



**BAZI YERLİ KOYUN IRKLARINDA FEKUNDİTE İLE İLGİLİ GEN  
BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Ramazan AYMAZ**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL**

**İkinci Danışman: Doç. Dr. Yalçın YAMAN**

**2022**

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BAZI YERLİ KOYUN IRKLARINDA FEKUNDİTE İLE İLGİLİ GEN  
BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**Ramazan AYMAZ**

**ORCID: 0000-0002-8220-8483**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL**  
**İkinci Danışman: Doç. Dr. Yalçın YAMAN**

**KASIM-2022**

**Her hakkı saklıdır.**

## ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ BEYANI

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak sunulan ve Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışması Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi BAP tarafından NKUBAP.03.YL.22.364 proje ile desteklenmiştir. Ayrıca araştırmanın materyalini, Tarım ve Orman Bakanlığı, Koyunculuk Araştırma Enstitüsü bünyesinde yürütölen “Bazı Yerli Koyun Irklarında Gastrointestinal Helminthlere ile Maedi-Visna ve Paratüberküloz’a Karşı Genetik Direncin Araştırılması ve Monogenik Kalıtsal Hastalıklar, Hipotermi ve Fekunditeyle İlgili Genlerin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı TAGEM/HAYSÜD/15/A01/P02/02-02 nolu proje örneklerinden elde edilen Genomik DNA’ların bir kısmı oluşturmuştur.

Ramazan AYMAZ

10/10/2022

## ÖZET

### BAZI YERLİ KOYUN IRKLARINDA FEKUNDİTE İLE İLGİLİ GEN BÖLGELERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ramazan AYMAZ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

İkinci Danışman: Doç. Dr. Yalçın YAMAN

Kemik Morfogenetik Protein Geni 15 (BMP15) ve Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF9) gibi genlerin bazı koyun ırklarında çoklu doğum (fekundite) ile ilişkili oldukları yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Bu çalışmada bazı yerli koyun ırklarında (Kıvırcık, Karacabey Merinosu, Sakız, Gökçeada, Çine Çaparı, İvesi ve Karakaçan ırklarında) BMP15 ve (Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarında) GDF9 gen bölgeleri, DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir. BMP15 Ekzon2 bölgesinde bir adet aminoasit değiştirmeyen (sinonim) P248P (Prolin/Prolin) ve bir adet aminoasit değiştiren L251P (Lösin/Prolin) olmak üzere iki farklı noktada Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) saptanmıştır. GDF9 Ekzon1 bölgesinde bir adet aminoasit değiştiren R87H (Histidin/Arginin), GDF9 Ekzon2 bölgesinde iki farklı noktada aminoasit değiştiren E241K (Glutamat/Lizin) ve V332I (Valin/İzolösin) ve iki adet aminoasit değiştirmeyen L159L (Lösin/Lösin) ve E326E (Glutamat/Glutamat) olmak üzere 5 adet SNP tespit edilmiştir. GDF9 gen bölgesinde bulunan SNP'ler ile yapılandırılan haplotiplerin yüksek D' (bağlantı dengesizliği) değerine sahip olduğu ve çalışılan ırklarda E326E ve V332I varyantların birlikte görülmelerinden dolayı aralarında tam korelasyon olduğu belirlenmiştir. Sakız ırkında E326E ve V332I varyantlarının heterozigot frekansları Kıvırcık ve Karacabey Merinosu ırklarına oranla yaklaşık üç kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. E326E ve V332I varyantları Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarında sırasıyla 0,08, 0,13 ve 0,46 olarak tespit edilmiştir. Sakız ırkının E326E ve V332I varyantlarında diğer ırklara oranla yüksek heterozigotluk frekansı göstermesi, bu varyantların çoklu doğum özelliği ile ilişkili olduğunu düşündürmekte ve sonraki çalışmalarda bu varyantlara yoğunlaşılması önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, GDF9 geni, BMP15 geni, Çoklu doğum, SNP

## ABSTRACT

### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FECUNDITY-RELATED GENE REGIONS IN SOME NATIVE SHEEP BREEDS

Ramazan AYMAZ

Department of Agricultural Biotechnology

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Fulya ÖZDİL

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yalçın YAMAN

As a result of the studies, it has been determined that genes such as Bone Morphogenetic Protein Gene 15 (BMP15) and Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) are associated with multiple births (fecundity) in some sheep breeds. In this study, BMP15 gene regions in some domestic sheep breeds (Kivircik, Karacabey Merino, Chios, Gökceada, Cine Capari, Awassi and Karakaçan breeds) and GDF9 (Kivircik, Karacabey Merino and Chios breeds) were investigated by DNA sequencing. A Single Nucleotide Polymorphism (SNP) was detected at two different points in the BMP15 Exon2 region, one non-amino acid replacement (synonymous), P248P (Proline/Proline) and one amino acid replacement (non-synonymous), L251P (Leucine/Proline). A total of 5 SNPs were detected in the GDF9 gene; a non-synonymous, R87H (Histidine/Arginine) in GDF9 Exon1, two non-synonymous, E241K (Glutamate/Lysine) and V332I (Valine/Isoleucine) and two synonymous, L159L (Leucine/Leucine) and E326E (Glutamate/Glutamate) in GDF9 Exon2 region. It has been determined that haplotypes structured with SNPs in the GDF9 gene region have high D' (linkage disequilibrium) value and E326E and V332I variants have a perfect positive correlation in the studies breeds. Heterozygous frequencies of E326E and V332I variants were found to be approximately three times higher in Chios breeds compared to Kivircik and Karacabey Merino breeds. E326E and V332I variants of the Chios breed showed a higher frequency of heterozygosity compared to other breeds, suggesting that these variants can be associated with multiple births, and it is recommended to focus on these variants in future studies.

**Keywords:** Sheep, GDF9 gene, BMP15 gene, Multiple birth (Fecundity), SNP

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TEŞEKKÜR.....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Koyunun Evcilleşme Tarihi .....	1
1.2 Türkiye Koyun Irkları .....	5
1.2.1 Kıvırcık Irkı.....	6
1.2.2 Karacabey Merinosu Irkı.....	7
1.2.3 Sakız Koyunu.....	8
1.2.4 İvesi Koyunu.....	9
1.2.5 Gökçeada (İmroz) Koyunu.....	10
1.2.6 Çine Çaparı Koyunu .....	11
<b>2. FEKUNDİTE GENLERİ İLE İLGİLİ LİTERATÜR TARAMASI.....</b>	<b>13</b>
2.1 Booroola (BMPR1B) Geni .....	13
2.2 BMP15 (Kemik Morfogenetik Proteini 15) Gen Bölgesi .....	14
2.3 GDF9 (Growth Differentiation Factor-GDF9) Gen Bölgesi .....	18
<b>3. ÇALIŞMANIN AMACI .....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>23</b>
4.1 Materyal .....	23
4.2 Metot .....	23
4.3 Tanımlayıcı İstatistikler ve Haplotip Tahminleri.....	25
<b>5. SONUÇ VE BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
5.1 Kemik Morfogenetik Proteini 15 (BMP15) Geni .....	27
5.2. Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF9) .....	31
<b>6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER .....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>EK 1 .....</b>	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.Çalışılan ırklar ve örnek sayıları (n).....	24
Çizelge 4.2 BMP15 ve GDF9 gen bölgelerine ait primer dizileri, fragment uzunlukları ve Genbank erişim numaraları .....	24
Çizelge 4.3 BMP15 ve GDF9 gen bölgelerine ait PCR döngüleri .....	25
Çizelge 4.4. Haploview programında standart renk şeması gösterimi .....	26
Çizelge 5.1 BMP15 Ekzon2 bölgesi P248P ve L251P nolu SNP'lerin görüldüğü heterozigot hayvan sayıları ve frekansları .....	29
Çizelge 5.2 BMP15 Ekzon2 bölgesi SNP'lerine ait bilgiler, gözlenen heterozigotluk ( <i>Ho</i> ), beklenen heterozigotluk ( <i>He</i> ), Hardy-Weinberg (HW) eşitliği p değerleri ve Minor Allel Frekansları (MAF).....	31
Çizelge 5.3. GDF9 Ekzon1 ve Ekzon2 Bölgesi Heterozigot Hayvan Sayıları ve SNP bölgeleri .....	32
Çizelge 5.4. GDF9 gen bölgesi SNP'lerine ait genomik pozisyon bilgileri, gözlenen heterozigotluk ( <i>Ho</i> ), beklenen heterozigotluk ( <i>He</i> ), Hardy-Weinberg (HW) eşitliği p değerleri ve Minor Allel Frekansları (MAF) .....	33
Çizelge 5.5. Türkiye yerli koyun ırklarında tespit edilen haplotipler.....	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Yabani Muflon Koyunu (Anonim, 2020a).....	2
Şekil 1.2. Arkal koyunu (Anonim, 2018).....	2
Şekil 1.3. Argali Koyunu (Anonim, 2020b).....	3
Şekil 1.4. Dünya koyun varlığı (Atmacaoğlu vd., 2016).....	3
Şekil 1.5. TÜİK verilerine göre Türkiye kırmızı et üretiminin hayvan türlerine göre dağılımı (Anonim, 2022a).....	4
Şekil 1.6. Bölgelere Göre Koyun Varlığı (Atmacaoğlu vd., 2016).....	5
Şekil 1.7. TÜİK raporuna göre 2022 yılı koyun varlığı (Anonim, 2022b).....	5
Şekil 1.8. Kıvırcık Koçu (Anonim, 2017).....	6
Şekil 1.9. Kıvırcık Koyunu (Anonim, 2016).....	7
Şekil 1.10. Merinos Koçu (Anonim, 2017).....	7
Şekil 1.11. Merinos Koyunu (Anonim, 2016).....	8
Şekil 1.12. Sakız Koçu (Anonim, 2017).....	8
Şekil 1.13. Sakız Koyunu (Anonim, 2016).....	9
Şekil 1.14. İvesi Koçu (Anonim, 2017).....	9
Şekil 1.15. İvesi Koyunu (Anonim, 2016).....	10
Şekil 1.16. Gökçeada Koçu (Anonim, 2017).....	10
Şekil 1.17. Gökçeada Koyunu (Anonim, 2016).....	11
Şekil 1.18. Çine Çaparı Koçu (Anonim, 2017).....	11
Şekil 1.19. Çine Çaparı Koyunu (Anonim, 2016).....	12
Şekil 5.1. BMP15 Ekzon1 Bölgesi 565 bç PCR ürünleri M:Thermo Scientific Gene Ruler 100bp Ladder (SMO321).....	28
Şekil 5.2. BMP15 Ekzon2 bölgesi P248P numaralı SNP'nin kromatogram görüntüsü.....	28
Şekil 5.3. BMP15 Ekzon2 bölgesi L251P numaralı SNP'nin kromatogram görüntüsü.....	30
Şekil 5.4. BMP15 Ekzon2 bölgesi P248P ve L251P numaralı SNP'lerin Mega7 görüntüsü...	30
Şekil 5.5. GDF9 Ekzon1 bölgesi 994 bç PCR ürünleri.....	32



Şekil 5.6. GDF9 Ekzon2 bölgesi 909 bç PCR ürünleri .....	32
Şekil 5.7. GDF9 Ekzon1 bölgesi R87H Nolu SNP'nin kromatogram görüntüsü .....	34
Şekil 5.8. GDF9 Ekzon1 bölgesi R87H numaralı SNP'in Mega7 görüntüsü .....	34
Şekil 5.9. GDF9 Ekzon2 L159L Nolu SNP'nin kromatogram görüntüsü.....	35
Şekil 5.10. GDF9 Ekzon2 bölgesi L159L numaralı SNP'in Mega7 görüntüsü .....	35
Şekil 5.11. GDF9 Ekzon2 bölgesi E241K nolu SNP'nin kromatogram görüntüsü .....	36
Şekil 5.12. GDF9 Ekzon2 bölgesi E241K numaralı SNP'in Mega7 görüntüsü.....	35
Şekil 5.13. GDF9 Ekzon2 bölgesi E326E ve 3V32I nolu SNP'lerin kromatogram görüntüsü	37
Şekil 5.14. GDF9 Ekzon2 bölgesi E326E ve 3V32I nolu SNP'lerin MEGA7'deki görüntüsü	37
Şekil 5.15. Kırmızı renk yüksek D' değerini ifade etmektedir.....	39
Şekil 5.16. Siyah renk yüksek $r^2$ değerini ifade etmektedir. ....	39

## SİMGELER DİZİNİ

G	: Guanin
C	: Sitozin
A	: Adenin
T	: Timin
R	: Adenin veya Guanin (Heterozigot Bireylerde)
V	: Valin
L	: Lösin
P	: Prolin
I	: İzolösin
H	: Histidin
E	: Glutamat
K	: Lizin
$\mu$ l	: Mikrolitre
l	: Litre
M	: Mol
$\mu$ m	: Mikromol

## KISALTMALAR DİZİNİ

SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
GDF9	Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
BMP15	Kemik Morfogenetik Proteini 15
BMPR1-B	Kemik Morfogenetik Proteini 15 Reseptör Tipi 1B
MAS	Marker Destekli Seleksiyon
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
ddNTP	Di-Deoksiribo Nükleik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
M.Ö.	Milattan Önce
MAF	Minör Allel Frekansı
HW	Hardy-Weinberg Genetik Dengesi
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi
GWAS	Genom Boyu İlişkilendirme

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sűresince, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gűsteren, nerileri ile beni yűnlendiren, manevi olarak desteęini hiç esirgemeyen baŐta danıŐmanım Prof. Dr. Fulya ÖZDİL ve Doç. Dr. Yalçın YAMAN'a, deęerli mesai arkadaŐım Yűksek Biyoműhendis Murat KELEŐ'e ve yardımlarını esirgemeyen Halim İbrahim ERBAŐ'a teŐekkűr ederim. Eęitimim boyunca her zaman yanımda olup bana her tűrlű desteęi veren her zaman ilgisi, yardımı ve sevgisiyle yanımda olan biricik eŐim Meral AYMAZ'a ve sıkıntılı ve stresli gűnlerimde bana dűnyanın en bűyűk umudunu veren oęluma en içten duygularım ile sonsuz teŐekkűr ederim.

Ramazan AYMAZ

Ziraat Műhendisi

## 1. GİRİŞ

Türkiye’de, özellikle son 10 yılda ortaya çıkan kırmızı et açığını kapatmak için her yıl yüzbinlerce ton karkas veya binlerce baş kasaplık canlı hayvan ithal edilmektedir. Girdi maliyetlerinin (yem, ilaç, aşı vs.) artmasıyla birlikte üretilen et fiyatlarının artması tüketiciye olumsuz olarak yansımıştır. Daralan mera alanları, köyden kente göç ve girdi maliyetlerinin yüksek olması gibi nedenler kırmızı et açığının ülke imkânlarıyla karşılanmasını daha da zora sokmaktadır. Bütün bu sayılan olumsuzluklara karşı, kırmızı et üretimini arttırmak amacıyla yapılacak her türlü faaliyet büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla çiftlik hayvanlarında moleküler genetik yöntemlerin kullanımı ile et üretimini arttırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Türkiye’de geleneksel olarak yapılmakta olan koyun ve keçi yetiştiriciliği neredeyse Türk tarihi kadar eskidir. Büyükbaş çiftlik hayvanlarının aksine, koyun ve keçiler tarıma uygun olmayan, dağlık ve düşük kaliteli meraları oldukça etkin değerlendirebilmektedir. Dahası, Türkiye; hemen her coğrafi bölgeye mükemmel şekilde uyum sağlamış, olumsuz çevre, engebeli ve düşük kaliteli mera koşullarında verimliliğini sürdürebilen çok sayıda koyun ırkına sahip bir ülke konumundadır. Mevcut koyun ırkı zenginliğimiz, kırmızı et açığının kapatılması yönünde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Ancak geleneksel yetiştiricilik uygulamalarının iyileştirilmesi ve koyun ırklarımızın verimliliğinin artırılması şüphesiz bu potansiyeli daha da güçlendirecektir. Bu bağlamda koyunculukta doğum başına düşen kuzu sayısını artırmak verimliliği ve karlılığı artırmak adına önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Fenotipik verilere dayalı olan klasik ıslah yöntemleri, uzun zaman almaktadır. Çünkü genetik ilerleme için birkaç generasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, moleküler genetik çalışmalar ve Marker Destekli Seleksiyon (MAS: Marker Assisted Selection) stratejilerinin oluşturulması ve klasik ıslah uygulamalarına entegre edilmesi, üreme verimliliğinin genetik olarak iyileştirilmesi için yüksek öneme sahiptir (Abdoli vd., 2016).

### 1.1 Koyunun Evcilleşme Tarihi

Koyunlar insanlar tarafından evcilleştirilmiş ve uygarlığın gelişip yayılması ile birlikte dünyaya yayılmıştır. Yazılı tarihin başlangıcından önce koyun yapağısının kullanıldığı, iplik bükülüp kumaş üretildiği ile ilgili pek çok bilgi mevcuttur. M.Ö. 4000 yıllarında Babillilerin dokumacılıkta yün kullandığı bilinmektedir. Böylelikle ilk evcilleştirilen hayvanlardan biri olan koyun, insanlar için en verimli ürünleri sağlayan hayvan olmaktadır (Kaymakçı, 2013). Yapılan

çalışmalarda, kimi araştırmacılara göre evcil koyun ırkları iki yabani formdan Muflon (*Ovis ammon musim*) (Şekil 1.1) ve Arkal (*Ovis Orientalis*) (Şekil 1.2), kimi araştırmacılara göre ise üç formdan (Muflon, Arkal ve Argali (*Ovis ammon ammon*)) (Şekil 1.3) geldiği kabul edilmektedir (Kaymakçı, 2013).



Şekil 1.1. Yabani Muflon Koyunu (Anonim, 2020a).

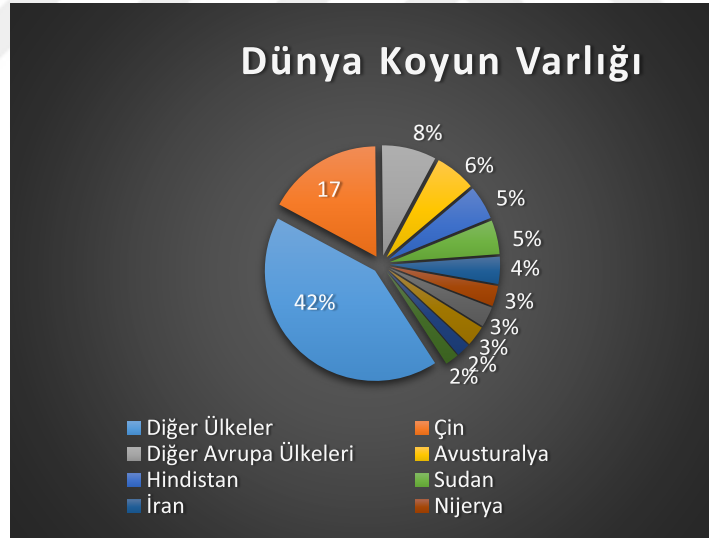


Şekil 1.2. Arkal koyunu (Anonim, 2018).



