

GİRİŞ

Koyunlar ülkenin mera ve otlaklarını değerlendirerek ülkenin ekonomisine ve halkının beslenmesine önemli katkıda bulunurlar. Dünya ülkelerinde ve Türkiye’de koyun ve koyun ürünleri ekonomik bakımdan büyük değer taşır. Türkiye’de koyunculukta yetiştirme yönü genellikle et, süt ve yapağı yönünde kombinedir ve bu verimlerin düzeyi ırklara göre farklılık göstermekte olup genellikle düşük düzeydedir (1). Türkiye koyun mevcudunun (25.2 milyon baş) %97’sini yetersiz bakım ve besleme koşullarına uyum gösteren yerli ırklar %3’ünü ise Merinos ve melezleri oluşturmaktadır (2). Türkiye’nin toplam yıllık kırmızı et üretiminin %15.6’sı (69 715 ton) ve süt üretiminin %7.22’si (772 bin ton) bu yetiştirme kolundan sağlanmakta ve koyunculuk kesiminden ayrıca 46.273 ton yapağı ve 4.265 milyon adet deri elde edilmektedir (2).

Hayvan ıslahında temel ilke hayvan başına verim düzeyinin yükseltilmesidir. Bu da ancak hayvanların genetik yapılarının ve verimleri etkileyen çevre faktörlerinin iyileştirilmesi ile mümkündür. Hayvan yetiştiriciliğinde damızlığa ayrılacak hayvan sayısı doğacak ve yaşayabilecek yavru sayısına bağlıdır. Gerek istenilen sayıda hayvanın damızlığa ayrılabilmesi, gerekse damızlığa ayrılan hayvanlar arasında üstün verimli hayvan oranının fazla olması dölveriminin yüksek olması ile mümkündür. Dölveriminin yüksek olması ayrıca besiye alınacak kuzu sayısını artırdığı gibi seleksiyon yoğunluğunu artırma olanağı da verdiği için genetik ilerlemenin daha yüksek düzeyde gerçekleşmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla koyunculukta dölveriminin yüksek olması istenir ve bu sebeple ikiz doğum oranının artırılmasına çalışılır. Bunun için de dölverimini etkileyen genetik ve çevresel faktörlerin iyi bilinmesi ve uygun önlemlerin alınması büyük önem taşır (1).

Koyun yetiştiriciliğinde dölverimi değerlendirilirken koyun başına doğan kuzu sayısı önemli bir göstergedir. Bu özelliğin belirlenmesinde östrus oranı, doğum oranı (kuzulama oranı) ve bir batında kuzu sayısı gibi kriterler kullanılır. Koyunlarda bir batında kuzu sayısı hem genetik hem de çevresel faktörler tarafından kontrol edilir. Birçok koyun ırkında bir batında 1 ya da 2 kuzu elde edilmesine karşın, bazı koyun ırklarında (Booroola Merinosu, Cambridge, D’Man, Finnish Landrace ve Romanow) bir batında koyun başına 3 ya da daha fazla sayıda kuzu elde edilebilmektedir (3, 4).

Dölvermi bakımından genotipin iyileştirilmesi, eldeki ırkların dölverimi özellikleri yönünden seleksiyona tabi tutulması veya dölverimi yüksek ırklarla melezlenmesi ile mümkündür. Ancak dölverimi özelliklerinin belirlenmesinin cinsiyete bağlı olması, kalıtım derecesinin düşük olması ve dişilerde bile 2–3 yaştan evvel tespit edilememesi gibi sebepler, bu özelliklerin seleksiyonla geliştirilmesi olanağını sınırlamaktadır. Nitekim çok önemli bir dölverimi özelliği olan çoklu doğum özelliğinde klasik seleksiyon metotları ile çok yavaş bir ilerleme sağlandığı görülmektedir. Bu nedenle ovulasyon oranı ve böylelikle bir batında yavru sayısı üzerine büyük etkileri olan major genlerin ya da mutasyonların belirlenmesi ve bunlardan yararlanma yoluna gidilmesi, koyun yetiştiricileri ve bilim adamları arasında önemli bir ilgi yaratmıştır. İlk defa 1980 yılında Merinos koyunlarında Booroola hattında bir doğuma düşen yavru sayısı üzerinde etkili olduğu düşünülen major bir lokus tanımlanmış (4, 5) ve bu gen, 1989 yılında Committee on Genetic Nomenclature of Sheep and Goat tarafından *FecB* olarak adlandırılmıştır (6–8). Montgomery ve arkadaşları (9) tarafından 6. kromozom üzerinde lokalize olduğu belirlenen *Fec B* allelinin Bone Morphogenetic Protein Receptor IB’de (*BMPR-IB*) bir nokta mutasyonu sonucunda oluştuğu belirlenmiştir (10–12). Booroola geninin tanımlanmasından sonra diğer ırklarda da çoklu doğuma neden olan genler araştırılmış (13–24) ve çeşitli koyun ırklarında ovulasyon oranını artıran üç lokus tespit edilmiştir (*BMPR-IB*, Bone Morphogenetic Protein: *BMP-15*, Growth Differentiation Factor 9: *GDF-9*) (8, 13, 15). Bu genlerin tespit edilmesi pratikte koyun yetiştiriciliğinde fazla sayıda yavru elde edilmesine temel oluşturmuş, yapılmış olan bu araştırmalar, ovulasyon oranını artıran genlerin diğer koyun ırklarında ve diğer türlerde araştırılmasını önemli bir konu haline getirmiştir (15, 17–23, 25–28).

Türkiye’de yetiştirilen koyun ırklarından biri olan Sakız ırkı da çoklu doğurma özelliğine sahip sütçü bir ırktır. Genelde bir batında 2 veya 3 yavru doğuran bu koyun ırkında bir batında 4, 5, 6 veya 7 kuzu doğuran koyunlara da sıklıkla rastlanmaktadır (29–32). Sakız ırkının bu çoklu doğurma özelliği; bu ırkın da diğer ırklarda çoklu doğuma neden olan genleri ya da bu genler ile ilişkili olabilecek başka genleri taşıma olasılığını güçlendirmektedir. Ancak günümüze kadar Türkiye’de yetiştirilen Sakız koyun ırkında çoklu doğuma neden olan genlerin moleküler düzeyde belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Değişik koyun popülasyonlarında ovulasyon oranı üzerinde etkili olan çeşitli lokus ve mutasyonların, Sakız ırkında da tüm genom üzerinde segregasyon ve genetik markır çalışmalarıyla belirlenmesi ve etkili olan lokus sayısı ve eğer mevcut ise bunların ovulasyon oranını etkileyen diğer genlerle olan ilişkilerinin araştırılması sonucunda elde edilecek olumlu bulgular Sakız koyun ırkının kuzu verimini daha da artırabilecektir. Bu genlerin seleksiyon kriteri olarak kullanılması, damızlıkta kullanılacak bireylerin doğrudan seleksiyonuna olanak vermesi nedeni ile bu ırkta çoklu doğumun artırılmasına, dolayısı ile dölveriminin iyileştirilmesine yol açacaktır. Belirlenecek olan allel ya da allellerin ırk içinde frekansının artırılması, Sakız koyun ırkının bir batında yavru sayısının artırılmasına neden olabileceği gibi, bu gen ya da genlerin melezleme yoluyla diğer koyun ırklarına aktarılması, genellikle dölverimi düşük olan yerli koyun ırklarımızın dölverimlerinin arttırılmasına olanak sağlayacaktır. Öte yandan kısa sürede kesim olgunluğuna erişebilen süt ve dölverimi yüksek terminal hatların oluşturulmasında bu genleri taşıyan koçlardan yararlanılabilecektir (28).

Bu genlerin ortaya konulması ile ayrıca bireylerin gelecekteki fenotiplerini daha erken dönemde genotiplerine bakarak tahmin etme olanağına sahip olunacak, böylece istenilen özellik yönünden direkt seleksiyon yapılarak generasyon süresini kısaltma olanağı sağlanacaktır. Direkt seleksiyonla sadece istenilen özellik yönünden taşıyıcı bireyler sürüde tutulacağından bu uygulama ile işletmelere ekonomik yarar sağlanacaktır.

Türkiye’de yetiştirilen Sakız koyun ırkında çoklu doğuma neden olabilecek genlerin moleküler düzeyde belirlenmesine yönelik bir araştırmaya rastlanılmaması nedeniyle bu çalışmada, çoklu doğum özelliği bulunan Sakız koyun ırkında 6. kromozom üzerinde bulunan *BMPR-IB* geninde ki *Fec B* alleli PCR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Transforming Growth Factor β (TGF- β) Süperailesinde Reseptör-Ligant İlişkileri

Dişilerde reproduktivitenin devamlılığı çeşitli hormon etkilerine ve sinyal faktörlerine bağlıdır. Ovaryum folliküllerinin gelişimi her dönemde ayrı bir biyokimyasal bileşime sahip olan hiyerarşik bir sırada devam eder. Son dönemlerde, transforming growth faktor β (TGF- β) süperailisi ve bunların ovaryum fonksiyonu ve fertilitesi üzerindeki olası rolleri üzerinde durulmaya başlanmıştır.

Bone Morphogenetic Protein (BMP)'lerin üyesi olduğu TGF- β süperailisi, tip I ve tip II olarak adlandırılan özel serine/threonine kinase transmembran reseptörleri aracılığı ile biyolojik etki gösterir. Günümüzde, 7 farklı tip I reseptörü (activin reseptor-like kinase (*ALK*)1-7) ve 5 farklı tip II reseptörü (*ActRII*, *ActRIIB*, *BMPRII*, *TGF β RII* ve *AMHRII*) belirlenmiştir. Tip I reseptörler, tip II reseptörlerin alt yolağında yer alır ve sinyal spesifitesini tanımlarlar. Dolayısıyla ligantın bağlanmasından sonra, tip II reseptör tip I'i fosforile ederek kinaz aktivasyonunu sağlar. Aktive olmuş tip I reseptörü, sinyali Smad (sinyal ileti proteinleri) proteinlerini kullanarak alt yolaktaki substrata iletir. Sinyalin spesifitesi ligantın özelliği ile birlikte sinyal iletilişinde rol alan Smad proteinlerinin türüne bağlıdır. Toplam 8 tane olduğu bilinen Smad proteinlerinden Smad 2 ve 3 TGF- β /activin alt ailesi tarafından aktive edilirler. Smad 1, 5 ve 8 BMP alt ailesi tarafından aktive edilirler. Fosforilasyondan sonra Smadlar, hepsi için ortak olan Smad 4 ile kombine olarak nükleusa transloke olurlar ve buradaki transkripsiyon regülasyon elementleri ile transkripsiyonu regüle ederler. Smad 6 ve 7 ise inhibitör Smadlar olarak adlandırılırlar ve Smad sinyal ileti yolağını önlerler. Tip I ve tip II reseptörlerin dışında TGF- β RIII veya betaglican olarak adlandırılan üçüncü bir reseptör daha tanımlanmıştır. Bu reseptörün, TGF- β 2'nin tip II reseptöre bağlanmasını hızlandırarak TGF- β 2 sinyalizasyonunu artırdığını, inhibinin de tip II reseptör ile assosiasyonunu hızlandırarak activin ve bazı BMP'lerin etkisini antagonize ettiği bilinmektedir (33-36).

TGF- β süperailisinde yapısal motifleri benzeyen 35'den fazla protein bulunmaktadır. BMP'ler, activin, inhibin ve anti-müllerien hormonun da üyesi olduğu TGF- β

süperailisinin bir üyesidir. TGF- β süperailisinin birçok üyesi fetal ve erişkin dönemde hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolünde önemli işlevlere sahiptir (33).

Günümüzde 20'nin üzerinde BMP molekülü belirlenmiştir (12). Son yapılan araştırmalar BMP'lerin, follikulogenezin erken dönemlerinde önemli görevleri olduğunu göstermiştir. TGF ailesinin üyesi olan BMP'lerin görevlerini incelemek amacıyla son dönemlerde yapılan moleküler, hücre ve genetik çalışmalar sonucunda memelilerde üreme ve fertilité ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Yapılan gen ekspresyonu çalışmaları sayesinde, BMP'lerin ekspresyonunda rol alan öğeler (ligantlar, reseptörler, sinyal molekülleri ve binding proteinleri) de belirlenmiştir. Rekombinant BMP'lerin mevcut olması reproduktif dokularda proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis'in kontrolünde BMP'lerin biyolojik fonksiyonlarının belirlenmesini mümkün hale getirmiştir. BMP sisteminin memelilerde reproduksiyon için fizyolojik önemi, hayvanlarda doğal olarak oluşmuş mutasyonlar ya da bazı BMP genlerinin hedef alınarak delesyonları sonucu farklı fenotiplerin ortaya çıkması ile daha da artmıştır.

BMP adı ilk olarak 1965 yılında (33) ektopik bölgelerde kemik oluşumunu teşvik edebilen kemik ekstratları ve demineralize kemikte aktif komponentlere verilmiştir. BMP'ler ilk olarak 1988 yılında Wozney ve arkadaşları (34) tarafından izole edilmiş ve cDNA'ları klonlanmıştır. Yapılan bu çalışmada cDNA'lar *BMP-1*, *BMP-2*, *BMP-2B* (günümüzde *BMP-4* olarak adlandırılmıştır) ve *BMP-3* için tanımlanmıştır. *BMP-2*, *-3* ve *-4*'ün ortaya konan amino asit sekansları TGF- β ailesinde ulunan üyeler ile benzeşmektedir. Günümüzde TGF- β süperailisinde yapısal motifleri benzeyen 35'den fazla üyesi bulunmaktadır. Yapılan analizler sonucunda *BMP-1*'in diğer BMP'lerle yapısal benzerliği olmadığı belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı *BMP-1*, TGF- β süperailisine dahil edilmemiştir.

İlk BMP'lerin klonlanmasından çok kısa bir süre sonra BMP ailesine ait yeni genler belirlenmiştir (35-40). Birçok çalışma grubu tarafından aynı ya da benzer genlerin aynı dönemlerde belirlenmesinden dolayı aynı BMP'lerle ilişkili çeşitli gen aileleri için değişik isimler ortaya çıkmıştır. Bunlara örnek olarak osteogenic protein (OP), cartilage-derived morphogenetic factor (CDMP) ve growth differentiation factor (GDF) verilebilir. Bunun sonucunda ise bazı BMP bağlantılı genlere farklı isimler verilmiştir örneğin:

BMP-7/OP-1, BMP-6/Vg-related protein, BMP-3b/GDF-10, BMP-13/GDF-6, CDMP-1/GDF-5 ve BMP-15/GDF-9B vb.

BMP ailesinin doku ekspresyonunda izlediği yollar belirlendikçe ve araştırmalarda rekombinant BMP'lerin mevcut olması sonucunda, BMP'lerin kemik dokusu dışında farklı dokularda da büyüme, farklılaşma ve apoptozisi regüle ettiği sonucu elde edilmiştir (40–41). BMP'lerin memeli reproduktif dokularında ekspresyonuna işaret eden araştırmalar sonucunda (37, 41–45) hızla yapılan genetik ve deneysel çalışmalarda BMP sisteminin reproduktif sürecin regülasyonunda ve özellikle gonadlarda çok önemli kritik role sahip olduğu belirlenmiştir (10, 46–56).

Aktivinelike-kinase 6 (ALK-6) olarak da adlandırılan *BMPR-1B*, BMP ve GDF alt ailesinin ligantlarına özel bir tip I reseptörüdür. *BMPR-1B* reseptörü, TGF- β süperailisi üyelerine bağlanarak fonksiyon gösterir. BMP'ler (BMPs), Aktivin, anti-Müllerian hormon gibi TGF- β süperailisinin üyeleri arasında yer alırlar. Bunlar multifonksiyonel proteinler olup, pek çok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı regüle ederler. Bu ailenin üyelerinin embriyogenezdeki rollerinin yanı sıra, kemik gelişmesi, yara iyileşmesi, hematopoez, immun ve enflamatuar cevapların oluşmasında da rolleri vardır.

Koyunlarda in vitro yapılan çalışmalarda *BMPR-1B* ligantlarının (*BMP-4 ve GDF-5*) küçük antral folliküllerden izole edilen granülosa hücrelerinde progesteron sekresyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (10).

