(1), s. 45-58.
- Vacca, G.M., Dhaouadi, A., Rekik, M., Carcangiu, V., Pazzola, M., Dettori, M.L., 2010, Prolificacy genotypes at *BMPR-1B*, *BMP15* and *GDF9* genes in North African sheep Breeds, Small Ruminant Research., 88(1), p. 67-71.
- Vera, M., Aguion, M., Bouza, C., 2018, Detection of Grivette *BMP15* prolificacy variant (*FecX^{Gr}*) in different sheep breeds presented in Galicia (NW Spain), Gene Reports, 12, p.109-114.
- Vgraphs, 2020, Countries with the Largest Sheep Population in the World, <https://www.youtube.com/watch?v=yBNZZmFqcEs>, Erişim Tarihi: 26/06/2022.
- Wang, W., Liu, S., Li, F., Pan, X., Li, C., 2015, Polymorphisms of the ovine *BMPR-IB*, *BMP-15* and *FSHR* and their associations with litter size in two Chinese Indigenous sheep breeds, International Journal of Molecular Sciences, 16, p. 11385-11397.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B., Ye, Z. H., Mao, J. X., 1997, POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada, 10, p. 295-301.
- Yuqing, C. Liu, G., & Jiang, X., 2019, Effect of *BMPR-IB* gene on litter size of sheep in China: A metaanalysis, Animal Reproduction Science, 210, 106175.