Şekil 1.3. Argali Koyunu (Anonim, 2020b).

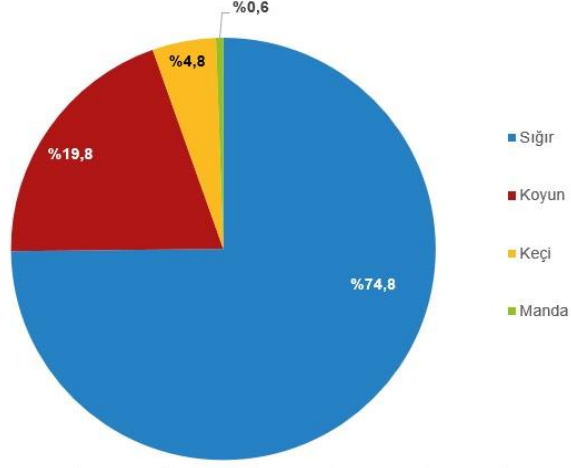
Dünya’da koyun varlığı bakımından ülkeler sıralandığında ilk sırada Çin gelmektedir. Onu sırasıyla, Avustralya, Hindistan, Sudan takip etmekte, Türkiye 8. sırada yer almaktadır (Şekil 1.4.) (Atmacaoğlu vd., 2016).



Şekil 1.4. Dünya koyun varlığı (Atmacaoğlu vd., 2016).

Türkiye’nin coğrafi yapısı ve geniş meraları göz önüne alındığında, ucuz maliyetli ve kaliteli hayvancılık için önemli potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Ülkemizdeki meraların büyük çoğunluğu düşük verimli olup, küçükbaş hayvancılık açısından daha uygundur. Özellikle koyun ve keçi yetiştiriciliği, ülkemizde yapılabilecek en ucuz maliyetli hayvancılıktır. Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinin Türkiye ekonomisinde özel bir önemi vardır. Toplam et üretiminin %24,75’i, süt üretiminin %12,35’si koyundan sağlanmaktadır (Atmacaoğlu vd.,

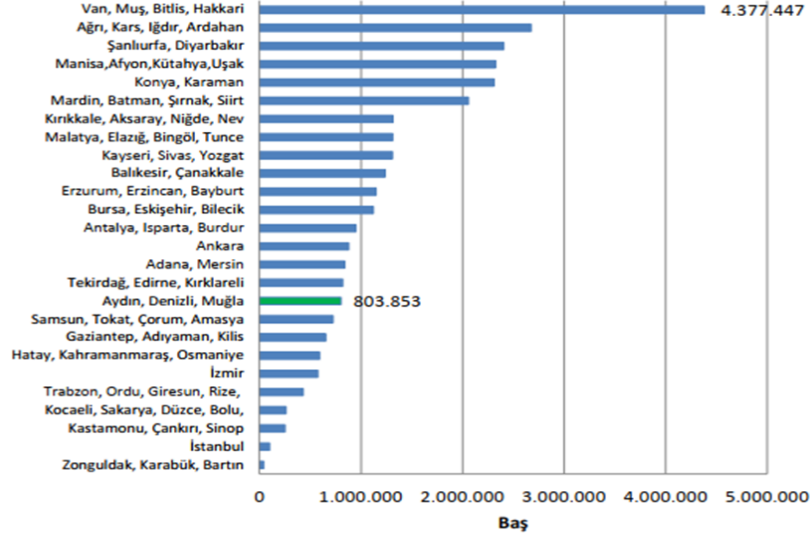
2016). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2020-2021 yıllarında üretilmiş olan 1.785.952 ton kırmızı etin 345.639 tonu koyun eti olarak bildirilmiş ve hayvan türlerine göre dağılımı Şekil 1.5'te verilmiştir (Anonim, 2022a).



Şekil 1.5. TÜİK verilerine göre Türkiye kırmızı et üretiminin hayvan türlerine göre dağılımı (Anonim, 2022a)

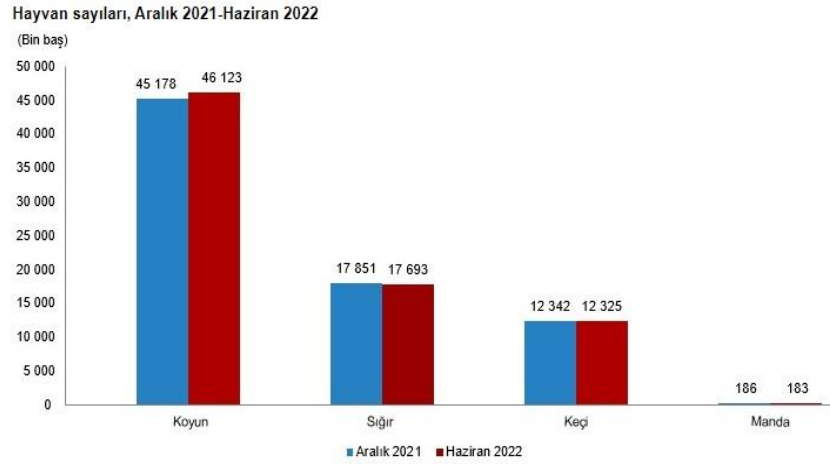
Türkiye’de hayvancılığın yoğun şekilde yapıldığı bölgelerin başında Doğu Anadolu Bölgesi gelmektedir. Bu bölge, Türkiye’deki küçükbaş hayvan varlığının %34,3’üne sahiptir. Doğu Anadolu Bölgesi içerisinde ise küçükbaş hayvancılığın yoğunlaştığı bölgeler Bitlis, Hakkâri, Muş ve Van illeridir. Bu dört il toplam hayvansal üretim değerinin %79,11’ini karşılamaktadır (Şekil 1.6). Koyun sütü üretimi, ülke üretiminin %15’ini, toplam kırmızı et üretiminin %1,5’ini, deri üretiminin de % 3’ünü bu iller karşılamaktadır. Koyun sütü üretiminde Van ili özellikle öne çıkmaktadır (Atmacaoğlu vd., 2016).





Şekil 1.6. Bölgelere Göre Koyun Varlığı (Atmacaoğlu vd., 2016)

Türkiye İstatistik Kurumu raporunda Haziran 2022 tarihi itibarıyla Türkiye’de 46 milyon 123 bin baş koyun bulunmaktadır(Şekil 1.7) (Anonim, 2022b).



Şekil 1.7. TÜİK raporuna göre 2022 yılı koyun varlığı (Anonim, 2022b).

## 1.2 Türkiye Koyun Irkları

Ülkemizin her türlü coğrafi koşullarına uyum sağlamış, çoğu yüzlerce yıldır yetiştirilen zengin bir koyun ırkı çeşitliliği bulunmaktadır. Örneğin, Marmara bölgesinde yetiştirilmekte olan Kıvırcık ırkı özellikle Trakya Bölgesinde yaygın bir yetiştiriciliğe sahiptir. Bunun yanında Çanakkale Gökçeada’da İmroz olarak da bilinen Gökçeada ırkı yetiştirilmektedir. Doğu Anadolu Bölgesinde Morkaraman ve Tuj, Güney Doğu Anadolu Bölgesinde İvesi, Karadeniz Bölgesinde Karayaka, İç Anadolu Bölgesinde Akkaraman, Dağlıç, Ege Bölgesinde Sakız,

Gökçeada ve Aydın Madran Dağı eteklerinde yetiştirilen ve günümüzde yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan Çine Çaparı gibi koyun ırkları yetiştirilmektedir (Ertuğrul vd., 2009).

Yerli koyun ırklarımız önemli bir genetik çeşitlilik sunmasına rağmen genellikle bazı verim yönlerinden düşük kalmaktadırlar. Yerli ırklarımızın düşük verimlerini geliştirmek amacıyla çoğunlukla Avrupa orijinli terminal ırkların koçları kullanılarak çeşitli melezleme çalışmaları yapılmıştır ve bu çalışmaların bir kısmı halen devam etmektedir. Yapılan melezleme çalışmaları sonucu sahada daha çok yayılmış olan Karacabey Merinosu, Anadolu Merinosu, Konya Merinosu, Ramlıç, Tahirova, Türkgeldi, Polatlı, Sönmez, Menemen ve Bafra gibi birçok ırk veya melezi mevcuttur (Ertuğrul vd., 2009).

### 1.2.1 Kıvırcık Irkı

Genellikle Trakya Bölgesi, Güney Marmara ve Ege Bölgesinin bazı illerinde yetiştirilmekte olan Kıvırcık ırkı, koyun varlığımızın % 6-7'sini oluşturmaktadır (Kaymakçı, 2013). İnce ve yağsız bir kuyruğa sahip olan Kıvırcık ırkında etler arasındaki yağ dağılımı homojen bir şekilde gerçekleşmiştir. Bu durum ette mermerleşme meydana getirmekte ve ete lezzet katmaktadır (Bayram & Odabaşı, 2011).

Vücut, baş ve ayaklar beyaz renkte olup nadir olsa da ayak ve kafada siyahlıklar olabilir (Şekil 1.8 ve Şekil 1.9). Et randımanı % 50 olan kıvırcık ırkında laktasyon süt verimi 70-100 litre ve döl verimi ise 1,40-1,50'tir (Anonim, 2022b).



Şekil 1.8. Kıvırcık Koçu (Anonim, 2016)



Şekil 1.9. Kıvırcık Koyunu (Anonim, 2016)

### 1.2.2 Karacabey Merinosu Irkı

1934 yılından itibaren Alman et merinosları ile yerli Kıvırcık koyunların melezlenmesi sonucu ortaya çıkmış olan bu ırk, başlangıçta yapağısı için tercih edilmesine rağmen sonraki zamanlarda et veriminden tercih edilmiştir. İri cüsseli, karkas ve yapağı kalitesi ile hastalıklara dayanıklılık önemli özelliklerini oluşturmuştur (Anonim, 2017).

Vücudu beyaz olan Karacabey Merinosunda kuyruk yapısı incedir. Dişiler tamamen boynuzsuz olmasına karşın erkeklerin bir bölümü boynuzludur (Şekil 1.10 ve Şekil 1.11). Canlı ağırlık 80-100 kg ve döl verimi 1,4-1,45 olan bir ırktır (Anonim, 2017).



Şekil 1.10. Merinos Koçu (Anonim, 2016)



Şekil 1.11. Merinos Koyunu (Anonim, 2016)

### 1.2.3 Sakız Koyunu

Ege Denizi'nde bulunan Sakız Adası'ndan adını alan yerli koyun ırklarımızdan biri olan Sakız Irkı genellikle İzmir ve çevre illerde saf olarak yetiştirilmekle birlikte İstanbul'dan Antalya 'ya kadar olan sahil kesiminde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yüksek döl verimi ile öne çıkan bu ırk aynı zamanda yüksek süt verimine de sahiptir (Anonim, 2016).

Beyaz renkli olan vücutta kulak, ayak ve göz çevrelerinde siyahlıklar mevcuttur. Koçları spiral ve uzun boynuzlu olan Sakız ırkında ince yağsız bir kuyruk vardır (Şekil 1.12 ve Şekil 1.13). Laktasyon süt verimi 180-200 litre ve döl verimi 1,7-2,3 olarak görülmektedir (Anonim, 2016).



Şekil 1.12. Sakız Koçu (Anonim, 2016)



Şekil 1.13. Sakız Koyunu (Anonim, 2016)

#### 1.2.4 İvesi Koyunu

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Şanlıurfa, Hatay ve Gaziantep gibi illerde yetiştiriciliği yapılan İvesi ırkı, kurak arazilere uygun, hem et ve hem süt verimi yönünden öne çıkan yerli bir ırkıdır (Anonim, 2009).

Vücut rengi beyaz-krem olmasına rağmen baş kirli sarı ve kahve renklidir (Şekil 1.14 ve Şekil 1.15). Laktasyon süt verimi, 170-180 litre; canlı ağırlık, 60-70 kilogram olan İvesi ırkında döl verimi ise 1,2-1,25 tir (Anonim, 2022b).



Şekil 1.14. İvesi Koçu (Anonim, 2016)



Şekil 1.15. İvesi Koyunu (Anonim, 2016)

### 1.2.5 Gökçeada (İmroz) Koyunu

Adını aldığı Çanakkale Gökçeada’da yetiştiriciliği yaygın bir şekilde yapılan Gökçeada ırkı, kısa boylu, çok çevik ve hareketli yerli bir ırktır. Gökçeada dışında Çanakkale ilinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Dağlık alanlara uyum sağlamış, hastalıklara dayanıklı ve yarı yabani bir hayat sürmektedir (Anonim, 2016).

Vücudu beyaz olmasına karşın göz ve ağız çevresinde siyahlıklar olabilir. Koyunları boynuzsuz, koçlar yana doğru spiral boynuzlara sahiptir. İnce ve yağsız olan kuyruğa sahip olan Gökçeada ırkında süt verimi 120 litre, döl verimi ise 1,2’dir (Anonim, 2016; Soysal, 2004).



Şekil 1.16. Gökçeada Koçu (Anonim, 2016)



Şekil 1.17. Gökçeada Koyunu (Anonim, 2016)

### 1.2.6 Çine Çaparı Koyunu

Ülkemizde sadece Aydın ilinde bulunan bu ırkımız koruma altına alınmış olup yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Madran Dağı eteklerinde yetiştirilen, bölgenin dağlık, zor ve kötü çevre şartlarına uyum sağlamış bir ırktır (Anonim, 2016; Soysal, 2004). Günümüzde saf olarak sadece tek sürü halinde ve yaklaşık 200 adet Çine Çaparı koyunu bulunmaktadır.

Yağlı bir kuyruğa sahip olan bu yerli ırkımız da beyaz bir vücuda sahip olmasına rağmen, ayak ve başta siyahlıklar bulunmaktadır (Şekil 1.18 ve Şekil 1.19). Döl verimi 1,1; laktasyon süt verimi ise 50 litredir (Anonim, 2016; Soysal, 2004).



Şekil 1.18. Çine Çaparı Koçu (Anonim, 2016)



Şekil 1.19. Çine Çaparı Koyunu (Anonim, 2016)



## 2. FEKUNDİTE GENLERİ İLE İLGİLİ LİTERATÜR TARAMASI

Günümüzde hayvancılık yaparak geçimini sağlayan insanların çoğu artan maliyetler sebebi ile hayvancılığı bırakmış, birçoğu da bırakmak üzeredir. Özellikle dışa bağımlı olduğumuz yem hammaddeleri yetiştiricileri büyük bir yük altında bırakmıştır. Hayvancılıkta karlılığın artırılması ve tekrar yetiştirici gözünde cazip hale getirilmesi önemli bir husustur. Karlılığın artırılması anlamında birim anaç başına düşen yavru sayısını artırmak izlenilebilecek önemli stratejilerden biridir.

Fekundite bir dişinin bir yılda oluşturduğu yumurta sayısıdır (Çelikeloğlu vd., 2018). Koç katım döneminde rasyondaki enerji miktarını artırmaya dayanan flushing uygulaması ile koç altı koyun başına düşen kuzu verimi bir dereceye kadar artırılabilir.

Üreme kabiliyetinin çiftlik hayvanlarının karlılığı üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Üreme yeteneği doğurganlık ve üretkenlikle ölçülmektedir. Doğurganlık bir yılda üretilen kuzu sayısı, yıllık kuzulama sayısı ve bir batındaki yavru sayısı olarak ifade edilmektedir. Üreme özellikleri tipik olarak düşük ile orta kalıtıma sahiptir; bu nedenle fenotipik verilere dayalı geleneksel yetiştirme yöntemleri, yalnızca zaman alıcı bir süreç olmaktadır. Çünkü düşük bir genetik ilerleme için birkaç generasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, moleküler genetik çalışmalar ve marker destekli seleksiyon (MAS), üreme verimliliğinin genetik olarak iyileştirilmesi için yüksek bir öneme sahiptir (Abdoli vd., 2016). Üreme karmaşık bir süreçtir. Yumurtlama oranı ve batın boyutu gibi özellikler genetik olarak birçok minör genden ve ayrıca doğurganlık (Fec) genleri adı verilen bazı majör genlerden etkilenmektedir. Bu gen bölgelerinden Kemik Morfogenetik Proteini 15 Reseptör Tipi 1B (Booroola-BMPR1B), Kemik Morfogenetik Proteini 15 (BMP15), Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF9), gibi genlerin fekundite ile ilişkili oldukları bildirilmiştir (Liu vd., 2014, Dinçel vd., 2015). Bu genler hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir.

### 2.1 Booroola (BMPR1B) Geni

BMPR1B geni, 6. kromozom üzerinde bulunan oositlerde ve granüloz hücrelerinde eksprese edilen, yumurtlama ve batın boyutu ile ilişkili olduğu bildirilen bir gen bölgesidir (Davis, 2004). Bu gen, 3234 bp uzunluğunda, 12 ekzon ve 11 intron bölgesinden oluşmaktadır. Bu gen bölgesinde görülen ve Booroola mutasyonu olarak adlandırılan bu mutasyon adını Avustralya'da yetiştirilen Booroola merinoslarından almıştır. İlk başlarda belirli Booroola merinosu hatlarında görülen ve sonraki generasyonlarda da tutarlı bir şekilde devam eden bu

mutasyonla kuzu verimi artışı olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda BMPR-1B gen bölgesindeki tek bir nokta mutasyonunun bu özelliği belirlediği tespit edilmiştir. Booroola mutasyonunu heterozigot durumda taşıyan koyunların taşımayanlara kıyasla ekstra 1,5 ovulasyon sayısına ve ekstra 1 kuzu sayısına sahip olduğu, mutasyonu homozigot taşıyıcılarda ise ovulasyon sayısı ve kuzu verimindeki artışların sırasıyla ekstra 3 ovulasyon ve ekstra 1,5 kuzu şeklinde olduğu bildirilmiştir (Davis, 2004; Liu vd., 2014).

## 2.2 BMP15 (Kemik Morfogenetik Proteini 15) Gen Bölgesi

Kemik morfogenetik proteini 15 (BMP15) veya FecX geni, başka bir doğurganlığı etkileyen majör gendir ve özellikle oositlerde eksprese edilmektedir. Bu gen bölgesi, koyunlarda doğurganlığı etkileyen genler arasında en polimorfik lokus olarak da bilinmektedir (Abdoli vd., 2016). BMP15 gen bölgesi tarafından kodlanan protein, dönüştürücü büyüme faktörü-beta üst ailesinin bir parçası olan kemik morfogenetik protein ailesinin bir üyesidir. BMP15 geni, granüloza hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenler, erken folikül büyümesinde önemli bir role sahiptir. Bu gen bölgesi, oositlerin gelişimi ve olgunlaşması dâhil olmak üzere çok çeşitli hücresel davranışlardan sorumlu olan bir dizi başka protein (SMAD yolu) aracılığıyla etki etmektedir (Galloway vd., 2000). Bu gen, X kromozomu üzerinde bulunmakta olup 5,6 kilobaz (kb) büyüklüğündedir. İki ekzon ve bir intron bölgesinden oluşan BMP15 gen bölgesi, 393 aminoasit kodlamaktadır (Çelikeloğlu vd., 2018). X kromozomunda bulunduğundan dolayı BMP15 gen bölgesini erkekler yalnızca bir kopya taşır (XY) ve bunu tüm dişi kuzulara aktarırken erkek kuzulara aktaramazlar (Abdelgader vd., 2020).