BMP-2, -4, -6, -7 ve -15 memeli ovaryumlarında eksprese olurlar ve *BMPR-1B*'ye bağlanırlar, Booroola fenotipinde hangi BMP ligantının ilgili olduğu tam olarak belirlenememiştir. Booroola fenotipinde granüloza hücrelerinde FSH tarafından indüklenen artan progesteron sentezi *BMP-6* etkisinin tersidir (53).

Booroola koyunları ile heterozigot Inverdale ve Hanna koyunları arasında benzerliğe dayanarak *BMP-15*'in Booroola fenotipi ile ilgili bir ligant olabileceği ileri sürülmüştür (54). Moore ve arkadaşlarının (57) elde ettikleri son bulgularda, *BMP-15*'in aday *BMPR* tip I reseptörleri arasından *BMPR-1B*'ye daha fazla yakınlık göstermesi bu hipoteze destek vermektedir. Booroola fenotipinde *BMP-15*'in de etkili olduğu yönündeki iddialar Booroola ve Inverdale genlerini taşıyan melezlerin ovulasyon oranlarının bu genlerin

sadece birini taşıyanlardan neredeyse 2 kat daha fazla olması ile desteklenmektedir (33, 58, 59).

Sakız Koyun Irkının Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Bu ırk adını Ege denizindeki Sakız adasından almıştır. Türkiye’de en çok İzmir ilinde özellikle Çeşme ilçesinde yetiştirilir. Bu sebeple Çeşme koyunu olarak da adlandırılır. Antalya’dan İzmir’e kadar olan kıyı şeridinde yer yer yetiştirilir. Bu ırk Yunan adalarında da yetiştirilir ve Chios adı ile bilinir. Türkiye’de sayısı fazla değildir. Sakız koyun ırkının orijini tam olarak bilinmemektedir. Bu ırkın Sakız adasında bulunan lokal bir ırk ile Anadolu ırkları arasındaki melezlemeler sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada bu ırkın her ikisi de Batı Anadolu’da en yaygın olarak bulunan Kıvrıkcık ve Dağlıç ırkları ile Sakız adasında yetiştirilen lokal ırk arasındaki melezlemelerden köken aldığı ileri sürülmüştür (32). Bu ırkların Sakız koyun ırkının kaba - karışık yapağısının ve kuyruk yapısının oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Vücut beyaz renkli kaba-karışık yapağı ile örtülüdür. Ağız ve gözler etrafında kulaklar ve ayaklarda siyah lekeler görülür. Erkeklerde kuvvetli spiral boynuzlar bulunur, dişiler boynuzsuzdur. Vücut dar ve bacaklar uzundur. Kuyruk uzun ve kök kısmı az yağlı, uç kısmı yağsızdır. Besili olanlarda dip kısmında yağ kütlesi artabilir. Memeler gelişkin ve sütçülük özellikleri iyidir (1, 29–32).

Vücut iridir (cidago yüksekliği 70 cm’dir). Yapağısı kaba-karışık tipte fakat Akkaraman yapağısından daha incedir. Aile işletmelerinde evlerin civarında, bağ-bahçe aralarında ailelerin süt ihtiyacını karşılamak amacıyla 2–5 başlık küçük gruplar halinde yetiştirilir (1).

Anaç koyunlarda; canlı ağırlık 40 – 45 kg, kirli yapağı verimi 1.5 – 2.0 kg, lüle uzunluğu 11–15 cm, yapağı kalitesi 40 – 42 S, süt verimi 120 – 180 kg, bir doğuma kuzu sayısı 1.7 – 2.3, yapağı randımanı %60 – 70’dir (1, 29).

Sakız ırkı sütçü bir ırktır ve iyi bakım besleme şartlarında süt verimi 250 kg kadar olabilmektedir (32). Bu ırkta dölverimi çok yüksektir. Genelde ikiz veya üçüz doğururlar (1, 29, 30). Bir doğumda 4, 5, 6 ve 7 doğurana da rastlanır. Sakız ırkının adaptasyon kabiliyeti iyi değildir. Bu sebeple ancak kendi bölgesinde saf olarak yetiştirilmektedir. Ancak yerli ırkların süt ve dölverimi yönünden geliştirilmesi için Sakız ırkı ile

melezlemeler yapılmaktadır. Sakız koyun ırkı erken gelişen bir ırktır ve 8–9 aylık dönemde damızlıkta kullanabilir.

Koyunlarda Ovulasyon Oranını Etkileyen Major Genler

Dünya genelinde bulunan koyun popülasyonlarında dölverimi ile ilişkili major genlerin kalıtım özellikleri ve DNA testleri uygulanarak 1980 yılından itibaren yapılan çalışmalarda, major genlerin dölverimi performansını önemli ölçüde artırma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Booroola geninin tanımlanmasından sonra diğer ırklarda da çoklu doğuma neden olan genler araştırılmış ve bu çalışmalar sonucunda, Yeni Zelanda'da yetiştirilen bir koyun ırkı olan Romney ırkında çoklu doğuma neden olan bir gen bulunmuştur. Etkisi en iyi karakterize edilen bu gen Inverdale ($FecX^I$) olarak adlandırılmış ve bu genin X kromozomu üzerinde bulunduğu saptanmıştır (13, 14).

2000 yılında yapılan bir çalışmada Inverdale koyununda ovaryumda üretilen büyüme faktörü geninde (Bone Morphogenetic Protein- $BMP-15$) bir mutasyon bulunmuştur (16). Bu araştırma sonucunda hem Inverdale ve hem de Hanna koyunlarında $BMP-15$ geninde mutasyon olduğu ancak Inverdale ($Fec X^I$) koyununda Hanna ($Fec X^H$) koyunundan farklı bir mutasyon olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmalardan sonra diğer koyun ırklarında da benzer major genlerin aranmasına hız verilmiş ve Booroola ($Fec B$) ve Inverdale ($Fec X$) ırklarında bulunan genlere ilave olarak İcelandi (17), Javanese (18), Olkaska (19), Cambridge (20, 21), Belclare (21), Lacaune (22) ve Woodlands (23) koyun ırklarında da major genlerin segregasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Bundan başka Cambridge ve Belclare koyun ırklarında 5. kromozom üzerinde de heterozigotlarda ovulasyon oranını artıran ve homozigotlarda infertiliteye sebep olan başka bir mutasyon daha Growth Differentiation Factor 9 ($GDF-9$) geninde bulunmuştur (24).

Ovulasyon oranını artıran mutasyonlar $BMPR-1B$, $BMP-15$ ve $GDF-9$ genlerinde bulunmuştur ve diğer genlerle ilgili olarak yapılan çalışmalarda kalıtım özellikleri incelendiğinde bunların varlığı tespit edilmiş ancak bunlarla ilgili mutasyonlar henüz lokalize edilememiştir. $BMP-15$ geninde 4 farklı mutasyon ($FecX^I$, $FecX^H$, $FecX^B$, $FecX^G$) bulunmuştur. Ancak bunların hepsi aynı fenotipin oluşumuna sebep olmaktadır.

Dölverimi ile ilgili farklı genlerin kalıtımında ovulasyon oranı üzerinde eklemeli (additif) etkiye sahip otozomal dominant genler (*BMPR-IB*; Lacaune), homozigot dişilerde infertiliteye sebep olan otozomal genler (*GDF-9*), homozigot dişilerde infertiliteye sebep olan X kromozomu üzerinde taşınan genler (*BMP-15*) ve anneden geçen X kromozomunda taşınan genlerin baskılanması rol oynamaktadır. Mutasyonun tek bir kopyasının ovulasyon oranı üzerine etkisi östrus başına 0,4 (*FecX2* mutasyonu) ile 1,5 (*BMPR-IB* mutasyonu) arasında değişmektedir. Günümüzde bu mutasyonların bazıları markırlar eşliğinde yapılan (Marker Assisted Selection MAS) seleksiyon yöntemi yardımıyla genetik ıslah programlarında kullanılmaya başlanmıştır. Ovulasyon oranı ve yavru sayısı üzerinde major bir genin varlığı belirlenen ilk koyun ırkı Booroola Merinosu'dur (60).

Tablo 1: Koyunlarda dölverimi üzerinde etkisi belirlenen ve varsayılan major genler

Gen	Adı	Allel Sembolü	Kromozom	Ovulasyon oranı (OO) ve yavru verimi (YS) üzerinde etkisi	İrk
<i>BMPR-IB</i>	Booroola	<i>FecB^B</i>	6	B+: OO+1.5; YS+1.0 BB: OO+3.0; YS+1.5	Merinos, Garole ve Javanese (9-12, 61)
<i>BMP-15</i>	Inverdale	<i>FecX^I</i>	X	I+: OO+1.0; YS+0.6 II: infertil (gelişmemiş ovaryumlar)	Romney (16, 21, 59, 61-63)
<i>BMP-15</i>	Hanna	<i>FecX^H</i>	X	H+: OO+1.0; YS+ 0.6 HH: infertil (gelişmemiş ovaryumlar)	Romney (63)
<i>BMP-15</i>	Belclare	<i>FecX^B</i>	X	<i>X^B +</i> : OO+1.0 <i>X^B X^B</i> : infertil (gelişmemiş ovaryumlar)	Belclare (64, 65)
<i>BMP-15</i>	Galway	<i>FecX^G</i>	X	G+: OO+ 0.7 GG: infertil (gelişmemiş ovaryumlar)	Belclare ve Cambridge (65, 66-69)
<i>BMP-15</i>	-	-	X	Fenotip henüz belirlenmemiştir	Lacaune (22)
<i>GDF-9</i>	Yüksek Fertilite	<i>FecG^H</i>	5	<i>G^H+</i> : OO+1.4 <i>G^HG^H</i> : infertil (gelişmemiş ovaryumlar)	Belclare ve Cambridge (64, 69)
-	Woodlands	<i>FecX2^W</i>	X	W+: OO+ 0.4; YS+0.25 WW: OO&YS≥W+	Coopworth (23, 70)
-	Lacaune	<i>FecL^L</i>	11	L+: OO+1,0 LL: OO+2,0	Lacaune (71-73)
-	Thoka	<i>FecI^I</i>	-	<i>I^I+</i> : OO+ 0.7 <i>I^II^I</i> : infertil olabilir	Icelandic (74-79)
-	-	-	-	Heterozigot olarak tanımlananlarda: OO +1.0; YS + 0.6	Olkuska (74, 80, 81)
-	-	-	-	OO:1- 8; YS: 1-7 (varyasyon oldukça fazla) ve OO'nın tekrarlama derecesi 0.8	Belle-Ile (82, 83)

OO: Ovulasyon oranı; YS: Yavru sayısı

Piper ve Bindon (4) tarafından yapılan ilk çalışmadan itibaren koyunlarda dölverimi üzerinde etkisi olan mutasyonun belirlendiği, kalıtımı tanımlanan ve varsayılan major genlerle ilgili bilgiler Tablo 1’de verilmiştir.

Booroola Geni

Booroola geni Booroola Merinosu koyununda ovulasyon oranı ve dölveriminde artmaya yol açan ve tek lokusta kalıtılan bir mutasyondur. Mutasyon önceleri bunu taşıyan koyunların ilk olarak bulunduğu Güneydoğu Avustralya’daki bir çiftliğin adına ithafen Booroola olarak adlandırılmıştır. Booroola geninin ovulasyon oranında eklemeli ve bir doğumdaki kuzu sayısında ise dominant etki gösterdiği saptanmış, bu genin tek bir kopyasının ovulasyon oranını ve bir doğumdaki kuzu sayısını, sırasıyla 1.3–1.6 ve 0.9–1.2 artırdığı, genin iki kopyasının ise aynı oranları sırasıyla 2.7–3.0 ve 1.1–1.7 oranında artırdığı bulunmuştur (7,8).

Koyunlarda 6q23–31 bölgesinde saptanan bu mutasyonun insanda 4q21–25 ortoloğu ile homoloji gösterdiği bilinmektedir (10, 84). Ancak Davis ve arkadaşlarının (85) 2001 yılında yayınladıkları ve insanda dizigotik ikizlerde yaptıkları çalışma sonucuna göre, eğer 4. kromozom üzerinde dizigotik ikizliğin kalıtımını etkileyen bir gen varsa bile bunun etkisinin minör olduğu vurgulanmıştır.

Yeni Zelanda’da AgResearch, Fransa’da INRA ve İskoçya’da Edinburg Üniversitesi’nde çalışan araştırma grupları, 2001 yılında Booroola genini taşıyan koyunların ovaryum içinde etkili olan reseptöründe (*BMPR-IB*) bir mutasyon belirlemişlerdir (10–12).

BMPR-IB geninin belirlenmesi ile %100 doğru sonuç veren DNA testi geliştirilmiştir (12, 86). Bu testte ebeveynlere ait kayıtlara gereksinim duyulmamaktadır. Wilson ve arkadaşları (12) tarafından geliştirilen bu testte yapılan PCR ile Booroola koyunlarında Test R15 (5’- CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT CAA CAC GGT C -3’) ve Test F12 (5’- GTC GCT ATG GGG AAG TTT GGA TG -3’) primerlerini kullanarak 140 bp’lik bir bant elde edilmiştir. Elde edilen bu ürünlerin *Ava* II enzimi ile kesilmesinden sonra yapılan agaroz jel elektroforezi sonunda: homozigot *Fec B* bireylerde 110 bp’lik tek bir bant, heterozigot *Fec B* bireylerde 140 ve 110 bp’lik iki bant ve taşıyıcı olmayanlarda ise 140 bp’lik bir bant elde etmişlerdir.

Bu yeni ve ebeveyn kayıtlarına ihtiyaç duymadan %100 doğru sonuç veren testin bulunması Booroola Merinosunun orijini ile ilgili çalışmalara yeni alanlar açılmasına olanak sağlamıştır. Davis ve arkadaşları (74) tarafından yapılan bir çalışmada bu genin orijininin Hindistan'ın güneyinde yetiştirilen Garole koyun ırkından geldiği ileri sürülmüştür. Bengal koyunu olarak da adlandırılan Garole koyunu, 1792 yılında Avustralya'ya getirilmiştir ve büyük ihtimalle Booroola Merinosu bu koyunun yetiştiricilikte kullanılması ile ortaya çıkmıştır (87). Endonezya'da yetiştirilen ve dölverimi yüksek olan Javanese koyununda ilk olarak Fec J (61) olarak adlandırılan genin yapılan testler sonucunda Booroola geni ile aynı olduğu belirlenmiştir (73).

Booroola geninin belirlenmesi ile geçmişte taşıyıcı bireylerin seleksiyonu ile ilgili olarak yaşanan zorluklar oldukça aza indirgenmiştir. Ancak Avustralya Merinosundan gelen Booroola genini taşıyan koyunlar sadece 13 ülkede yetiştirilmektedir. Buna ilaveten Hindistan ve Endonezya'da da *BMPR-IB* mutasyonunu taşıyan yerli ırkların yetiştiriciliği yapılmaktadır (74).

DNA testi yardımıyla, Booroola Merinosunun orijininin, dölverimi yüksek olan Avustralya'ya 18. yüzyıl sonuna doğru getirilen Garole ırkından geldiğinin belirlenmesi de mümkün kılınmıştır. Hindistan'da yetiştirilen Garole koyununa ait örneklerde yapılan testler, bu ırkın *BMPR-IB* mutasyonunu homozigot taşıdığını, Endonezya'da yetiştirilen Javanese koyununda yapılan testler ise bu mutasyonun bu ırkta segregasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (60, 74).

BMPR-IB mutasyonu ve *BMP-15* mutasyonunu taşıyan koyunlar arasında yapılan melezleme çalışmalarında elde edilen dişi yavruların hepsinin fonksiyonel ovaryumlara ve yüksek ovulasyon oranına sahip oldukları belirlenmiştir (59). *BMP-15* ve *BMPR-IB* mutasyonlarının birer kopyası ovulasyon oranı üzerinde eklemeli etki yapmaktadır. Ovulasyon oranını *BMP-15* mutasyonu %44 ve *BMPR-IB* mutasyonu ise %90 oranında artırmaktadır. Bunun yanı sıra bir genin etkisi diğer bir genin varlığında ya da yokluğunda kaybolmamaktadır.