Koyunlarda doğurganlığı etkileyen BMP-15 gen bölgesinde 8 mutasyon tespit edilmiştir. Buldukları koyun ırkına göre isimlendirilen bu mutasyonlar Inverdale koyunlarında FecXI, Cambridge koyunlarında FecXG (Galway mutasyonu), Hanna koyunlarında FecXH, Belclare koyunlarında FecXB, Lacaune koyunlarında FecXL, Rasa Aragonesa'da FecXR, Grivette koyunlarında FecXGr, Olkuska koyunlarında FecXO olarak tanımlanmıştır (Abdelgader vd., 2020).

FecX kalıtım modeli, 11 koyundan 33 kuzu elde edilen Romney koyunu sürüsünde bulunmuştur. Hem Hanna hem de Inverdale koyunlarında taşıyıcı bir koçun, geni tüm koyunlara aktarması sonucu doğurganlık artmıştır. Ancak sürüdeki erkeklerin hiçbirine geçmediği tespit edilmiştir (Davis, 2004). X kromozomunun 2. ekzonunda yer alan Inverdale ve Hanna allelinin bir kopyası, batin boyutunu koyun başına 0,6 kuzu arttırırken, her iki ebeveynden allel alan

homozigot koyunlarda küçük ve gelişmemiş yumurtalıklarla karakterize edilen kısırılık görülmektedir (Davis, 2004).

FecXG mutasyonu Cambridge koyunlarında tespit edilmiştir ve Galway mutasyonu olarak bilinmektedir. BMP15 geninin ikinci ekzonunda bulunan bu mutasyon koyun başına fazladan 0,7 kuzu verimine neden olduğu bildirilmektedir (Abdelgader vd., 2020).

Fransa'nın prolific Lacaune koyunlarında da art arda çoklu doğum gösteren bir sürüde BMP15 mutasyonu varlığından şüphelenilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda Ekzon2'de tespit edilen yeni bir C53Y mutasyonunun fekundite fenotipine neden olduğu bildirilmiştir. Lacaune koyunlarında görülen heterozigot FecXL taşıyıcıları, taşıyıcı olmayanlara kıyasla yaklaşık 1,5 kat ekstra yumurtlama göstermiştir. Bu oran diğer ırklardan ziyade sadece Lacaune koyunlarında görülmektedir (Bodin vd., 2007).

FecXB mutasyonu, İngiltere'de bulunan Belclare ırklarında tespit edilmiştir. BMP15 geninde Ekzon2 bölgesinde 1100. nükleotidde bulunan mutasyon sonucu Guanin nükleotidi Timin nükleotidine dönüşmüştür. Bu mutasyon sonucu serin aminoasidi izolösin aminoasidine dönüşerek fekunditeye etki sağlamıştır. FecXB mutasyonu Cambridge sürülerinde de incelenmiş ancak hiçbir hayvanda görülmediği bildirilmiştir (Hanrahan vd., 2004).

Polonya'da yetiştirilen Olkuska koyun ırkı mükemmel analık kabiliyetine ve yüksek doğurganlığa sahip olan bir koyun ırkıdır. Yüksek üreme performansından dolayı bu ırkta da BMP15 geni incelenmiş ve FecXO olarak adlandırılan tek bir nokta mutasyonu tespit edilmiştir. FecXO mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan koyunlarda 0,7, homozigot olarak taşıyan koyunlarda ise 1,07 ekstra kuzu artışı gözlenmiştir. Diğer BMP15 mutasyonlarında bildirilen homozigot koyunlardaki kısırılık durumu, FecXO mutasyonun homozigot taşıyıcılarında diğer BMP15 mutasyonlarının aksine infertilite oluşmadığı, bu özelliği nedeniyle FecXO mutasyonunun koyun yetiştiriciliğinde çok değerli olduğu bildirilmektedir (Smolucha vd., 2020).

Bazı koyun ırkları doğal olarak prolific oldukları için yetiştiriciler tarafından daha fazla tercih edilirler. Fransız Grivette ve Polonya Olkuska ırkları bu prolific koyunlardandır. Bu koyunlarda batın boyutu ve yumurtlama oranını arttıran mutasyonların incelenmesi amacıyla genom boyu ilişkilendirme (GWAS) analiz çalışmaları yapılmış ve prolific koyunlar ile prolific olmayan koyunlar genotiplendirilmiştir. BMP15 geninde yapılan dizileme çalışmalarında Grivette ve Olkuska ırklarında FecXGr ve FecXO mutasyonlarının gözlemlendiği bildirilmiştir

(Demars vd., 2013). FecXGr ve FecXO mutasyonlarını taşıyan homozigot koyunların kuzu verimi, diğer BMP15 mutasyonlarında bildirilen kısırılık ile tezat olarak hiperprolifiktirler. FecXGr mutasyonu Treonin amino asidini İzolösin amino asidine dönüştürürken, FecXO mutasyonu ise Asparagini, Histidine dönüştürmektedir (Demars vd., 2013)

BMP15 gen bölgesi 2. ekzonunda meydana gelen mutasyonlardan birisi de İspanyol koyunu olan Rasa Aragonesa ırkında tespit edilen ve X kromozomunun 56.595.467-56.595.483 bç arasındaki 17 bç bir delesyona sebep olan FecXR mutasyonudur. Bu delesyon sonucu heterozigot koyunlarda doğurganlık artarken homozigot koyunlarda kısırılık görüldüğü bildirilmektedir (Martinez-Royo vd., 2009).

Benzer bir başka çalışmada ise Rasa Aragonesa koyunlarında GDF9 ve BMP15 gen bölgelerinde BMP15 geninin Ekzon2 bölgesinde 17 bç bir delesyon meydana geldiği bulunmuştur. Koyunlarda kuzulama oranı 1,36 iken delesyon olan heterozigot koyunlarda yüksek üretkenlik tespit edilmiş ve kuzulama oranı 2,66 olarak bulunmuştur. Heterozigot koyunlarda ikiz ve üçüz doğumlar meydana gelmişken homozigot koyunlarda yumurtalık yetmezliği ve kısırılık görülmüştür (Monteagudo vd., 2009).

Türkiye’de yetiştirilen 5 farklı yerli koyun ırkında PCR-RFLP tekniğiyle BMP15 gen bölgesine ait mutasyonların incelendiği bir araştırmada ilgili gen bölgesinde 4 farklı mutasyonun (FecXG, FecXH, FecXI veFecXB) varlığına bakılmıştır. Dağlıç, Akkaraman, İvesi, Karakaş ve Tuj ırklarında yapılan bu çalışma sonucunda bütün ırklar, FecXG, FecXH, FecXI veFecXB bakımından monomorfik olarak bulunmuştur. Daha önce Abdelgader vd. (2020), Davis (2004), Hanrahan vd. (2004) tarafından yapılan çalışmalarda bildirilen mutasyonlardan hiçbirine rastlanılamamıştır (Karşlı vd., 2012).

İspanya’nın Rasa Aragonesa ırkı koyunlarda yapılan bir çalışmada BMP15 gen bölgesinde FecXR mutasyonunu taşıyan koçlar (n=10) ile taşımayan koçlar (n=5)’da sperma kalitesi, testis özellikleri ve doğurganlık hızları açısından farklılıkların olup olmadığı karşılaştırılmıştır (Abecia vd., 2020). FecXR mutasyonunu taşıyan koçlarda mutasyon taşımayan koçlara göre hızlı sperm oranı ( $p<0,05$ ), yüksek kütle hareketliliği  $p<0,05$ ) ve düşük oranda yavaş sperm oranı ( $p<0,0001$ ) tespit edilmiştir. Bunun yanında FecXR mutasyonu testis uzunluğu, testis çapı ve ortalama skrotal çevre ile bir ilişkiye rastlanılmamıştır. Mutasyonu taşıyan koçlardan daha yüksek oranda gebe koyun elde edilip sonuç olarak yüksek kaliteli sperm üretimi elde edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre bazı sperm

parametrelerinde, özellikle mas motilite ve hızlı sperm oranını yüksek bulunmuştur (Abecia vd., 2020).

Sudan ırklarından olan Dubasi, Shugor ve Watish koyun ekotiplerinde yapılan bir çalışmada FecXG nokta mutasyonuna bakılmıştır. İncelenen ırklarda BB, Bb ve bb olarak bulunan genotiplerin frekansları sırasıyla 0.31, 0.69 ve 0.00 iken; allel frekansları B için 0.66 ve b için ise 0,34 olarak tespit edilmiştir. İncelenen ırklar içerisinde akraba olan Watish ve Shugor ırklarında FecXG nokta mutasyonunun varlığının batın boyutunu 0.17 kuzu arttırdığı gözlemlenmiştir (Abdelgader vd, 2020).

Niu vd. (2021) tarafından Cele Black ırkı koyunlarda yapılan çalışmada BMP15 geni Ekzon2 bölgesinde L251P pozisyonunda bir SNP tespit edilmiştir. Bu SNP'in, Cele Black ırkı koyunlarda doğurganlığı etkileyen önemli bir mutasyon olduğu gösterilmiştir. Ekzon1'de 3 bç'lik (CTT) bir delesyon tespit edilmiştir. BB ve B+ olarak tespit edilen genotipler arasından koyunların batın boyutu arasında önemli ölçüde farklılıklar bulunmuştur. Ancak mutasyon taşımayan homozigot (++) ile mutasyon taşıyan homozigot (BB) arasında ve mutasyon taşımayan homozigot (++) ve heterozigot (B+) arasındaki farklar önemli bulunmamıştır (Niu vd., 2021).

2021 yılında yayınlanan bir başka çalışmada BMP15 gen bölgesinin tamamı DNA dizi analizi ile dizilenmiştir. Yapılan ilişki analizinde ise intron bölgesinde 3, Ekzon2 bölgesinde 1 adet (L251P) olmak üzere 4 SNP, batın bölgesi ile ilişkilendirilmiştir. Söz konusu SNP bölgelerinde heterozigot koyunların homozigot koyunlara göre daha büyük batın boyutuna sahip olduğu bulunmuştur (Di vd., 2021).

Türkiye ırklarından olan Ramlıç ve Dağlıç koyunlarında yapılan bir çalışmada BMP15, GDF9 ve BMP1B gen bölgeleri dizilenmiştir. Çalışmada BMP15 geni Ekzon1 bölgesinde 3 bç (CTT) bir mutasyon tespit edilmiş ve bu mutasyonun çoklu doğumla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Çelikeloğlu vd., 2021).

2021 yılında yapılan PCR-RFLP çalışmasında, FecXI (Inverdale) mutasyonunu İvesi ırkında (n=88) araştırılmış ancak herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (Gedik 2021).

Diñçel vd. (2015) tarafından yerli Sakız ırkında PCR-RFLP tekniğiyle FecB (Booroola), CAST (Calpastatin) ve BMP15 (FecXI ve FecXG) genlerindeki polimorfizmler araştırılmış, incelenen yöntem ile Sakız ırkında mutasyon tespit edilememiştir.

Yine Dinçel ve arkadaşları 2018 yılında Türkiye yerli ırklarından Sakız ırkında BMP15 geninin FecXB mutasyonu varlığını araştırmışlar ve yapılan PCR-RFLP çalışması sonucunda tüm bireylerde (n=77) FecXB mutasyonuna rastlanılamamıştır (Dinçel vd., 2018).

### **2.3 GDF9 (Growth Differentiation Factor-GDF9) Gen Bölgesi**

Bir adet intron ve iki adet ekzon bölgesinden oluşan GDF9 geni, 2,5 kb büyüklüğündedir ve 453 amino asit kodlamaktadır. Koyunlarda ovulasyon ve doğum oranlarına etkisi olduğu bulunan GDF9, 5. kromozom üzerinde bulunmaktadır (Çelikeloğlu vd., 2018). BMP15 gibi, otozomal GDF9 geni de granüloza hücre fonksiyonu üzerindeki etkisiyle foliküler büyümeyi kontrol etmede önemli fonksiyona sahiptir (Galloway vd., 2000; Hanrahan vd., 2004).

GDF9 geninde tanımlanmış 29 varyasyon bulunmuştur ve bu alellerin bazıları koyunlarda yumurtlama oranında artış ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Cambridge ve Belclare koyunlarında fekundite ile G1-G8 olarak adlandırılan sekiz mutasyon tespit edilmiştir. GDF9 genindeki bir mutasyonun, BMP15 geninde bulunan aktive edici mutasyonlara benzer bir şekilde artmış yumurtlama oranı ve kısırılığa neden olduğu ilk kez bu çalışmada bildirilmiştir (Hanrahan vd., 2004).

BMP15 gibi, otozomal GDF9 da granüloza hücre fonksiyonu üzerindeki etkisiyle foliküler büyümeyi kontrol etmede önemli bir role sahiptir. GDF9, granüloza hücre fonksiyonu üzerindeki etkisiyle foliküler büyümeyi kontrol etmede önemli bir role sahiptir (Galloway vd., 2000; Hanrahan vd., 2004). GDF9'un yokluğu homozigotlarda birincil aşamada foliküler büyümeyi bloke ederek kısırılığa neden olurken, GDF9'un sadece bir kopyasının inaktivasyonu yumurtlama oranını artırmaktadır (Hanrahan vd., 2004). BMP15 ve GDF9 doğurganlık alelleri, homozigot dişilerde kısırılıkla birlikte sırasıyla X'e bağlı ve otozomal dominant kalıtım modeli göstermektedir (Galloway vd., 2000; Hanrahan vd., 2004). BMP15 ve GDF9'daki farklı mutasyonların, yumurtlama oranının artmasına veya kısırılığa neden olduğu bildirilmektedir.

İzlanda Thoka koyunlarında yapılan bir çalışmada GDF9 geni çalışılmış ve heterozigot koyunlarda doğurganlık artarken homozigot mutasyon görülmeyen koyunlarda kısırılık olduğu bildirilmiştir (Nicol vd., 2009). Oosit faktörünün önemini vurgulayan bu çalışmada homozigot yumurtalık morfolojisinin ve büyüyen foliküllerde normal olarak aktivite olan bir dizi genin analizi, GDF9'un oosit aktivasyonunda değil folikülün daha sonraki gelişiminde rol oynadığını göstermiştir (Nicol vd., 2009).

Brezilya Santa Ines koyunlarında yapılan bir çalışmada GDF9 ve BMP15 gen bölgeleri dizilenmiş ve bulunan bir alelin yumurtlama oranında % 82, doğurganlıkta ise % 58 oranında artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Silva vd., 2011).

İran'da Moghani ve Ghezel koyunlarında yapılan bir çalışmada GDF9 ve BMP15 gen bölgeleri RFLP yöntemi ile genotiplendirilmiş ve her iki bölgede de farklı genotiplere sahip her iki ırktan bireylerin % 12,5'i ikiz doğum yapmıştır (Barzegari vd. 2010). BMP15 ve GDF9 genlerinde bazı nükleotid değişimlerinin kısırlığa sebep olduğunun tespit edildiği çalışmanın aksine (Hanrahan vd., 2004) bir başka çalışmada yedi fertil koyunun bu genlerdeki mutasyonlar yönünden homozigot olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, çalışmada bulunan tek infertil koyunun hem GDF9 hem BMP15'in homozigot varyantlarını taşıdığı rapor edilmiştir (Barzegari vd., 2010).

Sakız, Gökçeada, Kıvrıcık ve İvesi ırklarında PCR-RFLP tekniğiyle yapılan çalışmada BMP15, GDF9 ve BMPR-1B genlerinde bulunan mutasyonlar araştırılmıştır. Sonuç olarak FecXI, FecXH, FecXB ve FecB mutasyonları homozigot tespit edilmişken yalnız FecXG ve GDF9 gen bölgesinde yer alan FecGH mutasyonları heterozigot olarak bulunmuştur. Daha önce bildirilen mutasyonlarda homozigot koyunlarda kısırlık ve heterozigot koyunlarda prolificlik özelliği bildirilmiştir. Prolifiklik özelliği ile bilinen sakız koyununda bir batında iki veya daha fazla kuzu olmasına karşın incelenen bu mutasyonlarda herhangi bir varyasyon tespit edilememiştir (Esen Gürsel vd., 2011).

Hindistan'da prolific özelliği ile büyük bir öneme sahip olan Bonpala koyunlarında yapılan bir çalışmada ise BMPR1B, GDF9 ve BMP15 genleri çalışılmıştır. Yapılan çalışmada BMP15 geninde polimorfizm tespit edilememiştir. Ancak GDF9 ve BMPR1B genlerinde polimorfizm bulunmasına rağmen G1 (87 nolu SNP) ve G4 (241 nolu SNP) olarak tespit edilen SNP'lerin batın boyutu ile anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Ayrıca polimorfizmlerin aynı anda bulunduğu ilk koyun ırkının Bonpala koyunları olduğu bildirilmiştir (Roy vd., 2013).

Norveç Beyaz Koyununda yapılan Genom Boyu İlişkilendirme (GWAS) çalışmasında GDF9 geninin yakınında QTL bölgesi tanımlanmış ve GDF9 kodlama bölgesinde yapılan dizileme çalışması sonucunda tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirlenmiştir. G7 (protein pozisyonu=371) olarak bildirilen G→A mutasyonu sonucu Valin (Val) amino asidi Metiyonin (MET) amino asidine dönüşmüştür. Daha önce Cambridge ve Belclare ırklarında tanımlanan bu SNP'in doğurganlıkla ilişkili olup olmadığı bulunamamıştır. Ancak bu çalışmada tahmini

üreme değerlerine göre homozigot olan koçların dişi kuzuları, mutasyona sahip olmayan koçların dişi kuzularına kıyasla minimum 0,46-0,57 ekstra kuzu verimi sağlamıştır (Vage vd., 2013).

Türkiye’de melez bir ırk olan Pırlak (Dağlıç ve Kıvırcık melezi) koyununda yapılan çalışmada BMP15 ve GDF9 gen bölgeleri çalışılmıştır. Yapılan dizileme çalışması sonucunda her iki gen bölgesinde de herhangi bir polimorfizm saptanamamıştır (Çelikeloğlu vd., 2018).

2020 yılında yöresel tip olarak tescil edilen Of Koyunu, Trabzon ili ve ilçelerinde yetiştirilmekte olup yaklaşık 1800-2000 baş bulunmaktadır. İkiz doğum oranı % 35-40 olan Of Koyununda GDF9 geninde bulunan FecG1 mutasyonu PCR-RFLP tekniği ile çalışılmıştır. 24 baş saf koyunlarda yapılan çalışma sonucunda GA ve GG olmak üzere iki genotip bulunmuş ve genotip frekansları 0,92 ile 0,08’dir. Heterozigot bireylerin fazla olması fekundite ile ilgili çalışmalar için büyük bir önem arz etmektedir (Kırıkçı & Çam, 2020).

Türkiye yerli ırklarından olan Karayaka ırkında yapılan çalışmada GDF9 Ekzon1 bölgesinde G1 (87 nolu SNP) mutasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Kırıkçı vd., 2021). G1 olarak bildirilen G→A mutasyonu sonucunda Arginin amino asidi Histidin aminoasidine dönüşmüştür. Hossain vd. (2020) tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde batın boyutu büyüklüğü ile ilişkilendirilmiştir (Kırıkçı vd., 2021).

Yerli ırklarından olan Ramlıç ve Dağlıç ırklarında yapılan dizileme çalışmasında, GDF9 geni ekzon1 bölgesinde bir (R87H) ekzon2 bölgesinde ise beş (V157V, L159L, K241E, E326E, V332I) adet SNP tespit edilmiş ancak tespit edilen SNP noktaları çoklu doğum ile ilişki bulunamamıştır (Çelikeloğlu vd., 2021).

Hossain vd. (2020), 5 farklı Bangladeş koyun ırkında yaptıkları PCR-RFLP çalışmasında GDF9 geni 87. pozisyonundaki polimorfizmin batın boyutu ile önemli derecede ilişkili bulunmuştur. G→A mutasyonu sonucunda Arginin amino asidi Histidin aminoasidine dönüşmüştür. Söz konusu genotipler GG, AG ve AA olarak tespit edilirken genotip frekansı sırasıyla 51,59, 45,24 ve 3,17 allel frekansı ise G=74,21 ve A=25,79 olarak saptanmıştır. Homozigot GG genotipi, en düşük batın boyutuna sahipken (n=65, 1,59±0,09) homozigot AA genotipinde yüksek batın boyutu tespit edilmiştir (n=4, 2,00±0,09).

Najafabadi vd. (2021) tarafından Yeni Zellanda koyun ırklarında yapılan bir çalışmada GDF9 geni çalışılmıştır. Fin Landrace koyunu (n=104), Fin Landrace x Texel-cross koyunu



(n=61) ve melez koyun (n=76) ırklarında yapılan çalışmada protein kodu 326, 332 ve 371 olan 3 SNP noktası tespit edilmiştir. 326 nolu SNP A→G mutasyonu sonucunda Glutamat aminoasidi Glutamat olarak kalmış değişmemiştir. Ancak 332 nolu SNP G→A mutasyonu sonucu Valin aminoasidini İzolosine ve 371 nolu SNP G→A mutasyonu sonucu Valin aminoasidini Metiyonine dönüştürmüştür. Fin Landrace x Texel ırkında homozigot frekansı düşük tespit edilmiş, heterozigot frekansı ise 0,33 olarak bulunmuştur. Fin Landrace x Texel melezlemede 371 nolu SNP, batın boyutu ile ilişkili bulunmasına rağmen diğer SNP noktaları ile herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

Wang vd. (2021) tarafından yapılan DNA dizileme çalışmasında Luzhong koyunları kullanılmış ve önemli sonuçlar ortaya konulmuştur. GDF9 geninin tüm kodlama bölgesi dizilenmiş, SNP'ler belirlenmiş ve batın boyutu ile alakalı ilişki analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak GDF9 geninde yeni bir mutasyon ile birlikte 8 SNP tespit edilmiştir. Ekzon1'de herhangi bir mutasyon bulunamamıştır. İntron bölgesinde bir tanesi yeni olmak üzere 5 SNP bulunmuştur. Ekzon2'de ensembl veri tabanında bulunan Protein kodu 159, 326 ve 332 olan SNP noktalarında yapılan ilişkilendirme çalışmalarında 326 ve 332 nolu SNP'lerin batın boyutu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. 326 nolu SNP A→G mutasyonu sonucu aminoasit değişimi olmamıştır. 332 nolu SNP G→A mutasyonu sonucu Valin aminoasidini İzolosine dönüştürmüştür. Her iki lokusta da heterozigot koyunlar homozigot koyunlara oranla daha yüksek batın boyutuna sahip oldukları bulunmuştur.

### 3. ÇALIŞMANIN AMACI

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde çoklu doğum büyük bir öneme sahiptir. Çoklu doğumun geliştirilmesi ve düzenlenmesi amacıyla yapılan klasik ıslah çalışmalarıyla birlikte son yıllarda moleküler genetik yöntemler de geliştirilmiştir. Yapılan kapsamlı literatür araştırması sonucunda Kemik Morfogenetik Proteini 15 (Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) ve Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gibi genlerin bazı koyun ırklarında çoklu doğum (fekundite) ile ilişkili oldukları tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında Türkiye yerli koyun ırklarında BMP15 geni (Kıvırcık, Karacabey Merinosu, Sakız, Gökçeada, Çine Çaparı, İvesi ve Karakaçan) ve GDF9 geni (Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız) incelenmiş ve farklı mutasyon noktalarının varlığı, söz konusu gen bölgelerindeki olası polimorfizmlerin ortaya konması ve ırklar arası genetik farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonrasında tespit edilen olası SNP noktalarının çoklu doğum (fekundite) ile ilişkili olup olmadıkları belirlenmeye çalışılacaktır.

## 4. MATERYAL VE METOT

### 4.1 Materyal

Araştırmanın materyalini, Tarım ve Orman Bakanlığı, Koyunculuk Araştırma Enstitüsü bünyesinde yürütülen “Bazı Yerli Koyun Irklarında Gastrointestinal Helminthlere ile Maedi-Visna ve Paratüberküloz’a Karşı Genetik Direncin Araştırılması ve Monogenik Kalıtsal Hastalıklar, Hipotermi ve Fekunditeyle İlgili Genlerin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı TAGEM/HAYSÜD/15/A01/P02/02-02 nolu proje örneklerinden elde edilen genomik DNA’ların bir kısmı oluşturmuştur. Tez çalışması kapsamında çalışılan ırklar ve örnek sayıları Çizelge 4.1’de verilmiştir. BMP15 gen bölgesinde toplam 7 ırktan 311 bireyde, GDF9 gen bölgesinde ise 3 ırktan toplam 260 bireyde çalışılmıştır.

### 4.2 Metot

Hedeflenen gen bölgelerinin çoğaltılmasında her örnekten 2,0-2,5 µl DNA (20-30 ng) kullanılmıştır. Her bir bireye ait DNA örneği alınarak 25 µl hacimde PCR reaksiyonu hazırlanmıştır. Bu amaçla BMP15 gen bölgeleri için, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1 pmol forward ve reverse primer, 0,5 µM dNTP (10 mM), 1,80 mM MgCl<sub>2</sub> ve 0,25 U Taq DNA polimeraz enziminden oluşan PCR karışımı kullanılmıştır. GDF9 gen bölgeleri için ise 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 0,5 pmol her iki primer, 0,5 µM dNTP (10 mM), 1,50 mM MgCl<sub>2</sub> ve 0,5 U Taq DNA polimeraz enziminden oluşan PCR karışımı kullanılmıştır. PCR analizleri, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarı ile Koyunculuk Araştırma Enstitüsü, Biyometri ve Genetik Bölümü Laboratuvarında yürütülmüştür. DNA dizi analizleri, Koyunculuk Araştırma Enstitüsü bünyesindeki Islah ve Genetik Bölümü Laboratuvarında yapılmıştır.

PCR işleminde primerlerin belirlenmesinde ENSEMBL veri tabanındaki (<https://www.ensembl.org/>) GDF9 ve BMP15 gen bölgeleri için Oar\_rambouillet\_v1.0 dizisi, 201 nolu transkriptlerden yararlanılmıştır. Primer tasarlarırken NCBI Online Primer Dizayn aracı kullanılmış olup, primer uzunluğuna, bağlanma sıcaklığına ve primer baz kombinasyonunun % 45-50 oranında GC içerecek şekilde olmasına dikkat edilmiştir. Çalışılan bölgelere ait primer dizileri, çoğaltılan fragment uzunlukları (bp) ve NCBI Genbank veri tabanında kayıtlı olan Genbank Erişim Numaraları ile çoğaltılan bölgelerin pozisyonları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışılan ırklar ve örnek sayıları (n)

<b>İrk</b>	<b>GDF9 (n)</b>	<b>BMP15 (n)</b>
<b>Kıvırcık</b>	48	19
<b>Karacabey Merinosu</b>	128	20
<b>Sakız</b>	135	140
<b>İvesi</b>	-	26
<b>Çine Çaparı</b>	-	19
<b>Gökçeada</b>	-	17
<b>Karakaçan</b>	-	19
<b>Toplam</b>	<b>311</b>	<b>260</b>

Çizelge 4.2. BMP15 ve GDF9 gen bölgelerine ait primer dizileri, fragment uzunlukları ve Genbank erişim numaraları

<b>Çalışılan Gen Bölgeleri</b>	<b>Primer Dizileri</b>	<b>Baz çifti (bç)</b>	<b>Genbank Erişim No/ Başlangıç Pozisyonu</b>
<b>BMP15-EX1Y-F</b>	5'-AAGCGTTATCCTTTGGGCTTTT-3'	565	JN655672 87-652
<b>BMP15-EX1Y-R</b>	5'-GGAGCCCTAAAGGGAAGCAAA-3'		
<b>BMP15_EX2_F</b>	5'-GGTCCAGAAAAGCCCAACCA-3'	744	JN655672 5914-
<b>BMP15_EX2_R</b>	5'-CTGAGCTAGCTGCACCTTTG-3'		
<b>GDF9-EX1-F</b>	5'-TAAGCACCTGGAAGTGGGAG-3'	994	AF078545 1267-2261
<b>GDF9-EX1-R</b>	5'-AGCAGGGCCAACCTCTTTATG-3'		
<b>GDF9-EX2-F</b>	5'-TCAGGAACCTTTCCATCAGTGG-3'	909	HE866499 551-1459
<b>GDF9-EX2-R</b>	5'-ATCAGGCTCGATGGCCAAAA-3'		

Çizelge 4.2 de primerleri verilen dört gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile yükseltgenmiştir. Bu amaçla uygulanan PCR döngüleri Çizelge 4.3 'te verilmiştir. PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. % 2'lik agaroz jel için; 2 g agaroz tartılıp daha sonra 100 mL 1X TBE tampon çözeltisi erlen içerisinde karıştırılmış ve 3-5 dk mikrodalga fırında kaynatılarak çözünmesi sağlanmıştır. Ardından hafifçe çalkalanarak 50-60 °C'ye kadar soğutulan çözelti içerisine 2,5 µL RedSafe

boya çözeltisi (Nucleic Acid Staining Solution (INTRON Biotechnology)) ilave edilmiştir. Bu çözelti, tarak yerleştirilmiş jel tablasına yavaşça dökülmüş, jelin donması beklenmiştir. Tabladan tarak çıkartılarak jel, 1X TBE jel tampon çözeltisi ile bulunan yatay elektroforez ünitesine yerleştirilmiştir. PCR ürünleri yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılmış ve kuyulara yüklenip yaklaşık 100V’ da 1,0-1,5 saatte elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra UV görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat Quantum) örnekler incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 4.3. BMP15 ve GDF9 gen bölgelerine ait PCR döngüleri

PCR programları	BMP15 Geni		GDF9 Geni	
Ön denaturasyon	94 °C → 5 dk		94 °C → 5 dk	
Denaturasyon	94 °C → 1 dk		94 °C → 1 dk	
Bağlanma	56 °C → 1 dk	32 döngü	52-55 °C → 1 dk	35 döngü
Uzama	72 °C → 1 dk		72 °C → 45 sn	
Son uzama	72 °C → 10 dk		72 °C → 10 dk	

DNA dizi analizi öncesi ön saflaştırma amacıyla kontrol edilen PCR ürünleri enzimatik temizlemeye tabi tutularak ortamdaki fazla primer ve nükleotidler inhibe edilmiştir. Böylelikle örnekler, DNA dizi analizi için uygun hale getirilmiştir. Ön saflaştırma aşaması için ExoSAP-IT™ PCR ürün temizleme reaktifi (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır (Korbie vd., 2015). Ardından enzimatik temizleme kullanılarak ön saflaştırmaya tabi tutulan örnekler, BigDye™ Terminator v1.1 Sekans Kiti (Applied Biosystems™) kullanılarak zincir sonlanma reaksiyonuna tabi tutulmuştur (Heiner vd., 2012).

Etanol çöktürme ile son saflaştırma yapılarak ortamdaki fazla primer ve nükleotidler inhibe edilmiş ve ABI 3500 Genetic Analyzer kapiller elektroforezinde DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 4.3 Tanımlayıcı İstatistikler ve Haplotip Tahminleri

DNA dizi analizi sonuçları kromatogram olarak elde edilerek bilgisayara kaydedilmiş, DNA dizileri, FincTV ve MEGA7 programında hizalanmıştır (Kumar vd., 2016). Çalışılan gen

bölgelerinde tespit edilen SNP'lere ait gözlenen heterozigotluk, beklenen heterozigotluk, Hardy-Weinberg (HW) eşitliği  $p$  değerleri ve Minor Allel Frekansları (MAF), Plink 1.07 (Purcell vd., 2007) programında hesaplanmıştır. Haplotip tahminleri ve bağlantı dengesizliği (LD) analizleri Phase v2.1 algoritmasının (Stephens vd., 2001) gömülü olduğu Haploview (<https://www.broadinstitute.org/>) programıyla yapılmış ve aynı programla görselleştirilmiştir.

Haploview programı çok çeşitli veri kümesi boyutları için kapsamlı bir araç paketi sağlamaktadır. LD bilgileri, popülasyon haplotip frekansları, haplotip blokları ve tek işaretleyici ilişkilendirme istatistikleri yapmaktadır (Barret vd., 2005). Korelasyon iki veya daha fazla değişkenler arasında bulunan ilişkiyi göstermekte olup aralarındaki ilişki oranı ise korelasyon katsayısı ile bulunmaktadır (Şentürk & Aşan, 2007). Haploview programında tahmin edilen haplotiplere ait  $r^2$  değeri Pearson korelasyon katsayısını ifade etmekte olup  $r^2$  değeri ne kadar yüksek olursa ele alınan SNP'ler arasındaki tesadüfi olmayan bağlantının o kadar yüksek olduğunu göstermektedir ve  $r^2$  değeri aynı zamanda allel frekanslarına bağlıdır.  $D'$  olarak gösterilen bağlantı dengesizliği katsayısı ise aynı kromozom üzerindeki alleller arasındaki LD değerinin bir başka ölçüsüdür ve allel frekanslarından bağımsızdır (Calabrese, 2019; Perera ve Hernandez, 2022). Haploview programında gösterimler, renk şeması (ekran menüsü) şeklindedir ve bağlantı dengesizliği hakkında bilgi vermektedir (Çizelge 4.4) Bir kaç LD renk şeması arasından seçim yapmamızı sağlamaktadır.

Çizelge 4.4. Haploview programında standart renk şeması gösterimi

	$D' < 1$	$D' = 1$
LOD* < 2	beyaz	Mavi
LOD $\geq$ 2	pembe/kırmızı tonları	parlak kırmızı

\*LOD: İki lokusun belirli bir kromozom üzerinde fiziksel olarak birbirlerine yeterince yakın veya bağlı olup olmadığına ve muhtemelen birlikte kalıtılmalarına ilişkin istatistiksel bir tahmin. 2 veya daha yüksek bir LOD puanı, genellikle iki genin kromozom üzerinde birbirine yakın konumlandığı anlamına gelir (Calabrese, 2019; Perera ve Hernandez, 2022).

Haploview programında pearson korelasyon katsayısının hesaplanmasında aşağıda verilen formül ele alınmıştır.  $r^2 = 1$  ise tam korelasyon siyah ile,  $0 < r^2 < 1$  açık gri ile ve  $r^2 = 0$  ise beyaz ile gösterilmektedir. Yine  $D' = 1$  ise parlak kırmızı ve  $D' < 1$  ise beyaz renk oluşmaktadır.

$$r^2 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Allel frekansı hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır. N toplam çalışılan hayvan sayısı,  $n_{ij}$  allele sahip hayvan sayısıdır (Yaman vd., 2015).

$$f = n_{ij}/N$$

## 5. SONUÇ VE BULGULAR

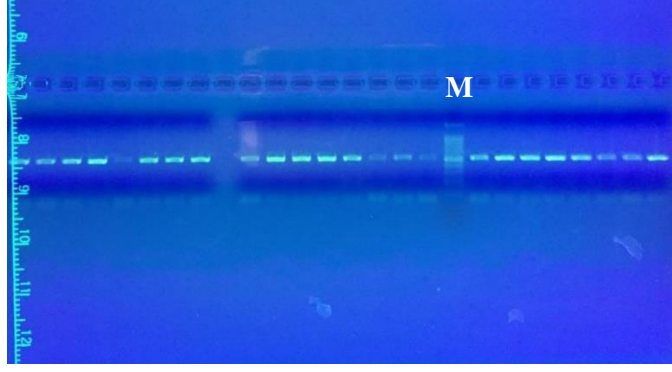
Bu tez çalışmasında Türkiye yerli koyun ırklarında Kemik Morfogenetik Proteini 15 (BMP15) ile Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF9) genleri ile çalışılmış ve çalışılan örneklerde DNA dizi analizi uygulanmıştır.

Tez kapsamında hedeflenen BMP15 ve GDF9 gen bölgelerinin 1. ve 2. ekzonları PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. PCR sonuçları % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek kontrol edilmiştir. Agaroz jelde ilgili gen bölgelerine ilişkin bant uzunlukları tespit edilerek, PCR örnekleri uygun saflaştırma yöntemleri kullanılarak Sanger sekans DNA dizileme yöntemiyle dizilenmiştir.

Dizileme sonucunda FincTv programı kullanılarak kromotogramlar üzerinden SNP'lerin doğrulaması yapılmış olup, MEGA7 programı ile de tüm örneklerin DNA dizileri hizalanmış ve SNP'ler tespit edilmiş ve frekansları bulunmuştur.