Birçok ülkede Booroola Merinosu ile farklı ırklar arasında yapılan melezleme çalışmalarında genel olarak heterozigot *FecB^B* (taşıyıcı genotip) koyunların koyun başına üretilen kuzu ağırlığı bakımından bu geni taşımayan koyunlara oranla daha yüksek değerlere sahip oldukları saptanmıştır (25, 26). Southey ve arkadaşları (27) Booroola

Merinosu X Rambouillet melezlerinde yaptıkları çalışmada *FecB^B* allelinin ovulasyon oranını koyun başına ortalama 1.5 – 1.7 artırdığını, bunun sonucunda bir batında koyun başına düşen kuzu sayısını ise 0.6 – 0.7 artırdığını ve koyun başına 10 kg daha fazla kuzu elde edilebildiğini belirlemişlerdir. İsrail’de yetiştirilen ve koyun başına düşen kuzu sayısı 1.2 – 1.6 olan İvesi ve Assaf koyunlarında *FecB^B* allelinin aktarılmasına yönelik yapılan melezleme çalışmalarında bir batında koyun başına düşen kuzu sayısı 2.0 olarak bildirilmiştir (28).

Booroola Merinosunda *Fec B* Allelinin Fizyolojik Etkileri

Booroola mutasyonunu taşıyan hayvanlarda siklus süresinde, luteinizan hormonun (LH) ovulasyon öncesi pikinde, östrus davranışları ve seksüel olgunluk çağları bakımından mutasyonu taşımayanlarla karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık yoktur.

Fec B alleli taşıyıcısı olan koyunlarda Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) konsantrasyonunda ve sekresyonunda da herhangi bir farklılık yoktur. Mutasyonu taşıyan ve taşımayan koyunlarla yapılan bir çalışmada GnRH’ın endojen olarak (yani cerrahi yöntem yardımıyla hipotalamusun hipofizden ayrılması) engellenmesi ve dışarıdan GnRH verilmesi sonucunda ovulasyon oranlarının etkilenmediği ve taşıyıcı koyunların yüksek ovulasyon oranlarını koruduğu belirlenmiş ve mutasyonun reproduktif dönemde hipotalamus etkisinden önceki bir evrede etkili olduğu düşünülmüştür (88).

Fec B allelinin varlığı hipofiz düzeyinde GnRH reseptörlerinin sayısında bir değişikliğe neden olmamakla birlikte hipofiz düzeyindeki hormonal etkileri konusundaki fikirler oldukça farklıdır. Campell ve arkadaşlarından (89) oluşan grup mutasyonu taşıyan ve taşımayanlar arasında gonadotropin hormonlarının sekresyonu yönünden bir farklılık olmadığını söylemelerine rağmen McNatty ve arkadaşları (90) grubu mutasyonun varlığı durumunda plazmada Follikül stimulan hormon (FSH) konsantrasyonunun arttığını belirlemişlerdir. Taşıyıcı hayvanlarda plazma FSH konsantrasyonunda artış olduğu 1985 yılında Bindon ve arkadaşları (91) tarafından da bildirilmiştir. Koyunlarda FSH’nın ovulasyon oranını artırıcı etkisi bilinmektedir (92) ancak Booroola koyununda yüksek dölverimini plazma FSH seviyesi ile açıklamanın yeterli olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir (93).

Fry ve arkadaşları (93) değişen FSH seviyesinin etkilerinden kurtulmak için yaptıkları çalışmada hipofizektomi uygulanmış taşıyıcı ve normal bireylerde ovulasyonu stimüle etmek için Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) ve Human chorionic gonadotropin (hCG) uygulamışlardır. Çalışma sonucunda taşıyıcı bireylerin ovulasyon düzeylerinin taşıyıcı olmayanlarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda Booroola koyununda mevcut olan mutasyonun ovaryum düzeyinde etkili olduğu düşünülmüştür.

Homozigot *Fec B^B/Fec B^B* koyunlarda folliküllerin ovulasyon boyları küçülmüş ve folliküler daha az sayıda granülosa hücresine sahiptir (94). Homozigot *Fec B^B/Fec B^B* koyunlara ait folliküller 1 – 2.5 mm ve 3 – 4.5 mm çapına sahipken aynı maturasyon dönemindeki *Fec B⁺/Fec B⁺* koyunlarda sırasıyla 3 – 4 mm ve > 4.5 mm'dir. LH reseptörleri *Fec B^B/Fec B^B* koyunlarda granülosa hücreleri 3 – 4.5 mm olunca ve *Fec B⁺/Fec B⁺* koyunlarda ise sadece 5 mm'den büyük olunca eksprese olurlar (94). *BMPR-IB* koyunlarda oositler ve ovaryumların granüloza hücrelerinde eksprese olurlar. Buna ait ligantlar olan *GDF-5* ve *BMP-4*'ün koyun granüloza hücrelerinde progesteron sekresyonunu önlediği in vitro olarak gösterilmiştir (56). *Fec B* alleli taşıyıcılarında bu etki, *BMPR-IB*'deki Q249R mutasyonu sonucu değişerek azalmıştır (10, 95). *Fec B* taşıyıcısı dişi koyunlarda Q249R substitüsyonu granüloza hücrelerindeki steroidogeneze *BMPR-IB*'nin inhibitör etkisini zayıflatarak bu hücrelerde ileri farklılaşmaya ve follikülerde ileri maturasyona yol açar (10, 12).

Fizyologlar yaklaşık olarak 20 yıldır, Booroola mutasyonunun, ovaryum faktörlerinden herhangi birinin sekresyonunda ya da bunların etkisinde bozulmaya neden olup olmadığını araştırmışlardır. Sonuç olarak, östrus siklusunda ovaryum progesteron, oestradiol ve inhibin A sekresyonu açısından mutasyon taşıyıcısı olan ve olmayanlar arasında bir farklılık olmadığını belirlemişlerdir (89). Genel olarak ovaryum düzeyindeki hormonal sekresyonlarda değişiklikler yoktur. Değişik genotipler içinde oestrojenik folliküllerin granüloza hücreleri aynıdır (96). Ancak mutasyona uğramış alleli taşıyanlarda folliküller daha ufak ve daha az sayıda granüloza hücresine sahiptirler.

Campbell ve arkadaşları (97) yaptıkları çalışmada *Fec B* allelinin ovulasyonu artırıcı yöndeki etkisinin, ovaryuma uygulanan gonadotropik stimülasyonun düzeyinden çok, bu stimülasyona karşı ovaryumdaki cevabı değiştiren mekanizmaların etkilenmesinden kaynaklandığını vurgulamışlardır.

Booroola Mutasyonunun Belirlenmesinin Genetik Katkıları

Booroola koyununda 6. kromozom üzerinde lokalize olan ve yüksek dölveriminden sorumlu tutulan mutasyon, 2001 yılında 3 farklı çalışma grubu tarafından tanımlanmıştır. *BMPR-IB* geninde meydana gelen bu nokta mutasyonu sonucunda cDNA'nın 746. nükleotidinde "Adenin" bazı ile "Guanin" bazının yer değiştirmesi, bunun da *BMPR-IB*'yi oluşturan amino asit diziliminde 249. sırada "Glutamin" in "Arginin" ile yer değiştirmesine yol açtığı gösterilmiştir (10, 12). Wilson ve arkadaşları (12) in situ hibridizasyonda primordial follikül döneminden itibaren antrum dönemine kadar olan folliküler büyüme döneminde *BMPR-IB*'ye ait mRNA'ların ovaryum ve granülosa hücrelerinde eksprese edildiklerini göstermişlerdir.

Fec B taşıyıcısı olan ve olmayan koyunların granüloza hücrelerinin antruma gidecek olan küçük follikülleri *BMPR-IB*'nin bilinen iki ligantının (*BMP-4* ve *GDF-5*) varlığında kültive edilmiş ve bu çalışma sonucunda taşıyıcı olmayan koyunlarda *BMP-4* ve *GDF-5* varlığında progesteron sekresyonunda bir azalma ve homozigot koyunlarda ise bu inhibisyon etkisinde kısmi kayıp olduğu belirlenmiştir (98, 99). Mutasyonun *BMPR-IB* reseptörünün ekspresyonunu inhibe etmemekle birlikte bunun aktivitesinin bir kısmını inhibe ettiği düşünülmektedir (10).

Bu çalışmalardan sonra 2004 yılında Hanrahan ve arkadaşları (64) başka koyun ırklarında ovaryum fonksiyonunu bozan ve *BMP-15* ile *GDF-9*'a etki eden 3 farklı nokta mutasyonu daha belirlemişler ve bu mutasyonlardan herhangi birini heterozigot taşıyan koyunlar yüksek dölverimine sahip ancak homozigot taşıyan koyunların Inverdale ve Hanna koyunlarında olduğu gibi steril olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan genetik analizler sonucunda Cambridge ve Belclare ırklarında *BMP-15* ve *GDF-9* ligantlarının polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir (64).

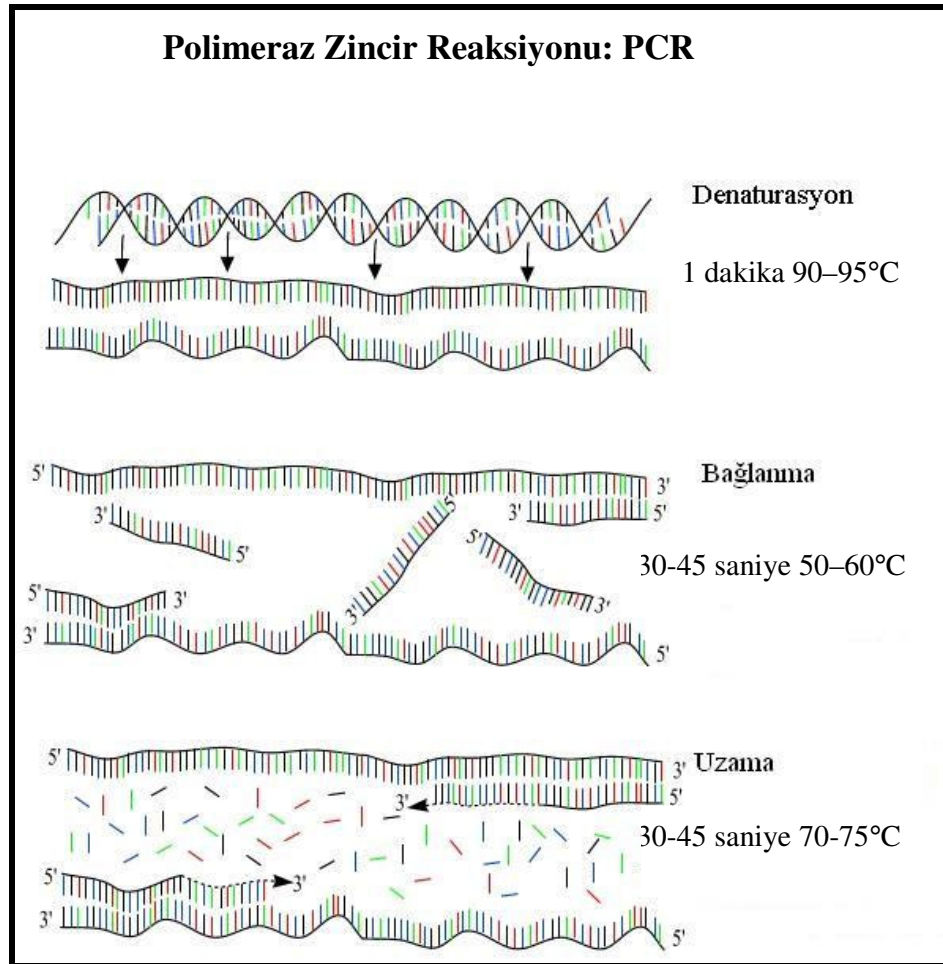
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 1986 yılında geliştirilen ve spesifik bir DNA bölgesini enzimatik reaksiyonla in vitro olarak kısa sürede milyonlarca kez çoğaltabilen bir tekniktir (100, 101).

PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda,

konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır (100–103). Bunun yanı sıra, genetik markır olarak kullanılan DNA tekrar dizilerindeki ve restriksiyon kesim bölgelerindeki farklılıkların kısa sürede tanımlanmasında ve gen yapılarına uygun özgün primerler kullanarak, genetik bozukluklardaki mutasyonların yerinin ve mutasyonun tipinin hızlı olarak belirlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 1).

PCR deney tüpü içerisinde DNA'yı kopyalar ve kopyalama işlemi sırasında doğal DNA replikasyonu sırasında kullanılan temel elementleri kullanılır. Bir PCR reaksiyonu için gerekli olan maddeler, aşağıda açıklaması yapılan hedef DNA, DNA polimeraz, primerler, deoksiniükleotidler ve magnezyum içeren tampon çözeltiden oluşmaktadır (100–104).



Şekil 1: PCR reaksiyonu ile DNA'nın çoğaltılması

DNA polimeraz (DNA polymerase)

DNA polimeraz enzimleri, kalıp görevi gören DNA ipliğini tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak 4 çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan yararlanarak uzun polinükleotid zincirin sentezini katalize ederler. Bu enzimlerin sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primer) ihtiyaçları vardır. Sentezlemenin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerlerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamda bulunan deoksinükleotid trifosfatların (dNTPs) nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

En sık kullanılan DNA polimeraz enzimi, Taq-polimerazdır. Bu enzim *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiştir. Yüksek sıcaklığa dirençli olan bu enzimin optimal etkiye sıcaklığı 72 °C'dir (103, 104).

DNA'yı PCR yöntemiyle amplifiye edebilmek için başlatıcı oligonükleotid primerlere ihtiyaç duyulur. Oligonükleotidler sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA parçalarıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan oligonükleotidler en az 16 ve tercihen de 20–24 nükleotid uzunluğunda olmalıdır. Bu oligonükleotidler, polimerizasyon sırasında kullanılan sıcaklıklarda (genelde 72 °C) sabit hibritler oluşturabilmek için yeterli uzunluktadır. Genel olarak başlatıcı oligonükleotidlerin hedef DNA ya düşük ısılarda (37–55 °C) bağlanmasından hemen sonra Taq DNA polimeraz çalışmaya başlamaktadır. Eklenen ürünler hedefe bağlı kalabilmek için yeterli uzunlukta olduğundan dolayı polimeraz zincir reaksiyonunun ısı hızla 72 °C'ye yükseltilir.

Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak primerlerin içerdikleri baz sıralarının sadece hedef DNA'ya özgü olması dikkat edilmesi gereken en önemli noktadır. Bu kurala uyulmadığı takdirde çapraz amplifikasyonlar meydana gelerek sonucu ve yorumlamayı olumsuz etkiler. Bunun dışında hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi ve bunlar üzerindeki spesifik bölgelerin seçilmesine dikkat edilmelidir (103, 104).

Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs)

DNA sarmalının sentezi için; dATP, dTTP, dGTP, dCTP; hepsi dNTPs olarak adlandırılan 4 farklı deoksinükleotid trifosfata gereksinim vardır. Nükleotidlerin PCR karışımındaki konsantrasyonları 20–200 µM olmalı ve 4 nükleotid de aynı oranda kullanılmalıdır. Nükleotidlerin düşük konsantrasyonlarda kullanılması PCR'ın spesifitesini artırır. Nükleotidlerin en uygun konsantrasyonlarını tespit etmek için amplifiye edilecek ürünün uzunluğu, MgCl₂ ve primer konsantrasyonları dikkate alınmalıdır (103, 104).

Reaksiyon solüsyonu

Günümüzde birçok reaksiyon solüsyonu bulunmaktadır ve standart reaksiyon solüsyonu 50 mM KCl₂, 10 mM TrisCl (pH8,3), 1.5 mM MgCl₂ içermektedir. İyonik olmayan deterjanlar enzim aktivitesi için önemlidir. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması halinde, artan Mg⁺² konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur. Magnezyum iyon konsantrasyonunun primer bağlanması, kalıp DNA ve PCR ürünlerindeki çift sarmal yapının ayrılma ısısı, primer-dimer yapısı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi bulunmaktadır (103, 104).

Hedef DNA

PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde araştırma laboratuvarları, klinikler veya ticari firmalardan hazır olarak elde edilebilirler. Hedef dizini içeren DNA, polimeraz zincir reaksiyon karışımına tek ya da çift zincir formunda konulabilir. DNA'nın uzunluğu önemli bir faktör olmasa da yüksek molekül ağırlığına sahip DNA (örneğin: genomik DNA) nadiren kesen restriksiyon enzimleriyle kesime tabi tutulduğunda amplifikasyon daha verimli olur. Hedef DNA üzerindeki hedef dizinlerin konsantrasyonu duruma göre değişir ve genelde araştırmacının kontrolü altında değildir. Bununla beraber miktarı bilinen hedef dizinlerle (1ng, 0.1 ng, 0.001 ng vs) yapılan seri denemeler sonucunda amplifikasyonun istenen düzeyde çalışıp çalışmadığı kontrol edilir (103, 104).