### 5.1 Kemik Morfogenetik Proteini 15 (BMP15) Geni

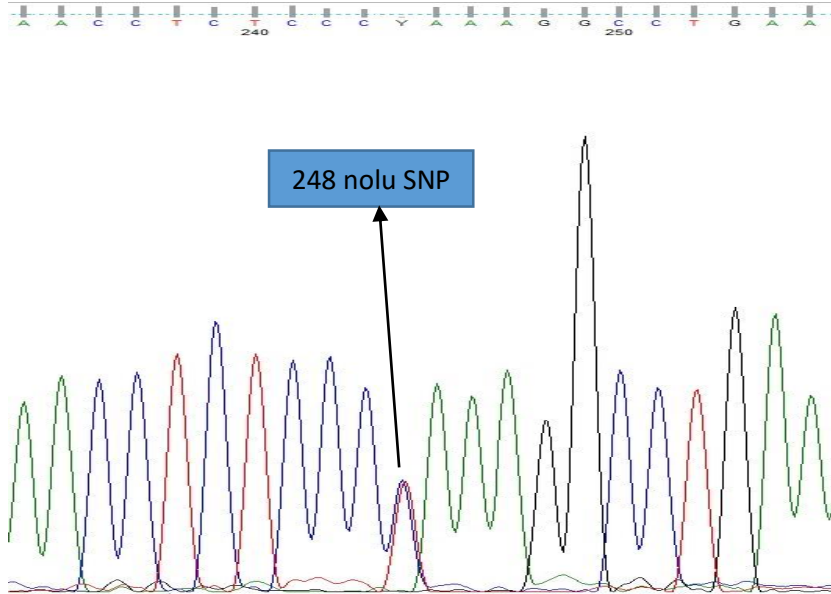
BMP15 gen bölgesi; iki ekzon ve bir intron bölgesinden oluşan, 5,6 kilobaz (kb) büyüklüğünde ve X kromozomu üzerinde bulunan bir gendir. Bu çalışmada BMP15 Ekzon1 gen bölgesini çoğaltmak Çizelge 4.2'de verilen için primerler kullanılarak 565 bç'lik ve Ekzon2 gen bölgesi için ilgili primerler kullanılarak 744 bç'lik PCR ürünleri elde edilmiştir. Tüm PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiş ve bütün örneklerde tek bir PCR bantı görülmüştür. BMP15 Ekzon1 bölgesi için çalışılan bazı örneklere ait agaroz jel görüntüleri şekilde verilmiştir (Şekil 5.1). Daha sonra tüm örneklerin Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemi ile DNA dizi analizleri yapılmıştır. Dizileme sonrasında ilgili bölgelerdeki tek nükleotid farklılıkları (SNP) belirlenmiştir.



Şekil 5.1. BMP15 Ekzon1 Bölgesi 565 bç PCR ürünleri M:Thermo Scientific Gene Ruler 100bp Ladder (SMO321)

Çalışılan tüm örneklerde BMP15 Ekzon1 bölgesinde DNA dizi analizi sonucu mutasyon tespit edilememiştir.

BMP15 Ekzon2 bölgesinde ise iki farklı noktada mutasyon saptanmıştır. Şekil 5.2’de BMP15 geni Ekzon2’de tespit edilen 248 numaralı SNP’nin kromatogram görüntüsü verilmiştir. SNP’lerin yerinin belirlenmesinde, NCBI ve Ensembl veri tabanlarında “Genome assembly: Oar\_rambouillet\_v1.0 (GCA\_002742125.1)” tüm genom shotgun dizilerinden yararlanılmış ve SNP noktaları aminoasit değişimlerinin olduğu noktalar olarak verilmiştir. BMP15 Ekzon2’de 248. pozisyonunda T→ C nükleotid değişimi sonucunda aminoasit değiştirmeyen (sinonim) SNP (P248P) elde edilmiştir. P248P nolu SNP, Merinos ve Kıvrıkcık ırkı koyunlarda tespit edilmiştir. Tespit edilen bu SNP’in ırklara göre dağılımı ve heterozigot hayvan sayıları Çizelge 5.1 ’de verilmiştir.



Şekil 5.2. BMP15 Ekzon2 bölgesi P248P numaralı SNP’nin kromatogram görüntüsü

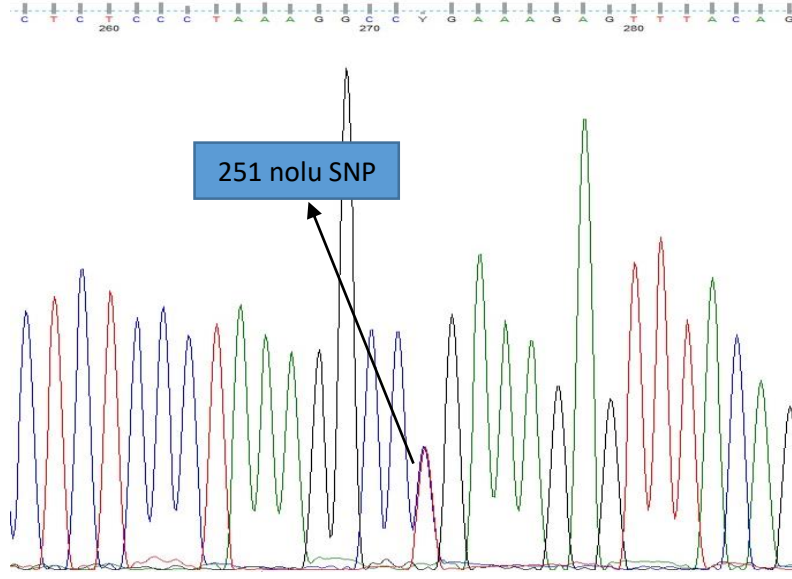


BMP15 geni Ekzon2 bölgesinde P248P nolu SNP'in yanısıra bir de aminoasit değiştiren (L251P) bir SNP daha tespit edilmiştir (şekil 5.3). BMP15 gen bölgesinin Ekzon2'de 251. pozisyonunda T → C nükleotid değişimi sonucunda aminoasit değişimi görülmüştür. 248. pozisyonda Prolin amino asidi Prolin olarak kalırken 251. pozisyonda Lösin amino asidinin Proline dönüştüğü tespit edilmiştir. 251 nolu SNP, Karakaçan, Merinos, ine aparı ve Sakız ırkı koyunlarda tespit edilmiştir. Tespit edilen bu SNP'in ırklara göre dağılımı, heterozigot hayvan sayıları ve oranları izelge 5.1 'de verilmiştir.

Çizelge 5.1 BMP15 Ekzon2 bölgesi P248P ve L251P nolu SNP'lerin görüldüğü heterozigot hayvan sayıları ve frekansları

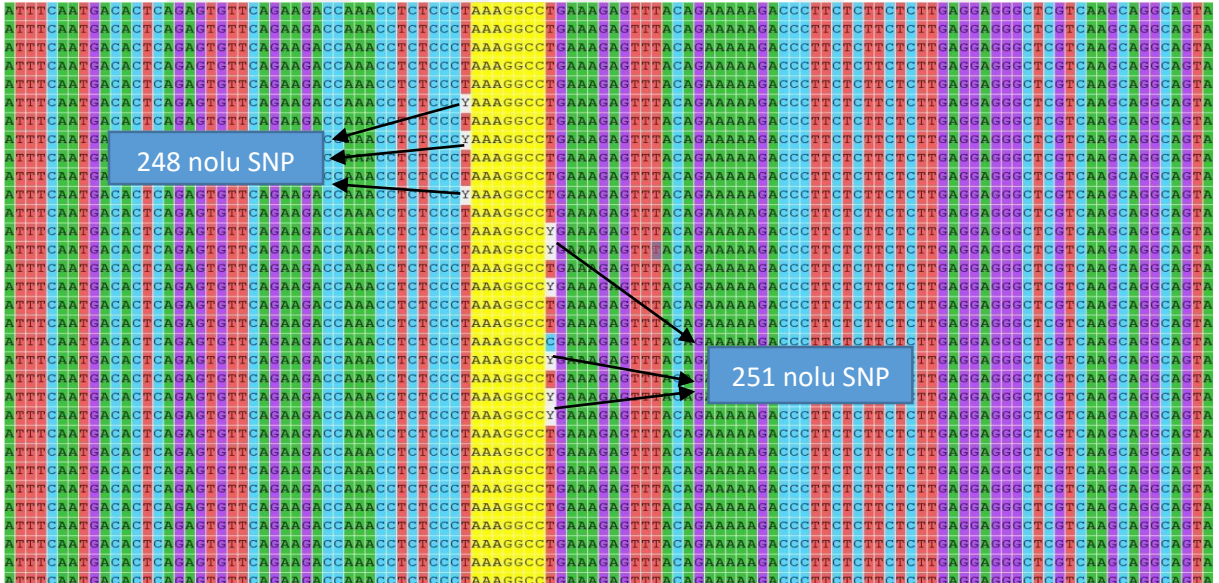
<b>Irklar</b>	<b>n</b>	<b>P248P Nolu SNP</b>	<b>Oranı</b>	<b>L251P Nolu SNP</b>	<b>Oranı</b>
Karakaçan	19	1	0,05	6	0,32
Kıvırcık	19	2	0,11	0	0,00
ine aparı	19	0	0,00	2	0,11
Sakız	140	0	0,00	9	0,06
Karacabey Merinosu	20	2	0,10	1	0,05
Gökçeada	17	0	0,00	0	0,00
İvesi	26	0	0,00	0	0,00

248 nolu SNP'in görüldüğü hayvanlarda heterozigotluk oranları Karakaçan, Kıvırcık ve Karacabey Merinosu ırklarında sırasıyla 0,05, 0,11 ve 0,10 olarak bulunmuştur. 251 nolu SNP'in heterozigotluk oranları Karakaçan, ine aparı, Sakız ve Karacabey Merinosu ırklarındaki sırasıyla 0,32, 0,11, 0,06 ve 0,05 olarak bulunmuştur (izelge 5.1).



Şekil 5.3. BMP15 Ekzon2 bölgesi L251P numaralı SNP'nin kromatogram görüntüsü

Çalışılan örneklerde BMP15 geni, P248P ve L251P numaralı SNP'lerin MEGA7 programında hizalanmış görüntüsü Şekil 5.4'te verilmiştir. İlgili SNP'lere ait gözlenen heterozigotluk, beklenen heterozigotluk, Hardy-Weinberg (HW) eşitliği p değerleri ve Minor Allel Frekansları (MAF) Çizelge 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.4. BMP15 Ekzon2 bölgesi P248P ve L251P numaralı SNP'lerin Mega7 görüntüsü

İrklar içerisinde hesaplanan Hardy-Weinberg değerlerine göre L251P varyantının İvesi ve Sakız ırklarında dengede olmadığı ( $p < 0.05$ ), her iki varyantın diğer ırklarda HW dengesinde olduğu tespit edilmiştir. Phase v2.1 algoritması (Stephens vd., 2001) ile haplotip yapılandırılmasına gidilmiş, BMP15 geninde tespit edilen iki varyantın haplotip oluşturmadığı görülmüştür.

Çizelge 5.2 BMP15 Ekzon2 bölgesi SNP'lerine ait bilgiler, gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ), beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ), Hardy-Weinberg (HW) eşitliği p değerleri ve Minor Allel Frekansları (MAF)

İrk	n	Genomik Pozisyon	Kodon	Amino Asit Değişimi	$H_o$	$H_e$	HW p	MAF	Alleller
Çine çaparı	19	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,00	0,00	1,00	0,00	T:T
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,11	0,10	1,00	0,05	T:C
Gökçeada	17	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,00	0,00	1,00	0,00	T:T
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,00	0,00	1,00	0,00	T:T
İvesi	26	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,00	0,00	1,00	0,00	T:T
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,00	0,07	0,04	0,04	T:C
Karakaçan	19	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,05	0,05	1,00	0,03	T:C
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,32	0,27	1,00	0,16	T:C
Kıvırcık	19	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,11	0,10	1,00	0,05	T:C
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,00	0,00	1,00	0,00	T:T
Karacabey Merinosu	20	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,10	0,10	1,00	0,05	T:C
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,05	0,05	1,00	0,03	T:C
Sakız	140	X:56595196	ccT/ccC	P248P	0,00	0,00	1,00	0,00	T:T
		X:56595188	cTg/cCg	L251P	0,06	0,08	0,37	0,04	T:C

\*SNP'lerin genomik pozisyon bilgileri Sheep\_(Oar\_rambouiller\_v1.0)'e göre verilmiştir ([https://www.ensembl.org/Ovis\\_aries\\_rambouillet/Transcript/Exons?db=core;g=ENSOARG00020012408;r=X:56594565-56601245;t=ENSOART00020018955](https://www.ensembl.org/Ovis_aries_rambouillet/Transcript/Exons?db=core;g=ENSOARG00020012408;r=X:56594565-56601245;t=ENSOART00020018955))

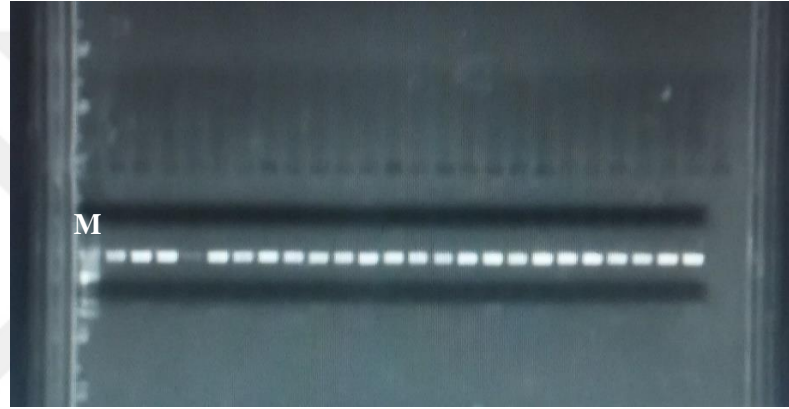
Yapılan çalışmada İvesi ırkında heterozigot birey tespit edilememiştir. Ancak homozigot C(n=1) ve homozigot T(n=25) allellere sahip bireyler gözlenmiştir. Çizelge 5.2'de verilen gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ), beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ) değerlerine bakıldığında İvesi ırkında heterozigot birey olmamasına rağmen beklenen heterozigotluk 0,07 olarak verilmesinin sebebi popülasyonda homozigot C alleleline sahip birey olmasından kaynaklanmaktadır.

## 5.2. Büyüme Farklaşma Faktörü 9 (GDF9)

GDF9 geninin Ekzon1 ve Ekzon2 bölgelerini çoğaltmak için tasarlanan ileri ve geri primer dizileri ve bilgileri, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, Şekil 5.5 ve 5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.5. GDF9 Ekzon1 bölgesi 994 bç PCR ürünleri  
M:Thermo Scientific Gene Ruler 100bp Ladder (SMO321)



Şekil 5.6. GDF9 Ekzon2 bölgesi 909 bç PCR ürünleri  
M:Thermo Scientific Gene Ruler 100bp Ladder (SMO321)

GDF9 Ekzon1 bölgesinde amino asit değişimini sebep olan bir (R87H), GDF9 Ekzon2 bölgesinde amino asit değişimine neden olmayan iki (L159L, E326E) ve amino asit değişimine neden olan iki (E241K ve V332I) tane olmak üzere toplam 5 adet SNP tespit edilmiştir (Çizelge 5.4). R87H varyantının sakız ırkında HW eşitliğinden saptığı ( $p < 0.05$ ), diğer varyantların incelenen ırklarda HW dengesinde olduğu tespit edilmiştir. Ekzon1 ve Ekzon2 bölgelerinde tespit edilen SNP'ler ve bu SNP'lerin görüldüğü heterozigot hayvan sayıları ve oranları Çizelge 5.3'te verilmiştir.

Çizelge 5.3. GDF9 Ekzon1 ve Ekzon2 Bölgesi Heterozigot Hayvan Sayıları ve SNP bölgeleri

Irklar	n	R87H Oranı	L159L Oranı	E241K Oranı	E326E Oranı	V332I Oranı					
Kıvırcık	48	19	0,40	20	0,42	14	0,29	4	0,08	4	0,08
K.Merinosu	128	8*	0,19	58	0,45	19	0,15	16	0,13	16	0,13

Sakız	134	g**	0,11	65	0,49	30	0,22	61	0,46	61	0,46
-------	-----	-----	------	----	------	----	------	----	------	----	------

\*43 genotiplendirme, \*\*72 genotiplendirme

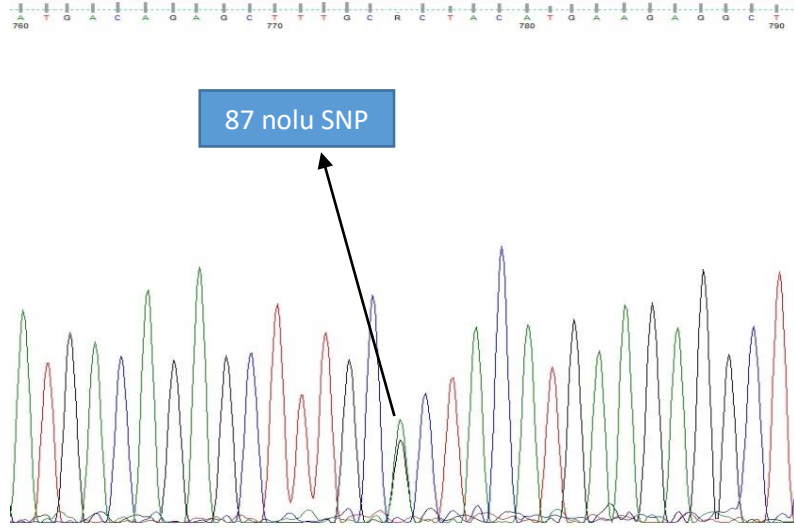
Çizelge 5.4. GDF9 gen bölgesi SNP'lerine ait genomik pozisyon bilgileri, gözlenen heterozigotluk ( $H_o$ ), beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ), Hardy-Weinberg (HW) eşitliği p değerleri ve Minor Allel Frekansları (MAF)

İrk	n	Genomik Pozisyon	Kodon Değişimi	Amino Asit Değişimi	$H_o$	$H_e$	HW p	MAF	Alleller
Kıvırcık	48	5:46547268	cGc/cAc	R87H	0,396	0,405	0,67	0,28	G:A
		5:46545932	ctA/ctG	L159L	0,417	0,497	1,00	0,46	G:A
		5:46545688	Gaa/Aaa	E241K	0,292	0,432	0,53	0,32	G:A
		5:46545431	gaA/gaG	E326E	0,083	0,097	1,00	0,05	A:G
		5:46545414	Gtt/Att	V332I	0,083	0,097	1,00	0,05	G:A
K. Merinosu	128	5:46547268	cGc/cAc	R87H	0,186	0,195	1,00	0,11	G:A
		5:46545932	ctA/ctG	L159L	0,453	0,500	1,00	0,49	A:G
		5:46545688	Gaa/Aaa	E241K	0,148	0,149	0,90	0,08	G:A
		5:46545431	gaA/gaG	E326E	0,125	0,127	1,00	0,07	A:G
		5:46545414	Gtt/Att	V332I	0,125	0,127	1,00	0,07	G:A
Sakız	134	5:46547268	cGc/cAc	R87H	0,111	0,242	0,00	0,14	G:A
		5:46545932	ctA/ctG	L159L	0,485	0,492	0,85	0,47	G:A
		5:46545688	Gaa/Aaa	E241K	0,223	0,264	0,14	0,16	G:A
		5:46545431	gaA/gaG	E326E	0,455	0,422	0,51	0,30	A:G
		5:46545414	Gtt/Att	V332I	0,455	0,422	0,51	0,30	G:A

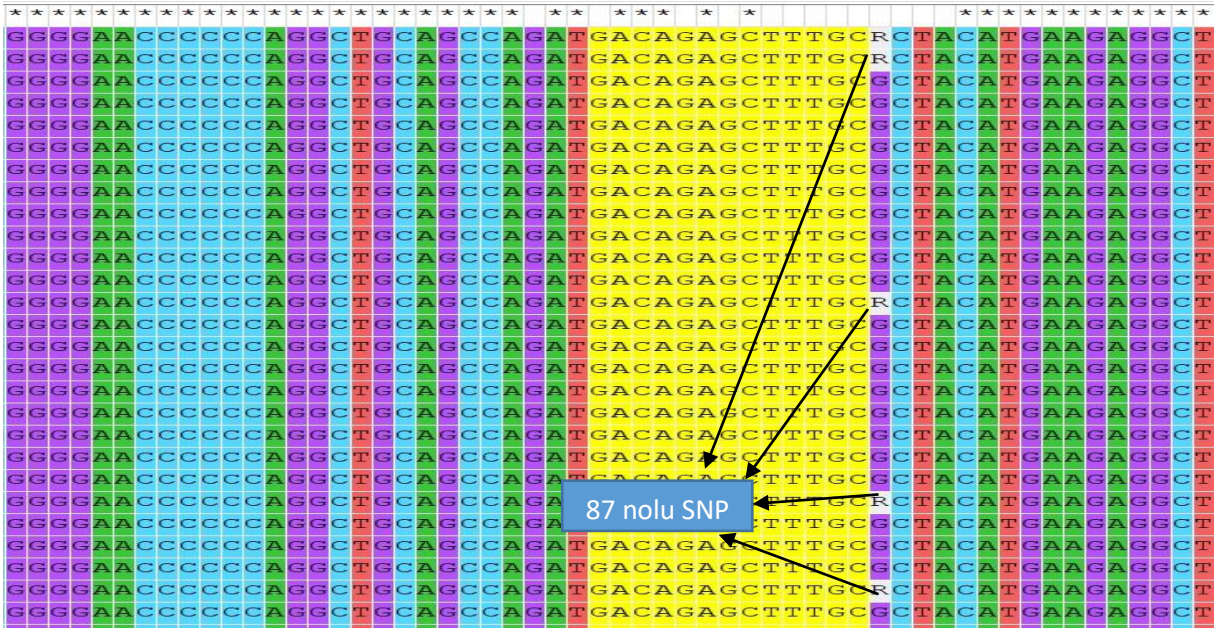
\*SNP'lerin genomik pozisyon bilgileri Sheep\_(Oar\_rambouillet\_v1.0)'e göre verilmiştir ([https://www.ensembl.org/Ovis\\_aries\\_rambouillet/Transcript/Exons?db=core;g=ENSOARG00020021050;r=5:46544645-46547585;t=ENSOART00020032535](https://www.ensembl.org/Ovis_aries_rambouillet/Transcript/Exons?db=core;g=ENSOARG00020021050;r=5:46544645-46547585;t=ENSOART00020032535))

GDF9 Ekzon1 bölgesinde tespit edilen 87. protein pozisyonunda tespit edilen G→A nükleotid değişimi, aminoasit değişimine sebep olmaktadır. Bu değişim Arginin amino asidini Histidine dönüştürmektedir.

Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de GDF9 Ekzon1 bölgesinin 87. protein pozisyonuna ait kromotogram görüntüleri ve dizilerin hizalanma görüntüleri verilmiştir. R87H nolu SNP, G→A nükleotid değişimi Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırkı koyunlarda görülmüştür. Bu SNP'in Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarındaki heterozigotluk frekansları sırasıyla 0,40, 0,19 ve 0,11 olarak bulunmuştur.

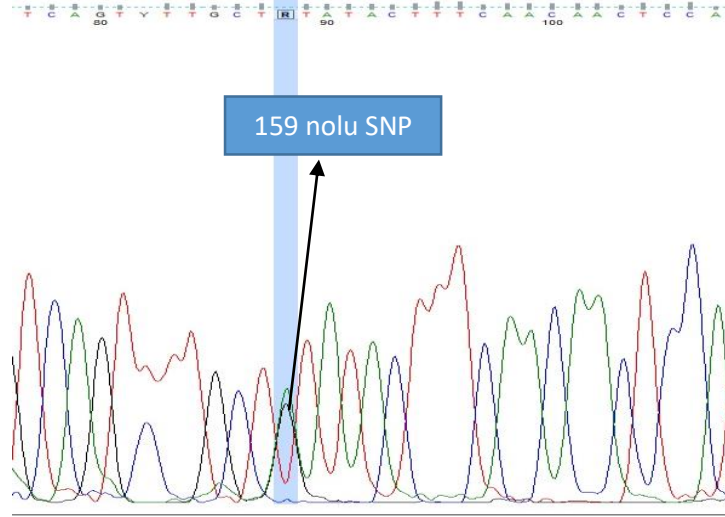


Şekil 5.7. GDF9 Ekzon1 bölgesi R87H Nolu SNP'nin kromatogram görüntüsü

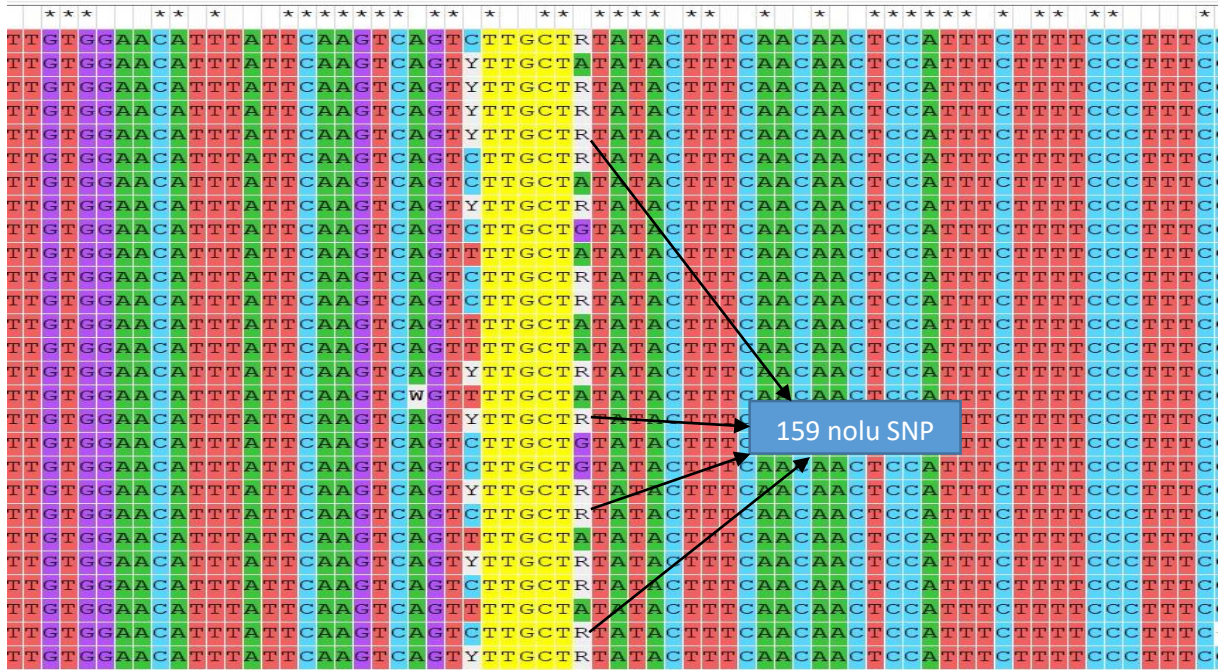


Şekil 5.8. GDF9 Ekzon1 bölgesi R87H numaralı SNP'in Mega7 görüntüsü

Şekil 5.9 ve Şekil 5.10'da GDF9 Ekzon2 bölgesinin 159. protein pozisyonuna ait kromatogram görüntüleri ve dizilerin hizalanma görüntüleri verilmiştir. GDF9 Ekzon2 gen bölgesindeki L159L nolu SNP Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırkı koyunlarda görülmüştür. Amino asit değişimine sebep olmayan 159. protein pozisyonundaki bu SNP, A→G nükleotid değişimi sonucunda ortaya çıkmakta ve Lösin amino asidini kodlamaktadır. L159L nolu SNP'in heterozigotluk frekansları oldukça yüksek tespit edilmiş olup Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarındaki sırasıyla 0,42, 0,45 ve 0,49 olarak bulunmuştur.

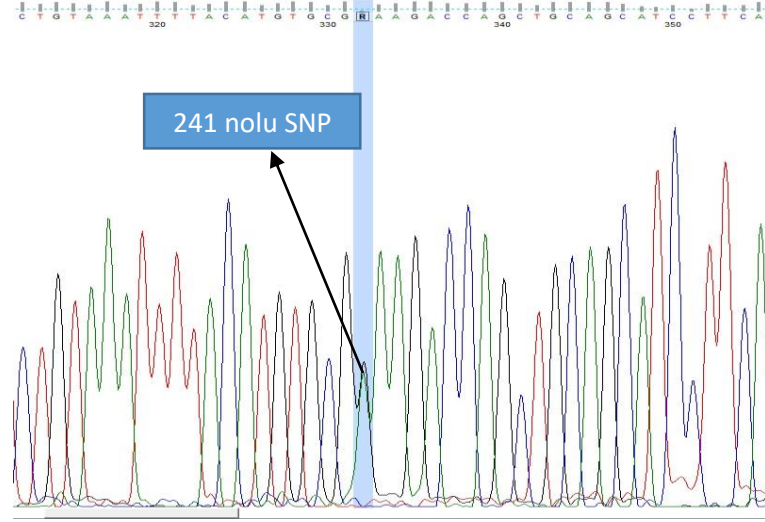


Şekil 5.9. GDF9 Ekzon2 L159L Nolu SNP'nin kromatogram görüntüsü

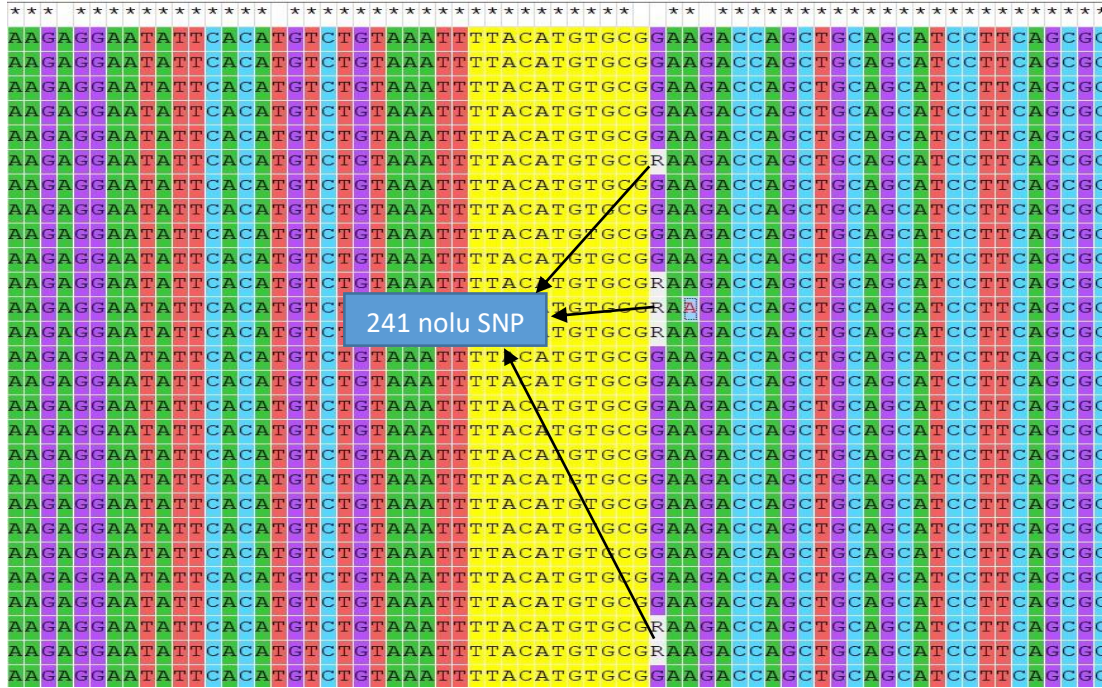


Şekil 5.10. GDF9 Ekzon2 bölgesi L159L numaralı SNP'in Mega7 görüntüsü

Şekil 5.11 ve Şekil 5.12'de GDF9 Ekzon2 bölgesinin 241. protein pozisyonuna ait kromotogram görüntüleri ve dizilerin hizalanma görüntüleri verilmiştir. GDF9 Ekzon2 bölgesinde 241 nolu SNP Kıvrıcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırkı koyunlarda tespit edilmiştir. A→G nükleotid değişimi sonucunda ortaya çıkan bu SNP Glutamat (E) amino asidini Lizin (K) amino asidine dönüştürmektedir. 241 nolu SNP'in heterozigotluk frekansları Kıvrıcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarındaki sırasıyla 0,29, 0,15 ve 0,22 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.11. GDF9 Ekzon2 bölgesi E241K nolu SNP'nin kromatogram görüntüsü

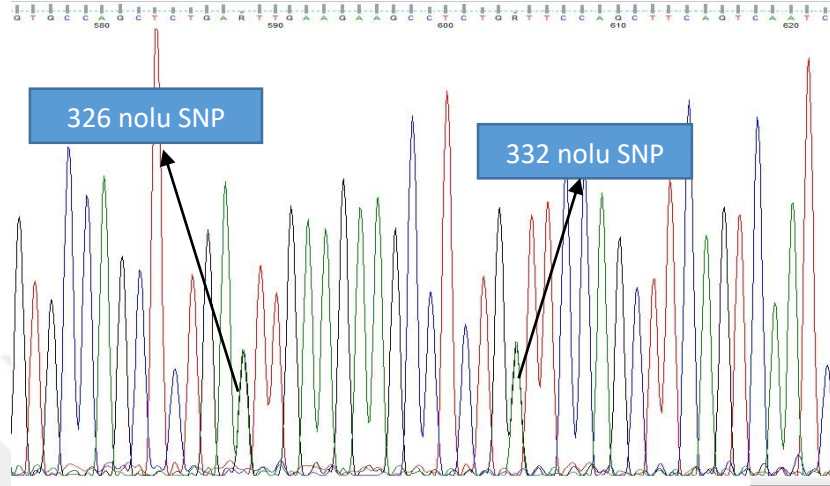


Şekil 5.12 GDF9 Ekzon2 bölgesi E241K numaralı SNP'in Mega7 görüntüsü

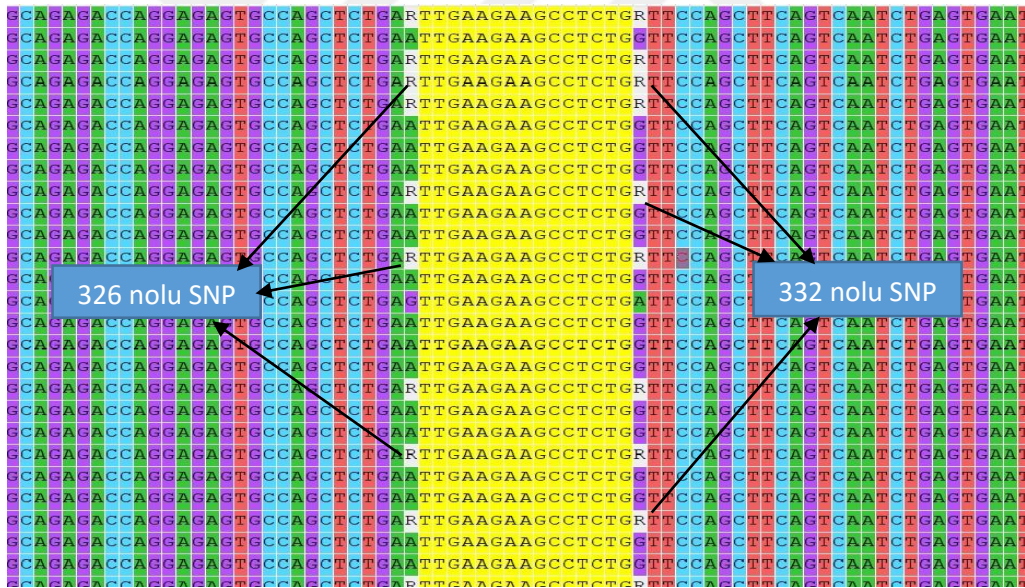
GDF9 Ekzon2 bölgesi E326E ile V332I protein nolu SNP'ler, Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırkı koyunlarda tespit edilmiştir (Şekil 5.13, Şekil 5.14). E326E nolu SNP'in heterozigotluk frekansları Kıvırcık, K. Merinosu ve Sakız ırklarında sırasıyla 0,08, 0,13 ve 0,46 olarak bulunmuştur. V332I nolu SNP'in heterozigotluk frekansları Kıvırcık, K. Merinosu ve Sakız ırklarında sırasıyla 0,08, 0,13 ve 0,46 olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi E326E ile V332I nolu SNP'lerin ırklar bazında görülme frekanslarının aynı olduğu saptanmış ve bu iki SNP'nin birbirleri ile bağlantılı olduğu kanaatine varılmıştır. A→G nükleotid değişimi sonucunda ortaya çıkan 326 nolu SNP'te Glutamat (E) amino asidi değişmeden kalırken, 332



nolu SNP’te G→A nükleotid değişimi sonucunda Valin (V) amino asidi, İzolösin (I) aminoasidine dönüşmektedir. Ayrıca çoklu doğum özelliği diğer ırklara göre yüksek olan Sakız ırkında bu SNP’lerin frekanslarının diğer ırklara göre önemli ölçüde yüksek olduğu da gözlenmiştir.



Şekil 5.13 GDF9 Ekzon2 bölgesi E326E ile V332I nolu SNP’lerin kromotogram görüntüsü



Şekil 5.14. GDF9 Ekzon2 bölgesi E326E ile V332I nolu SNP’lerin MEGA7’deki görüntüsü

GDF9 geni Ekzon2 bölgesinde bulunan E326E ile V332I nolu SNP’lerin Karacabey Merinosu ve Kıvırcık ırkı koyunlarda heterozigotluk frekanslarının birbirine yakın olmaları, Karacabey Merinos ırkının ıslah çalışmaları sırasında Kıvırcık koyunlarının kullanılmasından meydana geldiği düşünülmektedir. Çoklu doğum özelliği ile bilinen Sakız ırkının diğer ırklara oranla yüksek heterozigotluk frekansı gösterdiği de gözlemlenmiştir.