PCR'in çalışma prensibi

PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak, bu üç adımın tekrarlama sayısına bağlıdır.

1. İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Genomik DNA, kan, sperma, kurumuş kan ya da sperma gibi adli tıp örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler, tek bir saç teli, mumya kalıntıları ve fosil gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90–95°C'de, yaklaşık 5 dakika süreyle).

2. Sıcaklık 50 ile 60°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotidlerdir (15 – 30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3. DNA polimeraz'ın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilen enzim, Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ile 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.

Bu üç basamaktan oluşan reaksiyon seti – çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denaturasyon), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extention) – bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur, çünkü yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevini görürler. Yirmi beş – otuz döngü sonunda DNA miktarında yaklaşık 1.000.000 kez artma olur. İşlem, thermocycler (ısı döngüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntem ile; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarlarda hedef DNA fragmentleri elde edilir (100–105).

PCR çok gelişmiş bir teknik olmasına rağmen, bazı sınırları vardır. Hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekli olması ve nispeten kısa bir ürün elde

edilmesi, bunlardan bazılarıdır. Diğer DNA kaynaklarından çok küçük miktarda bir bulaşma bile sorunlara neden olabilir. Laboratuvar çalışanlarından dökülebilecek deri parçaları, DNA örneğine bulaşabilir ve doğru sonuç alınmasını engelleyebilir. PCR reaksiyonu çok dikkatli ve kontrollü yapılmalıdır.

PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

PCR ürünleri belli uzunluktaki DNA parçalarını içerir. Bu ürünleri görüntülemek için agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi yapılır. Elektroforez işleminden sonra ethidium bromide, gümüş boyama ve otoradyografi metotlarından birisi kullanılarak görüntüleme işlemi yapılabilir (106).

Moleküler Markırlar (Belirteçler)

Kalıtım şekilleri, morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markır denir. Bu karakterlerin markır olarak isimlendirilmesinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetiği hakkında dolaylı da olsa bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markırlar DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler (107).

DNA markırları

DNA markırları, farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını ortaya koyan araçlardır. Bunlar; DNA'nın enzimlerle kesimi sonucu elde edilen RFLP'ler ve PCR kullanımına dayalı olan SSCP, RAPD, AFLP, STS, SNP, mtDNA, VNTR'lerdir. Günümüzde DNA düzeyinde polimorfizmi gözlemlememize yarayan moleküler markırlar hayvan genetiğinde anahtar rolü oynamaktadır. Çeşitli moleküler biyoloji yöntemlerinin geliştirilmesi ve aralarında geniş bir varyasyon olmasından dolayı amaca en uygun genetik markırların seçilmesi oldukça önemlidir.

Genetik çalışmalarda moleküler markırları kullanırken 2 önemli nokta göz önünde bulundurulmalıdır. Moleküler Biyoloji'de çalışacak olanların kullanacakları yöntemle oldukça basit bir şekilde yeterli sayıda genotip verisi elde edebilmeli ve mümkün

olabilecek en az maliyete sahip olmalıdır. İstatistiksel olarak da yapılacak analize göre dominans ilişkileri, heterozigotluk oranları, nötralite, harita üzerinde markırların yerleşimleri ya da markırların genetik bağımsızlıkları gibi çok az sayıda özellik önemlidir. Ama önemli olan hangi sistem seçilirse seçilsin sonuç mümkün olduğunca uygulanabilir olmalıdır. Çeşitli dönemlerde kullanılan moleküler markırların popülaritelerindeki çeşitlilikler günümüzde oldukça fazladır ve moleküler genetik açısından oldukça çabuk gelişmektedir (107-111).

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)

Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmleri denilen bu markırlar, diziyi tanıyan bir nükleaz (restriksiyon enzimi) ile kesilebilen özel nükleotid dizisinin olduğu DNA bölgelerini gösterir. Günümüzde, artık tarımsal önemi olan birçok organizma için RFLP markırları bulunmaktadır ve bu yöntem kantitatif özelliklere ait lokusların da haritalanmasını mümkün kılmaktadır (108).

İnsan genomu boyunca (özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerde), her 200 nükleotidde 1 dizi farklılığı görülür. Bu özel bölgelerdeki nükleotid çiftinde değişiklik veya bir ya da birden fazla nükleotid çiftinin delesyonu veya insersiyonu şeklinde görülür ve bir restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası yaratabilir. Restriksiyon enzim kesimleri ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri olarak adlandırılır (108, 109). RFLP'ler oldukça yaygındır. İnsan genomunda binlercesi tanımlanmıştır ve bunların birçoğu her bir kromozoma özgü olarak bulunmuştur. Bu çeşitlilikler kodominant alleller olarak aktarılır. Her bir kromozomda özgül bölgelerde haritalandırıldıkları için, genetik hastalıkların bir ailede nesilden nesile geçişini takip etmek amacıyla belirleyici olarak kullanılırlar. RFLP'leri kullanarak genetik hastalığın kromozom yerleşim bölgesini tayin edebilmek için, ailenin birçok kuşakta (üç ya da daha fazla) genetik hastalıkla birlikte geçiş gösteren bir RFLP belirleyicisinin haritalanması gerekir. Çalışılan ailede RFLP belirleyicisinin seçimi, deneme ve yanılma ile yapılır. Aile bireylerinin çoğunun heterozigot olduğu bir belirleyici bulmak için, pek çok farklı kromozomal bölge çalışılır. Böylece, bir üyesi hastalık fenotipi ile bağlantılı olan her bir kromozom çifti belirlenmiş olur. Bir genetik hastalığı tanımlayabilmek için, belirli bir RFLP'nin ve hastalığın ailenin mümkün olan tüm üyelerindeki geçişinin izlenmesi gerekir. Eğer bir RFLP bölgesi ve hastalık aynı kromozom üzerinde ve birbirine yakınsa, bağlantı göstereceklerdir. Bu tür

çalışmalarda RFLP'lerin çoğu, hastalıkla bağlantı göstermez ve bu sonuçlar hastalıkla ilgili gen bölgesini taşımayan kromozomların belirlenmesini sağlar. Bir RFLP belirleyicisi ile bir genetik hastalığın bağlantılı olup olmadığını belirlemek için olasılık analizleri yapılır.

RFLP tekniğinin avantajları; restriksiyon enzimlerinin türler, cinsler hatta familyalar arasında ortak olmasıdır. Bir diğer avantajı da güvenilir olmasıdır. Farklı araştırmacılar, farklı laboratuvarlarda, aynı sonuçları elde etmektedirler. Orta düzeyde polimorfizm oranları vardır. En önemli dezavantajı ise analizlerin pahalı olmasının yanı sıra zaman ve iř gücü gerektirmesidir (108–110).

GEREÇ ve YÖNTEM

Hayvan Materyali

Bu araştırma Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Sakız koyunları ile İzmir'de Çeşme ve Urla'da ve Çanakkale Ayvacık ilçesinde yetiştirilen çeşitli Sakız sürüleri üzerinde yürütüldü.

Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Sakız ırkına ait koyun ve kuzulardan (ebeveynlerinden kan alınamayan), İzmir Çeşme'de 1 Sakız sürüsünden ve Urla'da 2 farklı Sakız sürüsünden, Çanakkale Ayvacık ilçesine bağlı köylerde 6 farklı Sakız sürüsünden ve varyasyon yaratmak amacı ile Yenice ilçesinde Sakız – Kıvırcık melezi koyundan kan örneği alındı. Çalışmada kullanılan Sakız ve Sakız X Kıvırcık melezi koyunlara ait örneklere ait sayılar ve kan örneklerinin alındığı yerler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan Sakız ve Sakız X Kıvırcık melezi koyunlara ait örneklerin sayısı ve kan örneklerinin alındığı yerler

	Hayvan Sayısı	Örneğin Alındığı Yer
Sakız	108 baş	Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü
Sakız	80 baş	İzmir - Çeşme
Sakız	50 baş	İzmir - Urla
Sakız	150 baş	Çanakkale - Ayvacık
Sakız X Kıvırcık Melezi	18 baş	Çanakkale - Yenice

Sakız ırkına ait koçlara, koyunlara ve bunların yavrularına ait kan örnekleri 4 ml'lik EDTA'lı vakumlu tüplere steril ve tek kullanımlık iğne ile vena jugularis'e girilerek steril olarak alındı. Her koyundan EDTA'lı tüplerde ikişer tüp kan örneği alındı. Alınan kanların hemoliz olmasını önlemek için kanların alındığı EDTA'lı tüpler alt üst edilerek karıştırıldı ve soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen kan örnekleri DNA izolasyonuna kadar -20°C de saklandı.

Bu çalışmada kullanılan Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Sakız ırkına 108 adet koyundan alınan kan örneklerinin DNA izolasyonları ve genetik analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik laboratuvarında yapılmıştır. İzmir'de Çeşme ve Urla'da ve Çanakkale Ayvacık ilçesinde yetiştirilen çeşitli Sakız sürülerinden ve Yenice'de yetiştirilen Sakız – Kıvrıkcık melezlerinden alınan kan örneklerinin DNA izolasyonları ve genetik analizleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik laboratuvarında yapılmıştır.

DNA Örnekleri ve DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kandan DNA izolasyonu için “Fenol-kloroform Ekstraksiyonu” yöntemi kullanıldı (112). DNA izolasyonunda uygulanan yöntemde yapılan işlemler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- 1- 15 ml'lik falcon tüpüne 2 ml kan örneğinden ilave edildi
- 2- Üzerine 10 ml T10E10 (Ph 7.5) eklendi
- 3- Vortekste iyice karıştırıldı
- 4- 20 dakika 3000 rpm de santrifüj yapıldı
(Shanghai Surgical Instruments marka 80-2 model)
- 5- Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı
- 6- Üzerine 10 ml T10E1 (ph 7.5) ilave edildi
- 7- 3, 4, 5 nolu basamakları tekrarlandı
- 8- Üzerine 10 ml T10E1 (ph 7.5) ilave edildi
- 9- 3, 4, 5 nolu basamakları tekrarlandı
istendiği takdirde tekrar T10 E1 ilave edilerek 3, 4 ve 5. basamaklar tekrar edilebilir.
- NOT: Normalde üstteki sıvı kısmın mümkün olduğunca berrak olması istenir
- 10- 500 µl NDB solusyonundan ilave edildi
- 11- Elde edilen peleti çözdürmek için iyice vortekslendi
- 12-Üzerine 25 µl SDS 10% ilave edildi
- 13- Üzerine 25 µl proteinase K (10 mg/ml) ilave edildi
- 14- İyice vortekslendi
- 15- 2 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı
- 16- 25 µl de proteinase K ve 37°C de tekrar bütün gece inkübasyona bırakıldı

- 17- Elde edilen dijesyon ürünü 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı
 - 18- Tüplere 500 µl fenol–kloroform ilave edildi
 - 19- İki fazın birbiriyle iyice karışmasını sağlamak için iyice vortekslendi
 - 20-10 dakika 3000 rpm de 25 °C de santrifüj yapıldı
(Hermle marka Z 33 MK-2 model)
 - 21- Üstteki kısmı alınarak yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı
 - 22- Tüplere 500 µl fenol-kloroform ilave edildi
 - 23- 10 ve 11 basamakları tekrarlandı
- Buraya kadar yapılan işlemler sonucunda Proteinaz K tarafından parçalanmış çekirdek zarı ve proteinlerden açığa çıkan DNA fenol kullanılarak bu protein artıklarından temizlenmiş oldu.
- 24- Üstteki kısmı alınarak yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı
 - 25- Üzerine 500 µl kloroform/isoamilalkol (24:1) ilave edildi
 - 26- 10 ve 11. basamaklar tekrarlandı
- Kloroform uygulaması ile fenolün etkisi giderildi (kloroform proteinlerle reaksiyona girer ve ortamda köpük oluşturur). Köpüğün engellenmesi için karışıma izoamilalkol eklenerek yüzey gerilimi azaltıldı.
- 27- Üstteki kısmı alınarak yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı
 - 28- Üzerine 50 µl NaAc 3M (ph 5.2) ilave edildi
 - 29- Üzerine 1 ml %100'lük etanol (-20°C) ilave edildi
 - 30- DNA yumakçığı görünür hale getirmek için tüp birkaç defa yavaş bir şekilde alt yüz edilerek karıştırıldı.
 - 31- DNA yumağı pipet ucu yardımıyla yakalandı ve 200 µl T10E1 (PH 7.5) olan mikrosantrifüj tüpünün içine dikkatlice bırakıldı
 - 32- Mikrosantrifüj tüpü hafifçe vortekslendi ve tüp içerisindeki peletin çözülmesi için oda ısısında bir gece bekletildikten sonra 4°C'de saklandı.
- Tüpler alt üst edildiğinde DNA yumakçığı görülmediği durumlarda 3000 rpm de 30 dakika 4°C'de sentrifuj yapıldı. Daha sonra tüpteki etanol uzaklaştırılarak üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edildi ve 10 dakika 3000 rpm de sentrifüj yapıldı ve sonrasında etanol uzaklaştırıldı ve mikrosantrifüj tüpleri yatay olarak oda ısısında kurumaları için bırakıldı. Ertesi gün üzerine 100 µl T10E1 ilave edildi.

DNA izolasyon işleminin başarılı olup olmadığını kontrol etmek için örneklerden 2 µl alınarak %1'lik agaroz jelde 15 dakika elektroforez yapıldı. Elektroforez sonunda, DNA

izolasyonu başarılı ise ultra-viyole ışık veren görüntüleme sehpasında, örneklerin yüklendiği kuyucuklarda flüoresan parıldama gözlemlendi.

DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar ve hazırlanış formülleri;

0,1 M EDTA pH:7,5

32.03 g EDTA Na₂ (Biobasic DB185)

800 ml distile H₂O ile çözdürülür

pH, NaOH ile ayarlandıktan sonra distile H₂O ile 1 litreye tamamlanır

Otoklavda sterilizasyondan sonra 4°C'de saklanır

NDB

25 ml NaCl 3 M

250 ml EDTA 0.1 M

Distile H₂O ile 1 litreye tamamlanır

Otoklavda sterilizasyondan sonra 4°C'de saklanır

NaAc 3M pH: 5,2

408.1 g NaAc.3H₂O

500 ml distile H₂O ile çözdürülür

pH glasyal asetik asit ile ayarlandıktan sonra distile H₂O ile 1 litreye tamamlanır

Otoklavda sterilizasyondan sonra oda ısısında saklanır

SDS %10 (100 ml)

10 g SDS (Biobasic DB0485)

90 ml distile H₂O ile 60°C de çözününceye kadar ısıtılır

pH konsantre HCl ile 7.2'ye ayarlanır distile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

1 M Tris-HCl pH:8

121.2 g Trisbase (Biobasic DB0103)

840 ml HCl 1N

pH, HCl ile 7.5'e ayarlandıktan sonra distile H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

Otoklavda sterilizasyondan sonra 4°C'de saklanır

Kloroform/İzoamilalkol 24:1

960 ml kloroform

40 ml izoamilalkol

T10E10

10 ml 1 M Tris HCl (pH: 8)

100 ml EDTA 0.1 M (pH 8)

Distile H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

Otoklavda sterilizasyondan sonra oda ısısında saklanır

T10E1

10 ml Tris HCl 1 M (pH: 8)

10 ml EDTA 0,1 M (pH 8)

Distile H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

Otoklavda sterilizasyondan sonra oda ısısında saklanır

Polimeraz Zincir Reaksiyon Tekniği (PCR)

PCR karışımı genomik DNA hariç her bir örnek için 20 µl olarak hesaplandı. PCR karışımı, karışım hazırlanırken kullanılan reaktiflerin kimyasal özelliklerinde bir değişme olmasını önlemek için buz üzerinde hazırlandı. Genomik DNA dışındaki tüm reaktiflerin içinde bulunduğu PCR karışımı, bir seferde 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içinde hazırlandı. Bu karışımdan her bir örnek için 20 µl alınarak daha önce etiketlenerek buz üzerine yerleştirilen 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldı.

Hazırlanan PCR stok karışımı 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra incelenecek örneklere ait DNA'dan 5 µl alınarak bu karışım üzerine eklendi. Genomik DNA da eklendikten sonra, her bir örnek için hazırlanan PCR karışımları otomatik pipetle ayrı ayrı 2–3 kez karıştırıldı. Daha sonra mikrosantrifüj tüplerinin kenarlarına yapışmış olan kısmı dibe çöktürmek için kısa bir santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda içinde örneklerin bulunduğu tüpler daha önce 94°C'ye ısıtılmış olan Thermo® Flexigene marka 96 örnek kapasiteli ısı düzenleme aletine yerleştirildi.

PCR Reaksiyonunda Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Bugüne kadar yapılmış olan PCR uygulamalarına yönelik çalışmalar ve PCR tekniğinin kullanılma amaçları incelendi. Bu grup çalışmalar içerisinde reaktiflerin değişik oranları kullanılarak en iyi sonuçlar alınmış olan miktar ve oranlar denendi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda kullanılan kimyasal maddeler (Takara Bio Inc.) ve miktarları aşağıda verildi (ürün kodları parantez içerisinde gösterildi).

Taq Polimeraz Enzimi (Takara R001BM): 5 U/µl stok çözeltisinden her örnek için 0.5 U enzim kullanıldı.

10 X Reaksiyon Çözeltisi (Takara R001BM): Hazır kullanma çözeltisi (10 mM Tris, 50 mM KCl) kullanıldı.

MgCl₂ Çözeltisi (Takara R001BM): Hazır karışım 25 mM kullanma çözeltisi kullanıldı.

dNTP'ler (Biobasic D0057): dNTP karışımından (her biri 0.2 µmol miktarında dATP, dGTP, dTTP ve dCTP içeren 10 mM'lık çözelti) 125 mM yoğunlukta sulandırıldı.

Primer'ler (Biobasic PAGE, 200µMOL): İlgili firmaya 0.2 µM olarak sipariş verildi ve distile su ile 200 ng/ µl yoğunlukta kullanma çözeltisi hazırlandı.

Test F2: 5' – CCA GAG GAC AAT AGC AAA GCA AA – 3'

TestR15: 5' – CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT CAA CAC GGT C – 3'

PCR reaksiyonunda, ince duvarlı (ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirgenmesi için), DNAase ve RNAase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 ml'lik mikrotüpler kullanıldı.

- dNTP karışımı
- Primer Test F2
- Primer Test R15
- 0,5 U Taq Polimeraz enzimi (5U/µl stok çözeltiden)
- 10X Reaksiyon Çözeltisi
- Bidistile H₂O

Bu PCR karışımının üzerine; örnek genomik DNA'sından 5 µl ilave edilerek her örnek için toplam 25 µl'lik PCR karışımı hazırlandı.

Çalışma kolaylığı nedeniyle PCR işlemi daima 15 örnekle çalışıldı. Buz üzerinde hazırlanan PCR karışımı, 95°C'ye ısıtılan tüpler Thermo Flexigene marka ısı düzenleme aletine yerleştirildi. Kapak kapatıldıktan sonra PCR işlemi başlatıldı.

PCR işleminde, hazırlanan ve 0.2 ml'lik mikrosantrifüjlere dağıtılan PCR karışımları önce 95°C'de 5 dakika tutuldu. Bu süre sonunda her bir döngüsü;

94°C 1 dakika

57°C 1 dakika

72°C 1 dakika,

şeklindeki üç farklı ısı derecesinde birer dakika tutulacak şekilde 33 döngü yapıldı. Son döngüden sonra örnekler, 72°C'de 5 dakika tutularak PCR işlemi tamamlandı. Isı düzenleme aletinden çıkartılan PCR ürünleri kısa bir süre santrifüj yapıldı. Daha sonra, doğrudan elektroforez uygulanarak PCR'nin başarılı olup olmadığı belirlendi. PCR'nin başarılı olduğu PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesme işleminde kullanılmak üzere 4°C'de saklandı.

Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez çözeltisi olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) kullanıldı. Elektroforez çözeltisi önce 10X yoğunlukta stok solüsyon olarak hazırlandı. Hazırlanan bu stok solüsyonu 0,5X seyreltilerek kullanıldı. Stok solüsyon hazırlanırken 108g Tris base, 55.5g Borik asit; 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) 1 litre distile suda çözdürülerek koyu renkli şişelerde oda ısısında saklandı. Kullanılacağı zaman alınan bir ölçek stok solüsyonu, distile su ile 10 katı sulandırılarak kullanma solüsyonu hazırlandı. Bu kullanma solüsyonu hem jelin hazırlanmasında hem de elektrolit çözeltisi olarak kullanıldı.

Jelin hazırlanması için 150 ml, elektrolit çözeltisi olarak da 750 ml 0.5X TBE kullanma solüsyonu kullanıldı. Elektroforez tankında bulunan elektrolit solüsyonu her elektroforezde değiştirildi.

Agaroz Jel'in Hazırlanması

Çalışmada jelin hazırlanmasında Biobasic marka D0012 katalog numaralı agaroz kullanıldı. Agaroz jel %2 yoğunlukta hazırlandı. Bu amaçla 3 g agaroz tartularak 250 ml'lik erlenmayere konuldu. Tartılan bu agarozun üzerine 150 ml 0.5 X TBE çözeltisi eklendi. Hazırlanan agaroz jelin homojen bir karışım olması mikrodalga fırında 4 dakika tutuldu. Daha sonra, şeffaflaşan agaroz jel üzerine ethidium bromide (10 mg/ml) 0.5 µg/ml oranında katıldı. Ethidium bromide'in agaroz jel içinde homojen dağılmasını sağlamak amacıyla karışım hafifçe sallanarak karıştırıldı. .

Agaroz Jel'in Dökülmesi

Çalışmada, elektrotları arasındaki uzaklık 15 cm olan Biometra® Agagel Mini marka elektroforez tankı kullanıldı. Hazırlanan agaroz jel, boyutları 9 x 6.5 x 1.5 cm ve ultra-viyole ışık geçiren jel teknesine döküldü. Örneklere ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilmesi hedeflenen 190 bp'lik bantların varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk elektroforezde 16 dişli jel tarağı kullanıldı. Bu ilk elektroforez sonunda 190 bp'lik bandın elde edildiği PCR ürünlerinin, restriksiyon enzimi ile kesilme işleminden sonra varsa *FecB* taşıyıcı veya homozigot *FecB* bireylerin belirlenmesi amacıyla yapılan ikinci elektroforezde ise 15 diş örnekler için ve bir diş de DNA standartının yüklenmesi için olan toplam 16 dişli tarak kullanıldı. Agaroz jel tekneye, hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldükten sonra jel tarağı yerleştirildi ve jelin katılaşması beklendi. Agaroz jelde hava kabarcığının kaldığı durumlarda, kullanılmamış steril bir pipet ucu yardımı ile bu hava kabarcığı jelin taraktan en uzak tarafına doğru çekilerek örneklerin yükleneceği kuyulardan uzaklaştırıldı. Katılaşıp opak bir görünüm alan jelden tarak, jeli yırtmamak için dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve jelin üstünü tamamen örtecek kadar elektrolit çözeltisi eklendi.

Örneklerin Kuyulara Yüklenmesi

PCR sonunda elde edilen ürünler kuyulara yüklenirken önce 2 cm eninde 4 cm uzunluğunda parafilm kesildi. Bu parafilm üzerine, kuyulara yüklenecek örnek sayısı kadar yükleme çözeltisi (loading buffer), her örnek için 2'şer µl olacak şekilde otomatik pipetle konuldu. Parafilm üzerine konan 2 µl yükleme çözeltisinin üzerine örneklere ait

PCR ürünlerinden 10 µl eklenerek otomatik pipetle karıştırıldı, kuyulara yüklendi. En son kuyuya da PCR ürünlerinden elde edilecek bantların belirlenmesi için 100 bp'lik (BioGen) standart DNA standartı (DNA ladder) yüklenerek elektroforez işlemi başlatıldı. Elektroforez, 90 dakika 100 volt elektrik gerilimi uygulanarak yapıldı.

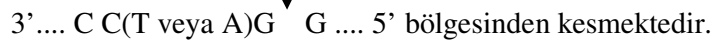
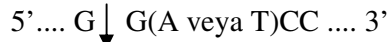
Bantların Gözlenmesi ve Fotoğraf Çekimi

Elektroforez sonunda jel teknesi üzerindeki jel ile birlikte tanktan alınarak jel görüntüleme sisteminin kabinine yerleştirildi. Görüntüleme sisteminin ultra-viyole ışığı açılarak önce aranan 190 bp uzunluğundaki tek band jelde görüldü ve sonra bantların bulunduğu jelin görüntüsü alındı. Çıplak gözle bakıldığında jel görüntüleme sehpasında pembe flüoresan renk veren bantlar, görüntüleme sisteminin ekranında siyah-beyaz olarak görüntülendi. Elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezi sonunda PCR'nin başarılı olduğu örneklerden 190 bp'lik tek bir bant elde edildi. Bu tek bantın elde edildiği örneklere ait PCR ürünleri daha sonra *Ava II* restriksiyon enzimi ile kesilerek, incelenen örneklerin *Fec B* durumlarının belirlenmesinde kullanıldı.

***Ava II* Restriksiyon Enzimi ile PCR Ürünlerinin Kesilmesi**

Elektroforez sonunda 190 bp'lik bantların elde edildiği örneklere ait PCR ürünleri *Ava II* restriksiyon enzimi ile kesildi. Çalışmada, Takara firmasının 10 ünite/µl konsantrasyonundaki 100 ünitelik *Ava II* E601BC katalog numaralı restriksiyon enzimi kullanıldı.

Bu enzim DNA'yı



Ava II restriksiyon enzim kesimi her bir örnek için:

<i>Ava II</i>	1 µl
10 X Buffer	3 µl
Bidistile H ₂ O	16 µl kullanılmıştır.

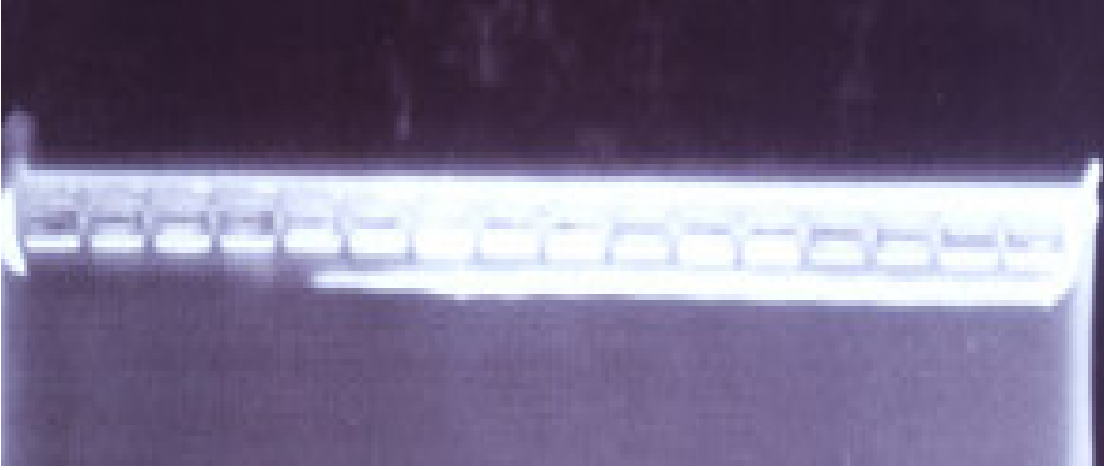
Restriksiyon enzimi ile kesim işlemi, bir örnek için toplam hacmi 20 µl olacak şekilde hazırlanan karışım üzerine, 190 bp'lik bantların görüldüğü PCR ürününden 10 µl eklenerek yapıldı. Restriksiyon enzimi ile kesme işlemi her seferinde 1 örnek işlenecek

şekilde buz üzerinde yapıldı. Bu amaçla etiketlenmiş olan 0.2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri buz üzerine yerleştirildi. Her bir örnek için gerekli olan restriksiyon karışımı buz üzerindeki 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı ve 0.2 ml'lik mikrosantrifüjlere 20'şer µl dağıtıldı. Bu şekilde hazırlanan tüpler Thermo Flexigene marka ısı düzenleme aletine yerleştirildi.

Isı düzenleme aletine yerleştirilen örnekler, 37°C'de 16 saat tutuldu. Bu sürenin sonunda elde edilen ürünler yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan %3.5'lik jelde elektroforez yapıldı. Örnekler kuyulara yüklenirken önce *Ava II* enzimini inaktive etmek amacıyla enzime ait 10 X yükleme çözeltisi (loading buffer; %1 SDS, %50 Gliserol, %0,95 Bromofenol Blue), her örnek için 1/10 oranında olacak şekilde otomatik pipetle parafilm üzerine konuldu. Parafilm üzerine konan 1 µl yükleme çözeltisinin üzerine örnekler için PCR ürünlerinden 10 µl eklenerek otomatik pipetle karıştırıldı ve kuyulara yüklendi. En son kuyuya da elde edilecek bantların belirlenmesi için 100 bp'lik (BioGen) standart DNA standartı yüklenerek elektroforez işlemi başlatıldı. Elektroforez, 90 dakika 100 volt elektrik gerilimi uygulanarak yapıldı. Elektroforez, jel üzerinde örneklerin ilerleyişi izlenerek bu sürenin sonunda sonlandırıldı ve tanktaki jel, jel teknesi ile birlikte tanktan çıkarılarak ultra-viyole ışık veren jel görüntüleme sehpasında incelendi. Bu son elektroforezde, homozigot normal bireylerde 190 bp'lik tek bant, *FecB* taşıyıcılarda ise 190 ve 160 bp'lik iki bant ve homozigot *Fec B* bireylerde ise 160 bp'lik tek bant olmak üzere iki bandın görülmesi amaçlandı. Elektroforez sonunda yine yukarıda belirtildiği gibi jelin görüntüsü alınarak sonuçlar kayıt edildi.

BULGULAR

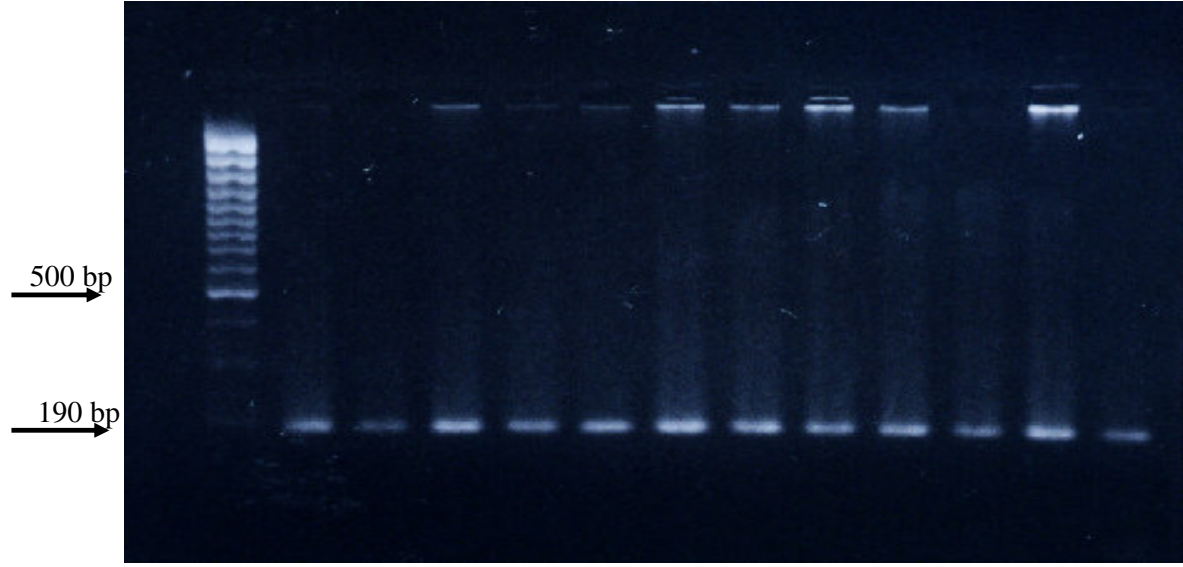
Uygulanan fenol-kloroform DNA izolasyon protokolü ile toplam 388 baş Sakız ırkı damızlık koç, damızlık adayı erkek toklu, damızlık koyun ve damızlık adayı dişi toklu, kuzu ve 18 baş Sakız X Kıvırcık melezi koyunlara ait kan örneklerinden DNA izole edildi. DNA izolasyonunun başarısı, izole edilen DNA'ların %1'lik agaroz jelde 15 dakika elektroforezi sonunda jeldeki ethidium bromide ile birleşen DNA'ların flüoresan parıldama vermesi ile doğrulandı (Şekil 2).