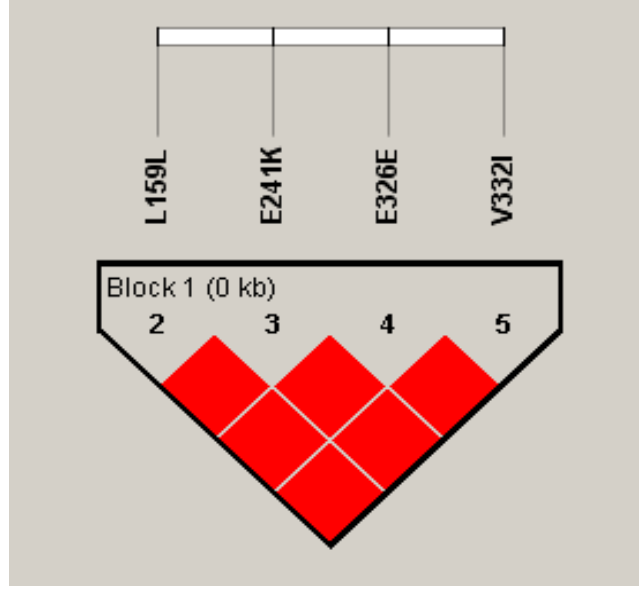
Ayrıca GDF9 gen bölgesinde tespit edilen SNP'ler ile yapılan haplotip yapılandırılması sonucunda altı farklı haplotip tespit edilmiştir (Çizelge 5.5). G/A/G/G/A, A/A/A/A/G, G/A/G/A/G, G/G/G/A/G haplotipleri Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarında görülürken, G/A/A/A/G haplotipi Kıvırcık ve Sakız ırklarında tespit edilmiş, A/A/G/A/G sadece Karacabey Merinosunda, A/G/G/A/G ise sadece Sakız ırkında belirlenmiştir. Kıvırcık ve Karacabey Merinos ırklarında 5 farklı haplotip tespit edilirken, Sakız ırkında 6 farklı haplotip belirlenmiştir.

Haploview programında tahmin edilen haplotiplere ait  $r^2$  değeri E326E ve V332I varyantlarında yüksek bulunmuş ve E326E ile V332I varyantlarının birbirleriyle bağlantılı oldukları tespit edilmiştir (Şekil 5.16).

Çizelge 5.5. Türkiye yerli koyun ırklarında tespit edilen haplotipler

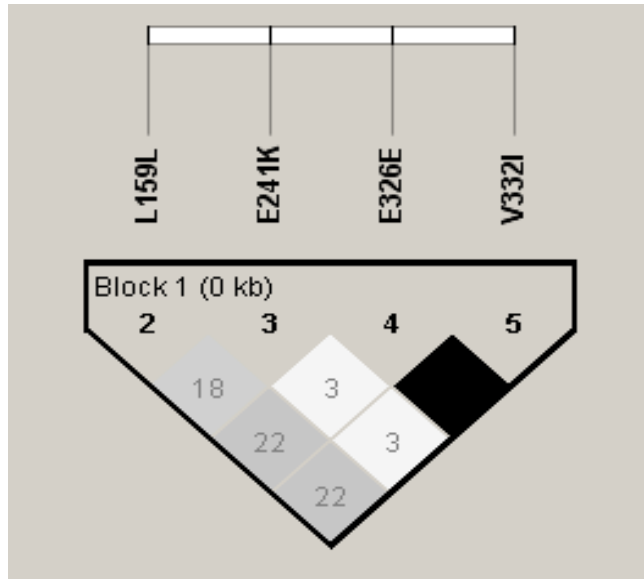
İrk	GDF9 Haplotipler	
	R87H / L159L / E241K / E326E / V332I	Frekans
Kıvırcık	G/A/G/G/A	0,05
	A/A/A/A/G	0,28
	G/A/A/A/G	0,04
	G/A/G/A/G	0,09
	G/G/G/A/G	0,54
K. Merinos	G/A/G/G/A	0,07
	A/A/A/A/G	0,08
	G/G/G/A/G	0,49
	A/A/G/A/G	0,02
	G/A/G/A/G	0,35
Sakız	G/A/G/G/A	0,29
	A/A/A/A/G	0,13
	G/A/A/A/G	0,03
	G/A/G/A/G	0,01
	A/G/G/A/G	0,01
	G/G/G/A/G	0,51

Yapılandırılan haplotiplerin  $D'$  ve  $r^2$  değerlerine ilişkin Haploview programında elde edilen gösterimleri Şekil 5.15 ve 5.16'de verilmiştir.  $D'$  olarak gösterilen bağlantı dengesizliği katsayısı, aynı kromozom üzerindeki alleller arasındaki LD değerinin bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. L159L, E241K, E326E, V332I SNP noktaları ile yapılandırılan haplotiplerin yüksek  $D'$  değeri (kırmızı renk) vermesi bu haplotiplerin birbirleri ile bağlantılı olduğu sonucunu ortaya koymaktadır (Şekil 5.15).



Şekil 5.15. Kırmızı renk yüksek  $D'$  değerini ifade etmektedir.

Haploview programında haplotipler yapılandırılırken elde edilen SNP noktalarının birbirleri ile olan ilişkilerinin durumunu gösteren korelasyon katsayısı da hesaplanmaktadır. Tam korelasyon durumunda  $r^2 = 1$  ise tam korelasyon siyah ile,  $0 < r^2 < 1$  açık gri ile ve  $r^2 = 0$  ise beyaz ile gösterilmektedir. Bu çalışmada elde edilen E326E ve V332I SNP'lerinin birbirleri ile tam korelasyon içinde olduğu E241K SNP'inin ise diğer SNP'ler ile korelasyonunun olmadığı görülmektedir (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. Siyah renk yüksek  $r^2$  değerini ifade etmektedir.

Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırklarında tespit edilen E326E ve V332I nolu SNP'ler bütün örneklerde aynı anda tespit edilmiştir. E326E nolu SNP noktasında heterozigot olduğu tespit edilen örneklerde V332I nolu SNP bölgesinin de heterozigot olduğu görülmüştür. Bu sonuç ile E326E ve V332I nolu SNP'lerin birbiriyle ilişkili olduğunu, çalışılan ırklarda E326E ve V332I varyantların birlikte görülmelerinden dolayı aralarında tam korelasyon olduğu belirlenmiştir.



## 6. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Türkiye’de yetiştirilen bazı yerli koyun ırklarında Kemik Morfogenetik Protein Geni 15 (BMP15) ve Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF9) genleri incelenmiş ve farklı ırklara ait varyasyon noktaları araştırılmıştır. Kıvırcık, Karacabey Merinosu, Sakız, Gökçeada, Çine Çaparı, İvesi ve Karakaçan ırklarında BMP15 ve GDF9 genleri, 1. ve 2. ekzon bölgeleri DNA dizi analizi ile incelenmiştir.

Yapılan çalışmalarda BMP15 ve GDF9 vb genlerin bazı koyun ırklarında çoklu doğum (fekundite) ile ilişkili oldukları bildirilmiştir. Doğurganlık bir yılda üretilen kuzu sayısı, yıllık kuzulama sayısı ve bir batındaki yavru sayısı olarak ifade edilmektedir. Üreme özellikleri tipik olarak düşük ile orta kalıtıma sahiptir; bu nedenle fenotipik verilere dayalı geleneksel yetiştirme yöntemleri, yalnızca zaman alıcı bir süreç olmaktadır. Bu nedenle klasik ıslah çalışmaları ile birlikte moleküler yöntemlere dayanan seleksiyon ve ıslah çalışmaları üreme verimliliğinin genetik olarak iyileştirilmesi için yüksek bir öneme sahiptir (Abdoli vd., 2016). Yılda birden fazla kuzulamanın, Fin, Romanov ve Dorset Horn gibi koyun ırklarında görüldüğü bildirilmiş, yerli koyun ırklarımızda ise Sakız ırkı, yüksek ikizlik görülmesi sebebiyle döl verimi yüksek olan ırkımız olarak literatüre geçmiştir (Kaymakçı, 2013). Ancak yerli koyun ırkımız olan Sakız ırkında, her ne kadar çoklu doğum özelliğine sahip olsa da, BMP15 ve GDF9 genleri düzeyinde yapılmış olan herhangi bir ilişkilendirme çalışmasına rastlanılamamıştır.

Kemik morfogenetik proteini 15 (BMP15) veya FecX geni, X kromozomu üzerinde 5,6 kb büyüklüğünde, iki ekzon ve bir intron bölgesinden oluşan, 393 aminoasit kodlayan ve doğurganlığı etkileyen majör genlerden biri olarak kabul edilmekte ve oositlerde eksprese edilmektedir. Bu gen bölgesi, koyunlarda doğurganlığı etkileyen genler arasında en polimorfik lokus olarak da bilinmektedir (Abdoli vd., 2016, Çelikeloğlu vd., 2018).

Koyunlarda doğurganlığı etkileyen BMP15 gen bölgesinde çok sayıda mutasyon tespit edilmiştir. Başlangıçta buldukları koyun ırkına göre isimlendirilen bu mutasyonlar, Inverdale koyunlarında FecXI, Cambridge koyunlarında FecXG (Galway mutasyonu), Hanna koyunlarında FecXH, Belclare koyunlarında FecXB, Lacaune koyunlarında FecXL, Rasa Aragonesa’da FecXR, Grivette koyunlarında FecXGr, Olkaska koyunlarında FecXO vb. daha sonraları mutasyon şekli (delesyon vb) ve tespit edilen SNP noktaları ile isimlendirilmiştir (Abdelgader vd., 2020).

Niu vd. (2021) tarafından Cele Black ırkı koyunlarda yapılan çalışmada BMP15 geni Ekzon1'de 3 bç'lik (CTT) bir delesyon tespit edilmiştir. BMP15 geni Ekzon1 bölgesinde bildirilen bu üç bazlık delesyon, Türkiye ırklarından olan Ramlıç ve Dağlıç koyunlarında da tespit edilmiş ve bu mutasyonun çoklu doğumla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Çelikeloğlu vd., 2021). Ancak bu tez çalışmasında çalışılan tüm ırklarda söz konusu üç bazlık delesyon görülmemiştir.

Bu çalışma kapsamında BMP15 geni Ekzon2'de tespit edilen L251P SNP noktası, daha önce Di vd. (2021) ile Niu vd. (2021)'de tespit edilmiş olup, bu çalışmalarda bu SNP'e sahip heterozigot koyunların homozigot koyunlara göre daha büyük batın boyutuna sahip oldukları (Di vd., 2021) ve bu SNP'in, Cele Black ırkı koyunlarda doğurganlığı etkileyen önemli bir mutasyon noktası olabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında L251P SNP'in heterozigotluk oranları Karakaçan, Çine Çaparı, Sakız ve Karacabey Merinosu ırklarında sırasıyla 0,32, 0,11, 0,06 ve 0,05 olarak bulunmuştur. Bu SNP'in en çok görüldüğü ırk Karakaçan olarak bulunmuş, Sakız ırkında ise nispeten düşük frekansta tespit edilmiştir, bu nedenle bu SNP bölgesinin koyunlarda doğurganlığı etkileyen bir bölge olduğunu söylemek bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda pek mümkün görülmemektedir.

Esen Gürsel vd. (2011) tarafından Sakız, Gökçeada, Kıvırcık ve İvesi ırklarında BMP15 gen bölgesinde FecXG olarak bilinen mutasyon bildirilmiş olmasına rağmen yapılan bu tez çalışmasında söz konusu mutasyonlar tespit edilememiştir. BMP15 gen bölgesinde Türkiye yerli koyun ırklarında yapılan diğer çalışmalarda FecXI (Inverdale) mutasyonunu İvesi ırkında tespit edilemediği (Gedik, 2021), Pırlak koyunlarının BMP15 gen bölgesinde monomorf bulunduğu (Çelikeloğlu vd., 2021). Sakız ırkında ise FecB (Booroola), BMP15 (FecXI ve FecXG) ile FecXB polimorfizmlerinin araştırılması sonucu yine mutasyon tespit edilemediği bildirilmiştir (Dinçel vd. 2015, 2018).

Büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9) geni, bir adet intron ve iki adet ekzon bölgesinden oluşan, 2,5 kb büyüklüğünde ve 453 amino asit kodlayan bir gen bölgesidir. Koyunlarda ovulasyon ve doğum oranlarına etkisi olduğu bildirilen GDF9, 5. kromozom üzerinde bulunmaktadır (Çelikeloğlu vd., 2018). BMP15 gibi, otozomal GDF9 geninin de granüloza hücre fonksiyonu üzerindeki etkisiyle foliküler büyümeyi kontrol etmede önemli etkisi olduğu bildirilmektedir (Galloway vd., 2000; Hanrahan vd., 2004).

GDF9 geninde bildirilen 29 varyasyon noktası bulunmaktadır ve SNP'lerin bazılarının koyunlarda yumurtlama oranında artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hanrahan vd., 2004). Örneğin Mısır koyun ırklarında tespit edilen G1(87), G4(241), G5(332), G7(371) ve G8(395) nolu SNP'lerden E241K'nın tespit edildiği heterozigot koyunlarda kuzulama ve ikiz kuzu sayısında artış görüldüğü bildirilmiştir (Aboelhassan vd., 2021). Ancak Roy vd., (2013) tarafından bildirilen R87H, E241K ve V332I nolu SNP'lerde ise herhangi bir ilişki bulunamamıştır. R87H nolu SNP, Hossain vd. (2020) yaptıkları çalışmada batın boyutu ile, Kırıkçı & Çam (2020) tarafından yapılan çalışmada ise çoklu doğum ile ilişkili bulunmuştur.

Dağlıç ve Kıvırcık melezi olan Pırlak ırkı koyunlarda Çelikeloğlu vd. (2018), GDF9 gen bölgesinde çalışmışlar ancak bu ırkta herhangi bir varyasyon tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Çelikeloğlu vd., (2021) tarafından Türkiye'de yataştırılan Dağlıç ve Ramlıç (Dağlıç x Rambouillet melezi) ırkı koyunlarda BMPR1B, BMP15 ve GDF9 gen bölgeleri DNA dizi analizi yöntemiyle çalışılmıştır. GDF9 gen bölgesinde yapılan dizileme sonucunda Dağlıç ve Ramlıç ırklarında tespit edilen c.260G>A, c.477G>A, c.721G>A ve c.994G>A SNP noktalarının sırasıyla R87H, L159L, E241K ve V332I SNP'leri olduğu ve yapılan tez çalışmasında da bu SNP noktaların tespit edildiği görülmektedir. Ancak Dağlıç ve Ramlıç ırklarında diğer tespit edilen SNP'ler (c.471C>T (157 nolu SNP) ve c.978A>G) bu çalışmada çalışılan ırklarda tespit edilememiştir. Çelikeloğlu vd., (2021) bildirdikleri bu SNP noktalarında çoklu doğum yada başka bir özellik ile ilgili herhangi bir ilişki bildirmemişlerdir. Ancak Di vd., (2021) tarafından batın boyutu ile önemli ölçüde ilişkili bulunan E326E ve V332I nolu SNP noktalarının her iki lokusta da heterozigot koyunlarda homozigot koyunlara oranla daha yüksek batın boyutuna sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Sakız ırkında koç altı koyun başına göre kuzu verimi ve çoklu doğum oranının diğer yerli ırklardan (Kıvırcık ve Gökçeada) daha yüksek değerlere sahip olduğu pek çok çalışmada bildirilmektedir (Ceyhan vd., 2007). Yürütülen bu tez çalışmasında Di vd., (2021)'e benzer olarak çoklu doğum özelliği ile bilinen Sakız ırkı koyunlarda heterozigotluk frekansı, diğer ırklara göre yüksek oranda bulunmuştur. E326E ve V332I nolu SNP bölgelerindeki heterozigotluk frekansları, Kıvırcık, Karacabey Merinosu ve Sakız ırkında sırasıyla 0,08, 0,13 ve 0,46 olarak tespit edilmiştir. E326E ve V332I protein nolu SNP'lerin ırklar bazında görülme frekanslarının aynı olduğu saptanmış Haploview programında  $r^2=1$  olarak bulunmuştur buradan yola çıkarak bu iki SNP'nin birbirleri ile bağlantılı olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca çoklu doğum özelliği diğer ırklara göre yüksek olan Sakız ırkında bu SNP'lerin frekanslarının diğer ırklara göre önemli ölçüde yüksek olduğu

da bu çalışma ile ilk kez tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda çoklu doğum özelliğine sahip olan Sakız ırkı ile ilişkili olarak bildirilmiş bağlantılı olan bir gen bölgesi bulunmamaktadır. Bu açıdan bakıldığında Sakız ırkının çoklu doğum özelliğinin GDF9 Ekzon2 bölgesindeki E326E ve V332I nolu SNP noktalarındaki heterozigotluktan kaynaklanabileceği, ancak gerek koç altı koyun gerekse doğan kuzu sayılarının da dahil olduğu daha fazla araştırma yapılmasının gerektiği düşünülmekte ve bu konuda daha fazla sayıda hayvanda SNP'ler belirlenerek döl verimi, doğan kuzu sayısı, ikizlik oranı vb. verilerin elde olacağı ilişkilendirme çalışmalarının yapılması önerilmektedir.





## KAYNAKLAR

- Abdelgader, A.Z.; Musa, L.M.A.; Tsubo, M.; El-Hag, F.M.; Saleem, A.O.; Kurosaki, Y.; Jawasreh, K.I.; Ahmed, M.A. (2020) Galway Point Mutation (FecXG) in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene (BMP15) Is Associated With Prolificacy in the Sudanese Desert Sheep Ecotypes. Preprints 2020, 2020110246.
- Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S., Hossein-Zadeh, G. N., & Nadri, S. (2016). A review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 1-7.
- Abecia, J. A., Macías, Á., Casao, A., Burillo, C., Martin, E., Pérez-Pé, R., & Laviña, A. (2020). Semen Quality of Rasa Aragonesa Rams Carrying the FecXR Allele of The BMP15 Gene. *Animals*, 10(9), 1-9.
- Aboelhassan, D. M., Darwish, A. M., Ali, N. I., Ghaly, I. S., & Farag, I. M. (2021). A study on mutation points of GDF9 gene and their association with prolificacy in Egyptian small ruminants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1).
- Anonim (2016). *Koyun Yetiştiriciliği El Kitabı*. Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Bandırma/Balıkesir.
- Anonim (2017). *Damızlık Koç Katoloğu*. Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Bandırma/Balıkesir.
- Anonim (2020a) Yabani Muflon Koyunu. 16 Ocak 2020. Erişim Adresi: Mediastorehouse: <https://www.mediastorehouse.com/ardea-wildlife-pets-environment/dec2014/7/europe-an-mouflon-ram-germany-ovis-musimon-10523909.html>.
- Anonim (2020b). Argali Koyunu. 16 Ocak 2020. Erişim adresi: wikipedia: [https://tr.wikipedia.org/wiki/Argali\\_a](https://tr.wikipedia.org/wiki/Argali_a)
- Anonim (2022a). Türkiye İstatistik Kurumu Veri Portalı. 13 Ağustos 2022, Erişim Adresi: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Kirmizi-Et-Uretim-Istatistikleri-2020-2021-45671#:~:text=2021%20y%C4%B1n%C4%B1%20i%C3%A7in%201%20milyon,6's%C4%B1n%C4%B1%20manda%20eti%20olu%C5%9Fturdu>
- Anonim (2022b). Türkiye İstatistik Kurumu Veri Portalı. 09 Haziran 2022, Erişim Adresi: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Haziran-2022-45594>
- Atmacaoğlu, M., Uzakgider, M. A., Aksoy Dengiz, B., Şermet, D., Düzalan, M., Gökçe, M., . . . Kaşıkçı, D. (2016). *Denizli İli Koyunculuk Haritasının Oluşturulması Projesi*. Denizli.
- Barret, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), 263-265.
- 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(4), 666-669.
- Bayram, D., & Odabaşı, F. (2011). Farklı Besi Program ve Sürelerindeki Saf Morkaraman ve Kıvırcık X Morkaraman F1 Kuzuların Besi Performansı, Kesim ve Karkas Özellikleri: I- Vücut Ölçüleri\*. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(1), 41-47.