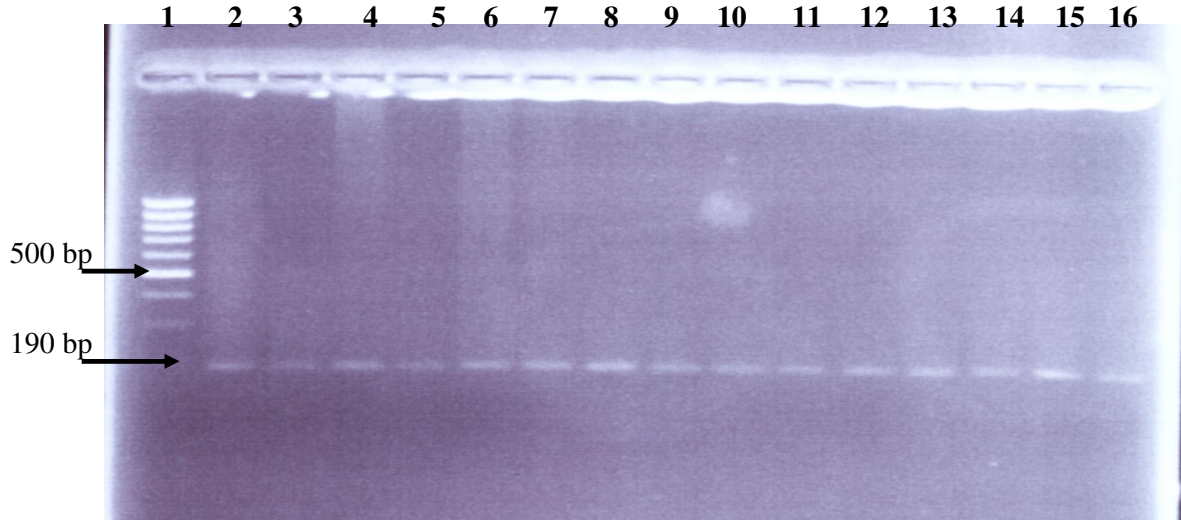
Şekil 2: Fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen örneklere ait DNA'ların %1'lik agaroz jelde ki görünümleri.

Örneklere ait kanlardan elde edilen DNA'lar ile yapılan PCR işleminin başarısı, PCR sonunda elde edilen ürünlerin %2'lik agaroz jel elektroforezlerinde 190 bp'lik tek bandın görülmesi ile doğrulandı. Elde edilen 190 bp'lik bantlar elektroforez sonunda, jelin ultraviyole ışık veren jel görüntüleme sehpası üzerine konulduğunda çıplak gözle kolaylıkla saptandı. Daha sonra PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezlerinin fotoğrafları da çekildi.

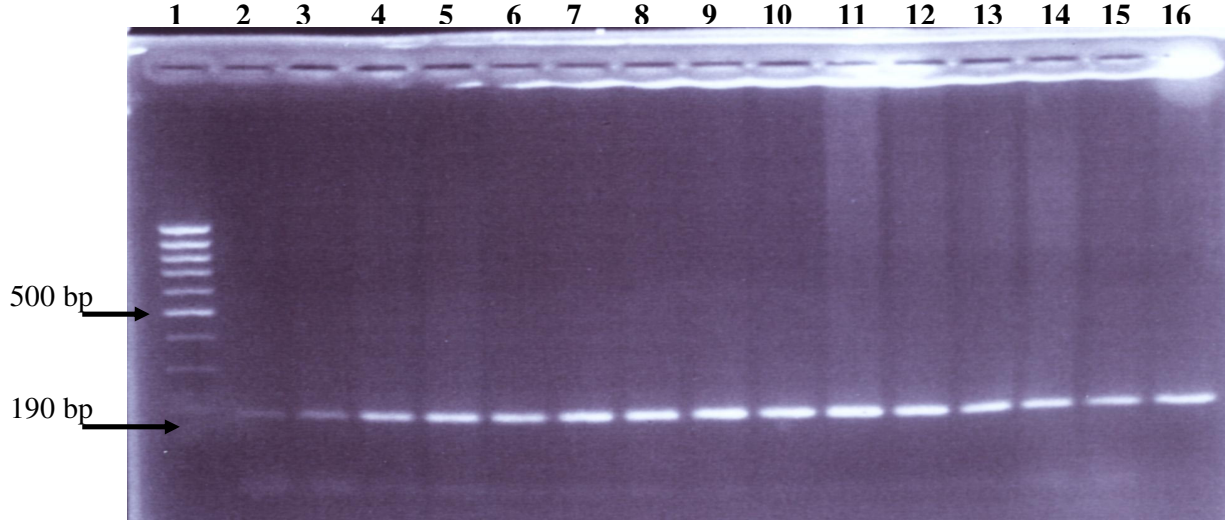
PCR sonunda elde edilen ürünlerin, %2'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda kullanılan örneklere ait 190 bp'lik bantlar Şekil 3- 5'de görülmektedir.



Şekil 3: Fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen örneklere ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin %2'lik agaroz jel elektroforez görünüşleri. Soldan-sağa jele yüklenen örnekler: 100 bp'lik DNA standartı ve Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Sakız koyunlara ait bazı örnekler

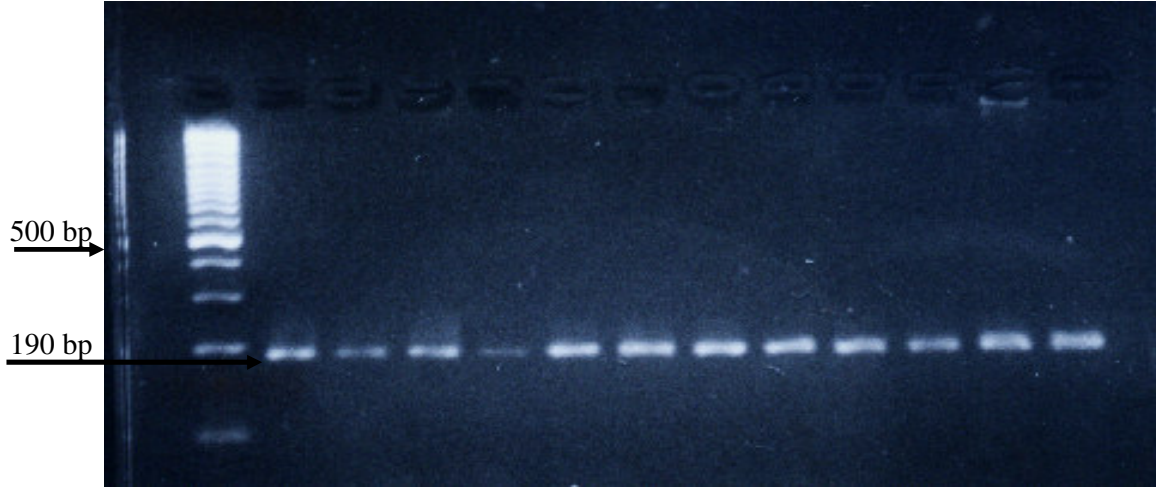


Şekil 4: Fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen örneklere ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin %2'lik agaroz jel elektroforez görünüşleri. Soldan-sağa jele yüklenen örnekler: 1: 100 bp'lik DNA merdiveni, 2-6:İzmir Çeşme'de, 7-16: Urla'da yetiştirilen Sakız koyunlara ait bazı örnekler

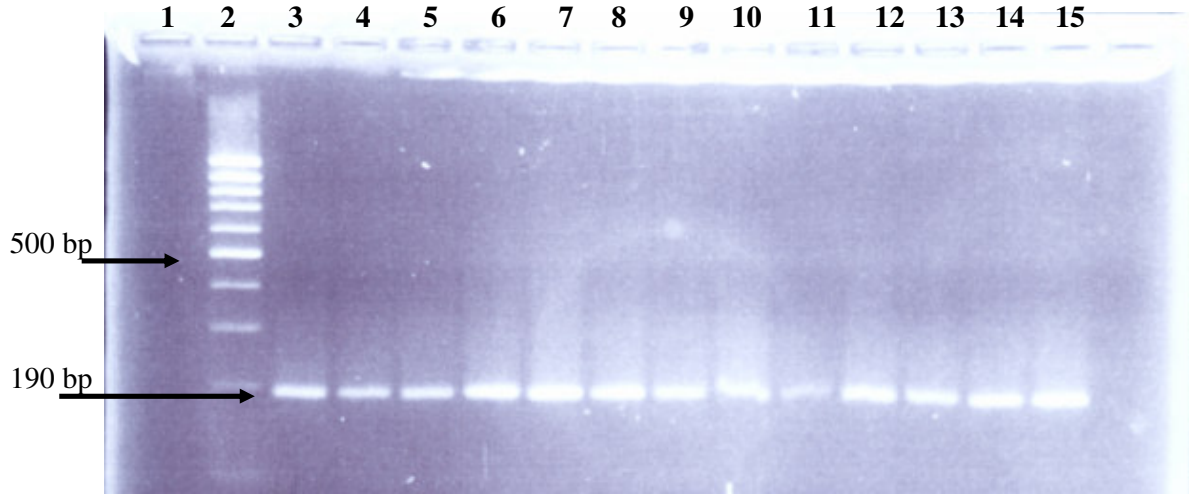


Şekil 5: Fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen örneklere ait DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonunda elde edilen ürünlerin %2'lik agaroz jel elektroforez görüntümleri. Soldan-sağa jele yüklenen örnekler: 1: 100 bp'lik DNA standartı, Çanakkale Ayvacık'ta yetiştirilen Sakız koyunlara ait bazı örnekler

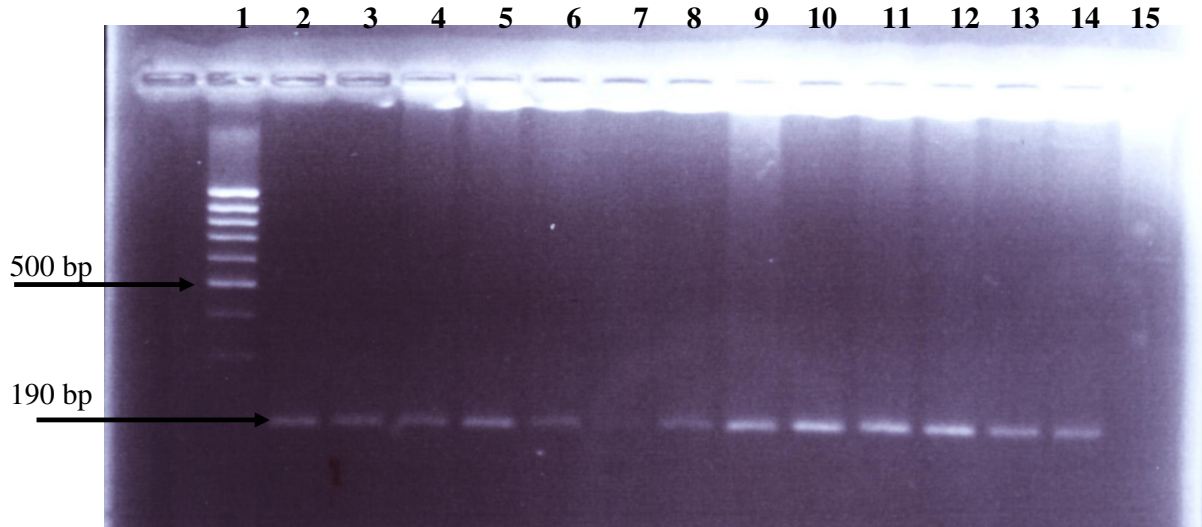
PCR sonunda 190 bp'lik bantların elde edildiği örneklere ait PCR ürünleri, *Ava II* endonükleaz restriksiyon enzimi ile kesilerek % 3.5'lik agaroz jelde elektroforez yapıldığında Şekil 6-8'de görülen sonuç elde edildi.



Şekil 6: *Ava II* endonükleaz enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin % 3.5'lik agaroz jel elektroforezi sonucu Fec B açısından genetik yapılarının belirlenmesi: Soldan-sağa örneklerin sıralanması, 100 bp'lik DNA standartı, Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen Sakız koyunlara ait bazı örnekler



Şekil 7: *Ava* II endonükleaz enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin % 3,5'lik agaroz jel elektroforezi sonucu *Fec B* açısından genetik yapılarının belirlenmesi: Soldan-sağa örneklerin sıralanması 1: *Ava* II ile kesilen genomik DNA, 2: 100 bp'lik DNA Standartı, 3-6:İzmir Çeşme'de, 7-15: Urla'da yetiştirilen Sakız koyunlara ait bazı örnekler



Şekil 8: *Ava* II endonükleaz enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin % 3.5'luk agaroz jel elektroforezi sonucu *Fec B* açısından genetik yapılarının belirlenmesi: Soldan-sağa örneklerin sıralanması 1: 100 bp'lik DNA standartı, 2-14: Çanakkale Ayvacık'ta yetiştirilen Sakız koyunlara ait bazı örnekler, 15: *Ava* II ile kesilen genomik DNA,

İncelenen 418 örnekten elde DNA'lar ile yapılan PCR işlemi sonunda tüm örneklerden 190 bp'lik bant elde edildi. Bu PCR ürünlerinin *Ava* II restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda incelenen örneklerin hiçbirinin *FecB* taşıyıcısı olmadığı belirlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye’de yetiştirilen koyun ırklarından biri olan Sakız ırkı çoklu doğurma özelliğine sahip sütçü bir ırktır (1). Genelde bir batında 2 veya 3 yavru doğuran bu koyun ırkında bir batında 4, 5, 6 veya 7 kuzu doğuran koyunlara da sıklıkla rastlanmaktadır (1, 29-32). Sakız ırkının bu çoklu doğurma özelliği; bu ırkın da diğer ırklarda çoklu doğuma neden olan genleri ya da bu genler ile ilişkili olabilecek başka genleri taşıma olasılığını güçlendirmektedir. Fakat günümüze kadar Türkiye’de yetiştirilen Sakız ırkında çoklu doğuma neden olan genlerin moleküler düzeyde belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan bu çalışmada Türkiye’de yetiştirilen 388 adet Sakız ve 18 adet Sakız X Kıvrıcık melezi olmak üzere toplam 406 baş koyunda *Fec B* alleli PCR-RFLP yöntemi ile aranmış, ancak çalışılan materyallerin hiçbirinde bu allele rastlanılmamıştır.

Fec B allelini taşıyan hayvanların ebeveyn kayıtlarına ihtiyaç duymadan sadece DNA kullanılarak kesin olarak belirlenmesine yönelik çalışmalar 1993 yılından itibaren hız kazanmıştır (10-12, 84). Yeni Zelanda’da AgResearch, Fransa’da INRA ve İskoçya’da Edinburg Üniversitesi’nde çalışan araştırma grupları Booroola genini taşıyan koyunların ovaryumlarında etkili olan *BMPR-IB* reseptöründe bir mutasyon olduğunu 2001 yılında belirlemişlerdir (10–12). Wilson ve arkadaşları (12) yaptıkları çalışmada *BMPR-IB* geninde *Fec B*’yi belirlemek amacı ile Booroola ve normal koyunlarda cDNA’nın sekans analizinde bir nokta mutasyonu belirlemişlerdir. Sürüde bu nokta mutasyonunu belirlemek amacı ile PCR ürünüde *Ava II* restriksiyon bölgesini içeren Test F2 ve Test R15 primerleri geliştirilmiştir. *Ava II* ile yapılan kesim sonrasında homozigot *Fec B* hayvanlarda 110 bp’lik tek bir bant, heterozigot *Fec B* hayvanlarda 110 bp’lik ve 140 bp’lik iki bant ve homozigot normal hayvanlarda 140 bp’lik tek bir bant belirlenmiştir. Bu genin belirlenmesi ve %100 doğru sonuç veren DNA testinin geliştirilmesi sonucunda (12, 74) ebeveyn kayıtlarına gereksinim kalmamıştır.

Bu tarihten itibaren çeşitli ülkelerde yetiştirilen ve yüksek dölverimine sahip olan koyun ırklarında dölveriminden sorumlu olabilecek genlerin aranmasında öncelikle *Fec B* allelinin varlığı test edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre farklı kromozomlar üzerinde araştırmalara devam edilmiştir (74, 86).

Davis ve arkadaşları (74) ilk olarak 2002 yılında sekiz ülkenin dölverimi yüksek olan ırklarında Booroola mutasyonunu araştırdıkları çalışmalarında Cambridge, Thoka, Javanese, Olkuska, Belclare, Lacaune, Woodlands ve Garole (Bengal) koyun ırklarını kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada kullandıkları protokole yapılan PCR ile Booroola koyunlarında Test F12 ve Test R15 primerlerini kullanarak 140 bp'lik bir bant, diğer koyun ırklarında ise geliştirdikleri Test F2 ve Test R15 alternatif primerleri kullanarak 190 bp'lik bir bant elde edilmiştir. Elde edilen bu ürünlerin *Ava* II enzimi ile kesilmesinden sonra yapılan %3.5'lik agaroz jel elektroforezi sonunda: Booroola Merinosunda, homozigot *Fec B* bireylerde 110 bp'lik tek bir bant, heterozigot *Fec B* bireylerde 140 ve 110 bp'lik iki bant ve taşıyıcı olmayanlarda ise 140 bp'lik bir bant; Garole ve Javanese ırklarında ise homozigot *Fec B* koyunlarda 160 bp'lik tek bir bant, heterozigot koyunlarda 190 ve 160 bp'lik iki bant ve taşıyıcı olmayan bireylerde ise 190 bp'lik tek bir bant belirlenmiştir (74). Buna göre çalışmada kullanılan Javanese ve Garole ırkları *Fec B* taşıyıcısı olarak belirlenirken Cambridge, Thoka, Olkuska, Belclare, Lacaune ve Woodlands ırklarında mutasyon gözlenmemiştir (74).

Sakız koyun ırkında yapılan bu çalışmada ise Test F2 ve Test R15 primerleri kullanılmış ve PCR ürünleri *Ava* II restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra %3.5'lik agaroz jel elektroforezi sonucunda tüm örneklerde 190 bp'lik tek bant görülmüştür. Dolayısıyla kullanılan materyallerin hiçbirinin *Fec B* alleline sahip olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalar, *Fec B* allelinin zaman içinde aralarında genetik bir bağ kurulan koyun ırklarında belirlendiğini desteklemektedir.

Davis ve arkadaşları (74) tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada bu genin orijininin Hindistan'ın güneyinde yetiştirilen Garole koyun ırkından geldiği ileri sürülmüştür. Bengal koyunu olarak da adlandırılan Garole koyunu 1792 yılında Avustralya'ya getirilmiştir ve büyük ihtimalle Booroola Merinosu, Garole koyununun yetiştiricilikte kullanılması ile ortaya çıkmıştır. Endonezya'da yetiştirilen ve dölverimi yüksek olan Javanese koyununda önceleri *Fec J* (61) olarak adlandırılan genin ise Davis ve arkadaşları (74) tarafından yapılan çalışma sonucunda Booroola geni olduğu belirlenmiştir.

Fec B mutasyonunun Mongol koyunundan köken alan ve Çin’de yetiştirilen Hu ve Han koyunlarında da bulunması sonucu mutasyonu taşıyan koyun ırkı sayısı 5’e yükselmiştir (112). Mutasyonun Garole (74) ve Hu (112) koyun ırklarında sabitken Booroola, Javanese ve Han koyunlarında segregasyon gösterdiği belirlenmiştir. Garole ve Hu koyun ırkları fenotipik olarak birbirlerinden çok farklı olsalar da her iki ırkta da kulaksız fenotiplere rastlanması aralarında genetik bir bağ olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanısıra Bengal’de yetiştirilen Garole ile Çin’de yetiştirilen Hu koyunlarının her ikisinin de ipek yolu üzerinde bulunmaları bu savı desteklemektedir (112)

Sakız koyununun orijini ise Sakız adasıdır. Bu ırkın Sakız adasında bulunan lokal bir ırk ile Anadolu ve Trakya’da yetiştirilen Kıvırcık ve Dağlıç ırkları arasındaki melezlemelerden köken aldığı ileri sürülmüştür (32) ancak yine de Sakız koyununun orijini hakkında kesin bir bilgiye rastlanmamıştır.

Sakız koyun ırkında *Fec B* allelinin bulunmasına yönelik 1 çalışma bulunmakta ve çalışmada kullanılan hayvan sayısı oldukça azdır (112).

Dünya’da yetiştirilen dölverimi yüksek çeşitli koyun ırklarında *Fec B* ve *Fec X* mutasyonlarını araştırmak üzere 13 farklı ülkede yetiştirilen dölverimi yüksek 21 tane koyun ırkı ve hattında 2006 yılında Davis ve arkadaşları (112) tarafından yapılan çalışmada kullanılan koyunların ırkı, yetiştirildiği bölge ve kullanılan hayvan sayıları Tablo 3’de verilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan koyun ırklarının orijinlerine bakıldığında Hu ve Han ırkları dışındakilerin çok farklı bölgelerden varyasyon fark etmeksizin seçtikleri gözlenmektedir. Dolayısıyla Hu ve Han koyun ırkları için kullanılan materyal sayısı, orijin, genetik bağlantı, Garole koyun ırkı ile özellikle Hu koyunu arasındaki akrabalık göz önüne alındığında yeterli olarak kabul edilebilirse de, diğer ırklar için kullanılan sayı ve örnekleme yöntemi kesin bir sonuca varmak için zayıf kriterler olarak nitelendirilebilir. Dolayısıyla Türkiye’de yetiştirilen Sakız koyunları ile yapılan bu çalışma, gerek materyal sayısını fazlalığı gerekse örneklemenin farklı sürülerden yapılması, Sakız X Kıvırcık ve Kıvırcık X Merinos melezlerinin kullanılarak bir varyasyon yaratılması nedeniyle Sakız koyunlarında *Fec B* allelinin olmadığı yönünde daha kuvvetli kanıtlar sunmaktadır.

Tablo 3: Davis ve arkadaşları (112) tarafından yapılan çalışmada kullanılan koyunların ırkı, yetiştirildiği bölge ve kullanılan hayvan sayıları

Koyun ırkı	Yetiştirildiği Ülke	Kullanılan Hayvan Sayısı
Hu	Çin	12
Han	Çin	12
Romanow	Almanya	12
Lleyn	Galler	16
Siyah Dağ koyunu	Almanya	8
Beyaz Dağ koyunu	Almanya	8
Alman beyaz başlı	Almanya	15
D'Man	Fas	15
Loa	İzlanda	12
Teeswater	İngiltere	12
Sakız	Kıbrıs	12
St. Croiz	ABD	2
Barbados Blackbelly melezleri	ABD	7
Leicester	İskoçya	12
Trolian Dağ Koyunu	Avusturya	11
Fin Koyunu	İrlanda	21

Booroola Merinosu homozigot *Fec B/FecB* koyunlarda ve yüksek ovulasyon oranına sahip Sakız koyunlarında yapılan histolojik çalışmalar her iki ırkta da ovaryumlarda küçük folliküller ve daha az sayıda granüloza hücresinin olduğunu kanıtlaya da (94, 113) ovaryum fizyolojisi üzerinde yapılan çalışmalar Sakız koyun ırkında ovulasyon üzerinde olası *Fec B* allel etkisinin varlığını kanıtlar nitelikte değildir. Çünkü Campbell ve arkadaşları (95) *Fec B* mutasyonunun ovulasyonu artırıcı yöndeki etkisinin ovaryuma uygulanan gonadotropin stimülasyon düzeyinden çok bu stimülasyona karşı ovaryumdaki cevabı değiştiren mekanizmaların etkilenmesinden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Oysa Sakız koyunları ile yapılan çalışmalarda özellikle Avdi'nin belirttiği gibi yüksek ovulasyon oranı olan Sakızlarda FSH anahtar rolü oynamaktadır (113).

Bunun yanı sıra ovulasyon oranı üzerindeki genetik kontrol *Fec B* taşıyıcılarında tek bir gen ile sağlanırken Sakız koyunlarında poligenik olabilir (113). Ayrıca Sakız koyun ırkında çoklu doğuma neden olabilecek bir ya da birden fazla farklı major genlerin varlığı

da söz konusu olabilir. Nitekim Sakız koyunu dışındaki çeşitli ırklarda farklı kromozomlar üzerinde farklı genlerin varlığı belirlenmiş ancak bu genlerin bu kromozomlar üzerinde buldukları bölgeler henüz tam olarak belirlenememiştir (86). Ayrıca *Fec B* mutasyonunun görüldüğü ırklarda bu mutasyona sahip olmayan bazı bireylerin yüksek dölverimine sahip olması dikkat çekicidir, örneğin, Han koyununda *Fec B*'ye sahip olmayan koyunların yavru sayılarının yüksek olması bu ırkta yüksek dölverimine neden olabilecek başka genlerin de mevcut olabileceğini düşündürmüştür (112).

Koyunlarda dölverimini artıran major genlerin belirlenmesine ve bunlardan yararlanmasına yönelik çalışmalara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Geliştirilen DNA testleri, bu genlerin koyun yetiştiriciliğinde kullanımı ve dünya genelinde yüksek dölverimine sahip ırklar arasındaki genetik mesafenin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu genlerin kalıtım şekilleri ve ovulasyon oranı üzerindeki etkileri de birbirinden oldukça farklıdır. Garole koyununda bazı homozigot taşıyıcıların bir batında maksimum yavru sayısının 2 olması (86) ve Deccani koyunu ile melezleme yapıldığında genin tek bir kopyasını taşıyan heterozigot koyunlarda yavru sayısında sadece 0,5 artış göstermesi mevcut genin etkisinin aktarıldığı ırkın özelliklerine göre farklılık gösterebileceğini düşündürmüştür (61).

Suni tohumlama ve embriyo transferi programları sayesinde Booroola ve Inverdale genlerinin çeşitli ülkelerdeki koyun ırklarına aktarımı başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Ticari firmalar tarafından bu genler DNA düzeyinde belirlenebilmektedir. Yakın gelecekte ovulasyon oranı üzerinde daha az etkiye sahip olan diğer dölverimi genleri de tanımlanacak ve bunları belirlemeye yönelik markır testleri geliştirilecektir. Tüm bu gelişmeler sayesinde birçok değişik ırkta uygulanan yetiştirme programlarında dölverimi için major genlerden yararlanma daha da artacaktır. Özellikle yetiştiriciler değişik ırklarda dölverimi yönünden major genleri taşıyan, DNA testine tabi tutulmuş koçlar arasında kendi yetiştirme koşullarına en uygun ve istedikleri oranda etkiyi sağlayacak olanları seçebileceklerdir. Bu genleri taşıyan hayvanların yetiştiricilikte kullanılması ile işletmede sıfat döneminde flushing uygulamasına gerek kalmadan yavru oranında bir artış olacağından işletmenin yem giderlerinin düşürülmesi açısından da fayda sağlayacaktır.

Sakız koyun ırkında yüksek dölveriminin nedenlerini araştırma yönünde bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda, öncelikle düzenli kayıtların tutulduğu özellikle de çalışılan

Sakız sürülerindeki ovaryum yapısı ve ovulasyon oranlarının bu kayıtlara eklendiği sürülerin oluşturularak mevcut olan hayvan sayısının artırılması, bu veriler yardımıyla olası gen veya genlerin bulunması için bağlantı analizlerinin yapılması, ayrıca Cambridge ve Belclare koyununda 5. kromozom üzerinde belirlenen *GDF9* geninde belirlenen mutasyonun Sakız koyununda da araştırılması düşünülebilir.

Bu analizlerin dışında Sakız koyun ırkının orijini araştırılabilir. Sakız koyun ırkı ile Kıvırcık ve Dağlıç ırkları arasındaki genetik mesafe araştırılarak bu ırklar arasında genetik benzerliğin olup olmadığı ve iddia edildiği gibi Sakız koyun ırkının orijininde Kıvırcık ve/veya Dağlıç ırklarının bulunup bulunmadığı belirlenebilir.

KAYNAKLAR

1. AKÇAPINAR H. Koyun Yetiştiriciliği Yenilenmiş 2. Baskı. İsmat Matbaacılık, ISBN: 975-96978-1-5, Ankara, 2000.
2. ANON. Devlet İstatistik Enstitüsü Tarımsal Yapı ve Üretim, Ankara (2004).
3. BINDON BM, PIPER LR, The Reproductive Biology of Profilic Sheep Breeds. Oxford Rev. Reproduction Biol 8: 414, 1986.
4. PIPER LR, BINDON BM. The Booroola Merino and The Performance of Medium non-Peppin Crosses at Armidale. Editors : PIPER LR, BINDON BM, NERHERY RD. The Booroola Merino, Proceeding of Workshop, Armildale, 24-25 August 1980, CSIRO, page: 9-19. 1982.
5. DAVIS, GH, MONTGOMERY GW, ALLISON AJ, KELLY RW, BRAY AR., Segregation of a Major Gene Influencing Fecundity in Progeny of Booroola Sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research. 25: 525-529, 1982.
6. ANON. Committee on Genetic Nomenclature of Sheep and Goat. "Standardised Genetic Nomenclature for Sheep and Goats". Lavoisier, Paris, 1989.
7. DOODDS KG, DAVIS GH, ELSEEN JM, ISAACS KL, OWENS JL. The Effect of Booroola Genotype on Some Reproductive Traits in a Booroola Merino Flock. In Elsen, J.M., Bodin, L., Thimonier, J. (eds) Major Genes for Reproduction in Sheep. Institute National de la Recherche Agronomique. Paris, 359, 1991.
8. DAVIS GH, ARMSTORNG JR, ALLISON AJ. Ovulation Rates and Litter Sizes of Booroola Ewes Classified Homozygous, Heterozygous and non carrier for the Booroola Gene and the transfer of the Booroola Gene from the Merino into another Breed. Prociding of the 2nd World Congress on Sheep and Cattle Breeding. Pretoria, South Africa, Vol. II: 721, 1984.
9. MONTGOMERY GW, LORD EA, PENTY JM, DODDS KG, BROAD TE, CAMBRIDGE L, SUNDEN SLF, STONE RT, CRAWFORD A. The Booroola Fecundity (FecB) Gene Maps to Sheep Chromosome 6 Genomics, 22:148-153, 1994.
10. MULSANT P, LECERF F, FABRE S, SCHIBLER L, MONGET P, LANNELUC I, PISSELET C, RIQUET J, MONNIAUX D, CALLEBAUT I, CRIBIU E, THIMONIER J, TEYSSIER J, BODIN L, COGNIE Y, ELSEEN JM. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in BooroolaMerino ewes, Proc. Natl.Acad. Sci. USA 98, 5104–5109, 2001.
11. SOUZA CJ, MACDOUGALL C, CAMPBELL BK, MCNEILLY AS, BAIRD DT. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPR1B) gene, Journal of Endocrinol. R1–6, 169, 2001.
12. WILSON T, WU XI-YANG, JUENGEL JL, ROSS IK, LUMSDEN JM, LORD EA, DODDS KG, WALLING GA, MCEWAN JC, O'CONNELL AR, MCNATTY KP, MONTGOMERY GW. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK- 6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells, Biol. Reprod. 64 1225–1235, 2001.
13. DAVIS GH, MCEVAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, FARQUHAR PA. Evidence for the presence of a Major Gene Influencing Ovulation Rate on the X Chromosome of Sheep. Biology of Reproduction 44 620-624, 1991.