- Bodin, L., Pasquale, E. D., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., & Mulsant, P. (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), 393-400.
- Calabrese, B. (2019). *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Academic Press. Elsevier. ISBN 978-0-12-811432-2
- Ceyhan, A., Erdoğan, İ., Sezenler, T. (2007). Gen Kaynağı Olarak Korunan Kıvrıkcık, Gökçeada ve Sakız Koyun Irklarının Bazı Verim Özellikleri. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, *4*(2), 211-218.
- Çelikeloğlu, K., Erdoğan, M., Hacan, Ö., Koçak, S., Bozkurt, Z., & Tekerli, M. (2018). Pırlak Koyunlarında BMPR1B, BMP15 ve GDF9 Genlerinde Olası Polimorfizmlerin Araştırılması. *Kocatepe Veterinary Journal*, *11*, 1-7.
- Çelikeloğlu, K., Tekerli, M., Erdoğan, M., Koçak, S., Hacan, Ö., & Bozkurt, Z. (2021). An investigation of the effects of BMPR1B, BMP15, and GDF9 genes on litter size in Ramlıç and Dağlıç sheep. *Archives Animal Breeding*, *64*(1), 223-230.
- Davis, G. H. (2004). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, *37*, 11-24.
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., Tosser-Klopp, G., Mulsant, P., Nowak, Z., Drobik, W., Martyniuk, E., Bodin, L. (2013). Genome-Wide Association Studies Identify Two Novel BMP15 Mutations Responsible for an Atypical Hyperprolificacy Phenotype in Sheep. *Plos Genetics*, *9*(4), e1003482
- Di, R., Wang, F., Yu, P., Wang, X., He, X., Mwacharo, J. M., . . . Chu, M. (2021). Detection of Novel Variations Related to Litter Size in BMP15 Gene of Luzhong Mutton Sheep (*Ovis aries*). *Animals*, *11*(12), 1-12.
- Dinçel, D., Ardıçlı, S., Soyudal, B., Er, M., Alpay, F., Şamlı, H., & Balcı, F. (2015). Analysis of FecB, BMP15 and CAST Gene Mutations in Sakız Sheep. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *21*(4), 483-488.
- Dinçel, D., Ardıçlı, S., Şamlı, H., & Balcı, F. (2018). Genotype frequency of FecXB (Belclare) mutation of BMP15 gene in Chios (Sakız) sheep. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *37*(2), 1-5.
- Ertuğrul, M., Dellal, G., Soysal, İ., Elmacı, C., Akın, O., Arat, S., . . . Yılmaz, O. (2009). Türkiye Yerli Koyun Irklarının Korunması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *23*(2), 97-119.
- Esen Gürsel, F., Akış, I., Durak, H., Mengi, A., & Öztapak, K. (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), 725-729.
- Galloway, S. M., MacNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., . . . Ritvos, O. (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), 279-283.
- Gedik, Y. (2021). Screening for Inverdale (FecXI) Mutation in BMP15 Gene in Prolific Turkish Awassi Sheep. *Black Sea Journal of Agriculture*, 130-132.

- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., & Galloway, S. M. (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 Balclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900-909.
- Heiner, C. R., Hunkapiller, K. L., Chen, S.-M., Glass, J. I., & Chen, E. Y. (2012). Sequencing Multimegababase-Template DNA with BigDye Terminator Chemistry. *Genome Research*, 8(5), 557-561.
- Hossain, F., Suma, S. A., & Bhuiyan, M. S. (2020). Association Of GDF9 Gene Polymorphisms With Litter Size In Indigenous Sheep Of Bangladesh. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*, 7(2), 283-292.
- Karslı, T., Şahin, E., Argun Karslı, B., Alkan, S., & Balcıoğlu, M. S. (2012). An investigation of mutations (FecXG, FecXI, FecXH, FecXB) on BMP-15 gene in some local sheep breeds raised in Turkey. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1), 29-33.
- Kaymakçı, M. (2013). *İleri Koyun Yetiştiriciliği*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık.
- Kırıkçı, K., & Çam, M. A. (2020). Türkiye Yöresel Yeni Koyun Tipi Of Koyunlarında GDF9 (FecG1) Gen Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Araştırılması. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 10(2), 98-102.
- Kırıkçı, K., Çam, M. A., & Mercan, L. (2021). Investigation of G1 (c.260G>A) polymorphism in Exon 1 of GDF9 gene in Turkish sheep breed Karayaka. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 45(1), 191-197.
- Korbie, D., Lin, E., Wall, D., Nair, S. S., Stirzaker, C., Clark, S. J., & Trau, M. (2015). Multiplex bisulfite PCR resequencing of clinical FFPE DNA. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1-11.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Liu, Q., Pan, Z., Wang, X., Hu, W., Di, R., Yao, Y., & Chu, M. (2014). Progress on major genes for high fecundity in ewes. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 1(4), 282-290.
- Martinez-Royo, A., Dervishi, E., Alabart, J., Jurado, J., Folch, J., & Calvo, J. (2009). Freemartinism and FecXR allele determination in replacement ewes of the Rasa Aragonesa sheep breed by duplex PCR. *Theriogenology*, 72(8), 1148-1152.
- Monteagudo, L. V., Ponz, R., Tejedor, M. T., Lavina, 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(1-2), 139-146.
- Najafabadi, H. A., Khansefid, M., Mahmoud, G. G., Zhou, H., & Hickford, J. G. (2021). Identification of Polymorphisms In The Oocyte-Derived Growth Differentiation Growth Factor 9 (GDF9) Gene Associated With Litter Size In New Zealand Sheep (*Ovis aries*) Breeds. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(9), 6335-6342.
- Nicol, L., Bishop, S. C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, S. M., & McNeilly, A. S. (2009). Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Research Reproduction*, 138(6), 921-933.

- Niu, Z.-g., Qin, J., Jiang, Y., Ding, X.-D., Ding, Y.-g., Tang, S., & Shi, H.-c. (2021). The Identification of Mutation in BMP15 Gene Associated with Litter Size in Xinjiang Cele Black Sheep. *Animals*, 11(3), 1-10.
- Perera, M. A., & Hernandez, W. (2021). *GPCR Patient Drug Interaction Pharmacogenetics: Genome-Wide Association Studies (GWAS)*. Elsevier.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., . . . Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-575.
- Roy, J., Polley, S., De, S., Mukherjee, A., Batabyal, S., Pan, S., . . . Goswami, L. S. (2013). Polymorphism of Fecundity Genes (FecB, FecX, and FecG) in the Indian Bonpala Sheep. *Animal Biotechnology*, 22(3), 151-162.
- Silva, B., Castro, E. A., Souza, C. J., Paiva, S. R., Sartori, R., Franco, M. M., . . . Melo, E. O. (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), 89-92.
- Smolucha, G., Piórkowska, K., Ropka-Molik, K., & Sikora, J. (2020). Use of the HRM Method in Quick Identification of FecXO Mutation in Highly Prolific Olkuska Sheep. *Animals*, 10(5), 1-8.
- Soysal, M. İ. (2004). *Türkiye Yerli Hayvan Genetik Kaynaklarımız*. Tekirdağ.
- Stephens, J. C., Schneider, J. A., Tanguay, D. A., Choi, J., Acharya, T., Stanley, S. E., . . . Vovis, G. F. (2001). Haplotype Variation and Linkage Disequilibrium in 313 Human Genes. *Science*, 293(5529), 489-493.
- Vage, D. I., Husdal, M., Kent, M. P., Klemetsdal, G., & Boman, I. A. (2013). A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genetics*, 14, 1-8.
- Yaman, Y., Soysal, M. İ., & Ün, C. (2015). Evaluation of the genetic resistance status to classical and atypical scrapie in Karacabey merino rams. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(6), 736-740.
- Wang, F., Chu, M., Pan, L., Wang, X., He, X., Zhang, R., Tao, L., La, Y., Ma, L., Di, R. (2021). Polymorphism Detection of GDF9 Gene and Its Association. *Animals*. 11(2), 571

## EK 1

### BMP15 Geni Ekzon1

BMP15-Ex1Y-F: 5'-AAGCGTTATCCTTTGGGCTTTT-3'

BMP15-Ex1Y-R: 5'-GGAGCCCTAAAGGGAAGCAAA-3'

RV COMP- TTTGCTTCCCTTTAGGGCTC

**AAGCGTTATCCTTTGGGCTTTT**ATCAGAACATGTTGCTGAACACCAAGCTTTTCAA  
GATGGTCCTCCTGAGCATCCTTAGAATCCTTTGGGGACTGGTGCTTTTTATGGAAC  
ATAGGGTCCAAATGACACAGGTAGGGCAGCCCTCTATTGCCACCTGCCTGAGGC  
CCCTACCTTGCCCCTGATTCAGGAGCTGCTAGAAGAAGCCCCTGGCAAGCAGCAG  
AGGAAGCCGCGGGTCTTAGGGCATCCCTTACGGTATATGCTGGAGCTGTACCAGC  
G TTCAGCTGACGCAAGTGGACACCCTAGGGAAAACCGCACCATTGGGGCCACCA  
TGGTGAGGCTGGTGAGGCCGCTGGCTAGTGTAGCAAGGCCTCTCAGAGGTGAGTT  
ATCATACTATATTGTTCTGGTGGGAGGGGGGAGAAAATGGGGAAGAAAAGTGT  
AGAAAAAAGTGGATCTGTCAGTTTTCTGTCAGGCTTCACATTGCCTACAGGGTAG  
GTGGTTTTCAAAGATGGCACCCCTTGGGAGAACCTGGCTCCAAATTTGCTTCCCTT  
**TAGGGCTC**

### BMP15 Geni Ekzon2

BMP15\_EX2\_F: 5'-GGTCCAGAAAAGCCCAACCA-3'

BMP15\_EX2\_R: 5'-CTGAGCTAGCTGCACCTTTG-3'

RV COMP- CAAAGGTGCAGCTAGCTCAG

TG**GGTCCAGAAAAGCCCAACCA**ATCACTTTCCTTCTTCAGGAAGAGGCTCC  
TCAAAGCCTTCCCTGTTGCCAAAACCTTGGACAGAGATGGATATCATGGAACATG  
TTGGGCAAAGCTCTGGAATCACAAGGGGCGCAGGGTTCTACGACTCCGCTTCGT  
GTGTCAGCAGCCAAGAGGTAGTGAGGTTCTTGAGTTCTGGTGGCATGGCACTTCA  
TCATTGGACACTGTCTTCTTGTTACTGTATTTCAATGACACTCAGAGTGTTTCAGAA

GACCAAACCTCTCCC**T**AAAGGCC**T**GAAAGAGTTTACAGAAAAAGACCCTTCTCTT  
CTCTTGAGGAGGGCTCGTCAAGCAGGCAGTATTGCATCGGAAGTTCCTGGCCCCCT  
CCAGGGAGCATGATGGGCCTGAAAGTAACCAGTGTTCCCTCCACCCTTTTCAAGT  
CAGCTTCCAGCAGCTGGGCTGGGATCACTGGATCATTGCTCCCCATCTCTATACCC  
CAAACACTGTAAGGGAGTATGTCCTCGGGTACTACACTATGGTCTCAATTCTCC  
CAATCATGCCATCATCCAGAACCTTGTCAGTGAGCTGGTGGATCAGAATGTCCCT  
CAGCCTTCCTGTGTCCCTTATAAGTATGTTCCCATTAGCATCCTTCTGATTGAGGC  
AAATGGGAGTATCTTGTACAAGGAGTATGAGGGTATGATTGCCCAGTCCTGCACA  
TGCAGGTGACGG**CAAAGGTGCAGCTAGCTCAG**GTTTGCCCAAGAAATTCGAAAA  
GGATTTATAATAAATACTGTAAATCTGAGAGTGCTCAACCCAAGTGCTCTACCC  
AATCTGTAGATTCTATTTCCTTGCCTTCAGCATTGTAAGTTAAGTCTTCTTCCCCTAT  
TTATGAGTGCCTCACTTTATAAACAGTTCTGATGCCAAA

**248 Nolu SNP**

**251 Nolu SNP**

**GDF9 Geni Ekzon1**

GDF9-EX1-F: 5'-TAAGCACCTGGAAGTGGGAG-3'

GDF9-EX1-R: 5'-AGCAGGGCCAACCTCCTTTATG-3'

RV COMP- CATAAAGGAGTTGGCCCTGCT

CACCTGAAAACGTCTTTAAACCTTTCAATTAAAGTATGCATAGATGAATGAGCAG  
ACCCAAATAAAGGCACCAAGATATTATACTTTAAAGTGAGTCAAGATTAATGTG  
ATGTCCTCCTTTTTAAAGCATATTGCAGTATTCCAAGTACATATCCTTAAAAGGCT  
GCGAGAAGTACTAGGCAAAATAGCAGTTCTCTGCTCTCTGGAATCTCAATTTTCAGTTG  
TGAATTTCTCTCACCTCCAAATCAACATGCAGTAAATAAATATTC**TAAGCACCT**  
**GGAAGTGGGAG**AAGTGGTACAGATCCAGGGAGAAGAGTAAACCCAATACCATAA  
GTTGCATACAAACAGATCTGGGTATCATCATGAATCATTAGCTGTTCCCCATGCCT  
TCGAAGTTTCAGCAAGCATCTAGGGAACATTTTAAAAATCCTAATCTCTCTCAAG  
AAATCGGCCGCTTTTTTTTTTAAAGATCACTCCTTGTAGCCTTTCAGCTACATAGC  
TAGTCCATTAAGTTAAGAGATTTTAAATAAATGCCAGGGGAAAGGAAAAGGAAA  
ACTATATGGCCAAGTAAATCTGAATCTAATTAGGACAAACTGAATGAATAGGGTG  
TTGTCAGCTGATAAAAATTATCCACAGCTAAGCATCCTTAAGGTCTGATTACAGA  
ATTGAACCTAGCCCACCCACACACCTAAAGTTTATTTAAGAGACCAACCGAGGCT  
CTTCCTGGTTTTTLAGGAAGAAGACTGGTATGGGGAAATGTGTTCCCTTGCTAATTCT  
TCCAAGCCATGGCGCTTCCAACAAATTCTTCCTTTGGTTTTGCTGCTTTGCCTGG  
CTCTGTTTTCTATTAGCCTTGATTCTCTGCCTTCTAGGGGAGAAGCTCAGATTGT  
AGCTAGGACTGCGTTGGAATCTGAGGCTGAGACTTGGTCCTTGCTGAACCATTTA  
GGTGGGAGACACAGACCTGGTCTCCTTTCCCCTCTCTTAGAGGTTCTGTATGATGG  
GCACGGGGAACCCCCAGGCTGCAGCCAGATGACAGAGCTTTGC**G**CTACATGAA  
GAGGCTCTATAAGGCATACGCTACCAAGGAGGGGACCCCTAAATCCAACAGACG  
CCACCTCTACAACACTGTTTCGGCTCTTCACCCCCTGTGCTCAGCACAAAGCAGGCTC  
CTGGGGACCTGGCGGCAGGTGTGTAGGAGCAGATTGGTTAATGGGTGGAGGGAA  
GAAGAAAGACCTTTTTGCATTTTCAGTTA**CATAAAGGAGTTGGCCCTG**GCTCCTTGA  
CTTGCAATTTACTTTGCATGGTACTCAATATCCAACAAACCTGGTGCTTGATCTT  
ACTGTTTATTCCTAATGCCCTCATGGGTTGATGTAGGCTAAATCTCTTGCTAGAAG  
AGATTTAATGGCCTTAAAAC

87 Nolu SNP

**GDF9 Geni Ekzon2**

GDF9-EX2-F:5'-TCAGGAACCTTTCCATCAGTGG-3'

GDF9-EX2-R:5'-ATCAGGCTCGATGGCCAAAA-3'

RV COMP- TTTTGGCCATCGAGCCTGAT

**TCAGGAACCTTTCCATCAGTGG**ATCTGCTGTTTAACTGGATCGTGTTACT  
GTTGTGGAACATTTATTCAAGTCAGTCTTGCT**A**TATACTTTCAACAACCTCCATTTC  
TTTTCCCTTTTCTGTAAATGTATATGCAACCTGGTGATAAAAGAGCCAGAGTTTT  
CTAGCAAGACTCTCCCTAGAGCTCCATACTCATTACCTATAACTCACAGTTTGAA  
TTTAGAAAGAAATACAAATGGATGGAGATTGATGTGACGGCTCCTCTTGAGCCTC  
TGGTGGCCTCCCACAAGAGGAATATTCACATGTCTGTAAATTTTACATGTGCG**G**A  
AGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCCTGTTTAAACATGACTCTTCTC  
GTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTGCTCAGGCTTTTCACAG  
GTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTGACCAGAAGAGA  
GGGCTATCTGCCTACCCCGTGGGAGAAGAAGCTGCTGAGGGTGTAAGATCGTCCC  
GTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAA**A**TTGAAGAAGCCTCTG**G**TTCC  
AGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAAT  
GTGAGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACCTGGAT  
TGTGGCCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCG  
GTCGGACATCGGTATGGCTCTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATG  
AGAAACTTGACTCCTCAGTGCCAAGACCATCCTGTGTACCTGCCAAGTATAGCCC  
TTTGAGTG**TTTTGGCCATCGAGCCTGAT**GGCTCAATCGCTTATAAAGAATATGAA  
GATATGATAGCCACTAAGTGTACCTGTCGTTAACAGACTCCTGTCAAGTAAAACC  
ATGAGTGTCTGGCCAGTGTAATG**CCGCGCCCCTGTCT**ATGCCTTTGGGAGGAA  
GT

**159 Nolu SNP**

**326 Nolu SNP**

**332 Nolu SNP**

**241 Nolu SNP**