14. DAVIS GH, MCEVAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, MCNATTY KP, OWS.. Infertility Due to bilateral ovarian hypoplasia in Sheep Homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale Prolificacy Gene Located on the X Chromosome. *Biology of Reproduction* 46: 636 – 640, 1992.
15. MONTGOMERY GW, MCNATTY KP, DAVIS GH. Physiology and Molecular Genetics of Mutation that Increase Ovulation Rate in Sheep. *Endocrine Reviews* 13-2 , 309-328, 1992.
16. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner, *Nat. Genet.* 25, 279–283, 2000.
17. JOHNMUDSSON JV, ADALSTEINSSON S. Simple Genes for Fecundity in Icelandic Sheep. In *Genetics of Reproduction in Sheep* Editors: LAND RB and ROBINSON DW, Butterworths, London. page:159-168 1985.
18. BRADFORD GE, QUIRK JF, SITORIUS P, INOUNOU I, TIESNAMURTI B, BELL FL, FLETCHER IC, TORRELL DT. Reproduction in Javanese sheep: Evidence for a Gene With a Large Effect on Ovulation Rate and Litter Size. *Journal of Animal Science* 63, 418-431, 1986.
19. RADOMSKA M, MARTYNUK E, KLEWIEC J, KNOTHE A. Inheritance of High Prolificacy of the Olkuska Sheep (preliminary results). *Journal of agricultural Science Finland* 60: 597-598, 1988.
20. OWEN JB, WHITAKER CJ, AXFORD RFE, AP DEWII I. Expected Consequences of the Segregation of a Major Gene in a Sheep Population in Relation to Observations on the Ovulation Rate of a Flock of Cambridge Sheep. *Animal Production* 51:277-282, 1990.
21. HANRAHAN JP. Evidence for a Single Gene Effects on Ovulation Rate in the Cambridge and Belclare Breeds. Editor: ELSSEN JM *Major Genes for Reproduction in Sheep*, INRA, Paris, 93-102, 1991.
22. BODIN L, ELSSEN J, POIVEY JP, SAN CRISTOBAL-GAUDY M, BELLOC JP, EYCHENNE F. Hyper-prolificacy in the French Lacaune sheep breed. *Proceeding of the World congress of genetics Applied to Livestock Production* 27, 11-14, 1998.
23. DAVIS GH, DODDS KG, WHEELER R, JAY NP. Evidence that an Imprinted Gene on the X Chromosome increases Ovulation Rate in Sheep. *Biology of Reproduction* 64: 216—221, 2001.
24. HANRAHAN J.P., GREGAN S.M., MULSANT P., MULLEN M., DAVIS G.H., POWELL R., GALLOWAY S.M., Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*), *Biol. Reprod.* 70 (2004) 900–909.
25. GALLOWAY SM, MCNATTY KP, CAMBRIDGE LM, LAITINEN MPE, JUENGEL JL, JOKIRANTA TS, MCLAREN RJ, LUIRO K, DODDS KG, MONTGOMERY GW, BEATTIE AE, DAVIS GH, RITVOS O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner, *Nature Genetics* 25: 279–283, 2000.
26. DAVIS GH, ELSSEN JM, BODIN L, FAHMY MH, CASTONGUAY F, GOOTWINE E, BOR A, BRAW-TAL R, GREFF JC, LENGYEL A, PASZTHY G, CUMMINS L. A Comparison of the Production from Booroola and Local Breed Sheep in Different Countries. Editors: ELSSEN, J.M., BODIN, L.,

- THIMONIER, J. Major Genes for Reproduction in Sheep. Institute National de la Recherche Agronomique. Paris, 315, 1991.
27. SOUTHEY BR, THOMAS DL, GOTTFREDSON RG, ZELINSKY RD. Ewe productivity of Booroola Merino-Rambouillet crossbred sheep during early stages of the introgression of the Fec(B) allele into a Rambouillet population. *Livestock Production Science*. 75 (1): 33-44, 2002.
 28. GOOTWINE E, ZENU A, BOR ., YOSSAFI S, ROSOV A, POLLOTT GE. Genetic and economic analysis of introgression the B allele of the FecB (Booroola) gene into the Awassi and Assaf dairy breeds, *Livestock Production Science*.71: 49-58,2001.
 29. AKCAN A, ÇINAR K, ÖZBEYAZ C, AYDOĞAN M, ÇETİN O. Antalya-Boztepe’de Yetiştirilen Sakız Sürüsünde Bazı Verim Özelliklerinin İncelenmesi. *DOĞA TU Vet. Ve Hay. D. C.12 S. 2* : 99-112, 1988.
 30. BAŞPINAR H. Türkiye’deki Başlıca Koyun Irklarının Yarı-Entansif Koşullardaki Döl, Süt ve Yapağı Verim Performansları Üzerine Mukayeseli Bir Araştırma, İstanbul Üniversitesi Vet. Fak. Dreg. 11(2) 43-66, 1985.
 31. ÇELİK, İ., Sakız, Kıvırcık ve Dağlıç Koyun Irklarının yarı-Entansif Koşullarda Başlıca Verim Performansları Üzerine Karşılaştırmalı Bir Araştırma. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi), 1995.
 32. HATZIMININA OGLU I, GEORGOUDIS N, ZERVAS N, BOYAZOGLU J Prolific breeds of Greece. Editor: FAHMY M H, Prolific sheep, CAB International, page 73-92, 1996.
 33. SHUNICHI SHIMASAKI, R. KELLY MOORE, FUMIO OTSUKA, GREGORY F. ERICKSON. The Bone Morphogenetic Protein System In Mammalian Reproduction. *Endocrine Reviews* 25(1):72–101, 2001.
 34. WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS MJ, KRIZ RW, HEWICK RM, WANG EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528–1534,1988.
 35. CELESTE AJ, IANNAZZI JA, TAYLOR RC, HEWICK RM, ROSEN V, WANG EA, WOZNEY JM. Identification of transforming growth factor family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9843–9847 1990.
 36. OZKAYNAK E, RUEGER DC, DRIER EA, CORBETT C, RIDGE RJ, SAMPATH TK, OPPERMANN nH. OP-1cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J* 9:2085–2093, 1990.
 37. OZKAYNAK E, SCHNEGELSBERG PNJ, JIN DF, CLIFFORD GM, WARREN FD, DRIER EA, OPPERMANN H. Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor- β superfamily expressed early in embryogenesis. *J Biol Chem* 267:25220–25227, 1992.
 38. MCPHERRON AC, LEE S-J GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268:3444–3449, 1993.
 39. CHANG SC, HOANG B, THOMAS JT, VUKICEVIC S, LUYTEN FP, RYBA NJ, KOZAK CA, REDDI AH, MOOS JR M. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* 269: 28227–28234, 1994.
 40. STORM EE, HUYNH TV, COPELAND NG, JENKINS NA, KINGSLEY DM, LEE S-J. Limb alterations in *brachypodism* mice due to mutations in a new member of the TGF β -superfamily. *Nature* 368:639–643, 1994.

41. HOGAN BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580–1594, 1996.
42. BALEMANS W, VAN HUL W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 250: 231–250, 2002.
43. ZHAO G-Q, HOGAN BLM 1996 Evidence that mouse *Bmp8a* (*Op2*) and *Bmp8b* are duplicated genes that play a role in spermatogenesis and placental development. *Mech Dev* 57:159–168
44. DUBE JL, WANG P, ELVIN J, LYONS KM, CELESTE AJ, MATZUK MM 1998 The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12:1809–1817
45. LAITINEN M, VUOJOLAINEN K, JAATINEN R, KETOLA I, AALTONEN J, LEHTONEN E, HEIKINHEIMO M, RITVOS O 1998 A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 78: 135–140
46. SHIMASAKI S, ZACHOW RJ, LI D, KIM H, IEMURA S, UENO N, SAMPATH K, CHANG RJ, ERICKSON GF 1999 A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7282–7287
47. DONG J, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, KUMAR TR, LU N, MATZUK M 1996 Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531–535
48. ZHAO GQ, DENG K, LABOSKY PA, LIAW L, HOGAN BL 1996 The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev* 10:1657–1669
49. HAYASHI M, MCGEE EA, MIN G, KLEIN C, ROSE UM, VAN DUIN M, HSUEH AJ 1999 Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140:1236–1244
50. ELVIN JA, CLARK AT, WANG P, WOLFMAN NM, MATZUK MM 1999 Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 13:1035–1048
51. OTSUKA F, YAO Z, LEE TH, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S 2000 Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 275:39523–39528
52. GALLOWAY SM, MCNATTY KP, CAMBRIDGE LM, LAITINEN MP, JUENGEL JL, JOKIRANTA TS, MCLAREN RJ, LUIRO K, DODDS KG, MONTGOMERY GW, BEATTIE AE, DAVIS GH, RITVOS O 2000 Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25:279–283.
53. OTSUKA F, MOORE RK, SHIMASAKI S 2001 Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *J Biol Chem* 276:32889–32895
54. WILSON T, WU X-Y, JUENGEL JL, ROSS IK, LUMSDEN JM, LORD EA, DODDS KG, WALLING GA, MCEWAN JC, O'CONNELL AR, MCNATTY KP, MONTGOMERY GW. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (*ALK-6*) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod* 64: 1225–1235, 2001.
55. SOUZA CJH, MACDOUGALL C, CAMPBELL BK, MCNEILLY AS, BAIRD DT. The Booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone

- morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J Endocrinol* 169:R1–R6, 2001.
56. MCNATTY KP, KIEBOOM LE, MCDIARMID J, HEATH DA, LUN S. Adenosine cyclic 3, 5-monophosphate and steroid production by small ovarian follicles from Booroola ewes with and without a fecundity gene. *J Reprod Fertil* 76:471–480, 1986.
 57. JUENGEL JL, MCNATTY KP. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 11: 144-161, 2005.
 58. MOORE RK, OTSUKA F, SHIMASAKI S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem* 278:304–310, 2003.
 59. DAVIS GH, DODDS KG, BRUCE GD. Combined effect of the inverdale and booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep. *Proc Assoc Adv Anim Breed Genet* 13:74–77, 1999.
 60. DAVIS GH. Fecundity genes in sheep. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 247-253, 2004.
 61. BRADFORD GE, INOUNU I, INIGUEZ LC, TIESNAMURTI B, THOMAS DL. The prolificacy gene of Javanese sheep, Editors: Elsen JM, Bodin L, Thimonier J. *Major Genes for Reproduction in Sheep*, Inra, Paris, France, pages: 67–73, 1991.
 62. DAVIS GH, BRUCE GD, DODDS KG. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep. *Proc. Assoc. Adv. Anim. Breed. Genet.* 14, 175–178, 2001.
 63. GALLOWAY SM, CAMBRIDGE LM, HENRY HM, VAN STIJN TC, DAVIS GH. A genetic test to identify carriers of the ovine Inverdale prolificacy gene (FecXI), *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.* 59, 114–116, 1999.
 64. HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN M, DAVIS GH, POWELL R, GALLOWAY S. Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*), *Biol. Reprod.* 70, 900–909, 2004.
 65. HANRAHAN JP. Major gene effects on reproduction in sheep, *Irish J. Ag. Food Res.* 35, 87–88, 1996.
 66. HANRAHAN JP, OWEN JB, Variation and repeatability of ovulation rate in Cambridge ewes, *Proc. Brit. Soc. Anim. Prod. Winter meeting*, paper 37, 1985
 67. HANRAHAN JP. Evidence for single gene effects on ovulation rate in the Cambridge and Belclare breeds, Editors: ELSEN JM, BODIN L, THIMONIER J. *Major Genes for Reproduction in Sheep*, Inra, Paris, France, page 93–102, 1991.
 68. OWEN JB. The Cambridge breed, in: FAHMY M.H. (Ed.), *Prolific Sheep*, CABInternational, Wallingford, UK, page: 161–173, 1996.
 69. HANRAHAN JP. Phenotypic and genetic variation for ovulation rate in Cambridge sheep, *Proc. Brit. Soc. Anim. Prod. Winter Meeting*, paper 19, 1989.
 70. DAVIS GH, DODDS KG, WHEELER R, BRUCE GD. Further evidence of non-Mendelian inheritance at the FecX2 locus in a prolific sheep flock, in: *Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Montpellier, Inra, Castanet-Tolosan, France, Vol. 30, page 641–644, 2002.
 71. BODIN L, ELSEN JM, POIVEY JP, SANCRISTOBAL-GAUDY M, BELLOC JP, EYCHENNE F. Hyper-prolificacy in the French Lacaune sheep breed; a possible major gene, in: *Proc. 6th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Armidale, University of New England, Vol. 27, pp. 11–14, 1998.

72. LECERF F, MULSANT P, ELSESEN JM, BODIN L. Localisation and mapping of a major gene controlling ovulation rate in Lacaune sheep, in: Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, Inra, Castanet- Tolosan, France, Vol. 30, page: 753–756, 19–23 August 2002.
73. BODIN L, SANCRISTOBAL M, LECERF F, MULSANT P, BIB EB, LAJOUS D, BELLOC JP, EYCHENNE F, AMIGUES Y, ELSESEN JM. Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. Genetic Selection and Evolution. 34: 447–464, 2002.
74. DAVIS GH, GALLOWAY SM, ROSS IK, GREGAN SM, WARD J, NIMBKAR BV, GHALSASI PM, NIMBKAR C, GRAY GD, SUBANDRIYO, INUNU I, TIESNAMURTI B, MARTYNIUK E, EYTHORSDDOTTIR E, MULSANT P, LECERF F, HANRAHAN JP, BRADFORD GE, WILSON T. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. Biology of Reproduction. 66 1869–1874, 2002.
75. JONMUNDSSON JV, ADALSTEINSSON S. Single genes for fecundity in Icelandic sheep, Editors: LAND RB, Robinson DW. Genetics of Reproduction in Sheep, Butterworths, London, UK, page 159–168, 1985.
76. RUSSEL AJF, ALEXIEVA SA, ELSTON DA. The effect of the introduction of the Thoka gene for fecundity on lamb production from Cheviot ewes, Anim. Sci. 64: 503–508, 1997.
77. WALLING GA, BISHOP SC, PONG-WONG R, GITTUS G, RUSSEL AJF, RHIND SM. Detection of a major gene for litter size in Thoka Cheviot sheep using Bayesian segregation analyses, Anim. Sci. 75: 339–347, 2002.
78. RHIND SM, GITTUS G, POTTS JM, BISHOP SC. Reproductive performance of the Thoka Cheviot sheep, Proc. Brit. Soc. Anim. Sci. Page:44, 2000.
79. EYTHORSDDOTTIR E, ADALSTEINSSON S, JONMUNDSSON JV, HANRAHAN JP. Research work on the Icelandic Thoka gene, Editors: ELSESEN JM, BODIN L, THIMONIER J, Major Genes for Reproduction in Sheep, Inra, Paris, France, pp. 75–84, 1991.
80. MARTYNIUK E, RADOMSA MJ. A single gene for prolificacy in Olkuska sheep. Editors: ELSESEN JM, BODIN L, THIMONIER J, Major Genes for Reproduction in Sheep, Inra, Paris, France, pp. 85–92, 1991.
81. SCHERF BD. World Watch List for Domestic Animal Diversity, 3rd edn., FAO, Rome, 2000.
82. MALHER X, LE CHERE AK. High prolificacy in Belle-Ile sheep (Brittany, France): major effects of a putative single gene and the A^{wh} colour gene on ovulation rate and litter size, Reprod. Nut. Dev. 38: 473–484, 1998.
83. DAVIS GH, MONTGOMERY GW, KELLY RW. Estimates of the repeatability of ovulation rate in Booroola cross ewes. Proc. 2nd World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., Madrid Vol. 8, pp. 674–679, 1982.
84. MONTGOMERY GW, CRAWFORD A, PENTY JM, DODDS KG, BROAD EDE AJ, HENRY HM, PIERSON CA, LORD EA, GALLOWAY SM, SCHMACK AE, SISE JA, SWARBRICK PA, HANRAHAN V, BUCHANAN FC, HILL DF. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. Nature Genetic, 4: 410-414, 1993.
85. DAVID L. DUFFY, GRANT W. MONTGOMERY, JEFF HALL, CAROL MAYNE, SUE C. HEALEY, JOY BROWN, DORRET I. BOOMSMA, NICHOLAS G. MARTIN Human twinning is not linked to the region of chromosome 4 syntenic with the sheep twinning gene FecB. American Journal of Medical Genetics 100:182-186, 2001.

86. DAVIS GH. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*. 37 (Suppl. 1): 11–23, 2005.
87. TURNER HN. Origins of the CSIRO Booroola. Editors: PIPER LR, BINDON BM, NETHERY RD *The Booroola Merino*. Proceeding of a Workshop, Armidale, 1980.
88. MCNATTY KP, HUDSON NL, LUN S, HEATH DA, SHAW L, CONDELL L, PHILLIPS DJ, CLARKE IJ. Gonadotrophin-releasing hormone and the control of ovulation rate by the FecB gene in Booroola ewes. *J Reprod Fertil* 98 97-105, 1993.
89. SOUZA CJ, CAMPBELL BK, WEBB R & BAIRD DT. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (FecB). *Endocrinology* 138: 5333-40, 1997.
90. MCNATTY KP, HUDSON N, HENDERSON KM, GIBB M, MORRISON L, BALL K & SMITH P. Differences in gonadotrophin concentrations and pituitary responsiveness to GnRH between Booroola ewes which were homozygous (FF), heterozygous (F+) and noncarriers (++) of a major gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil* 80 577- 88, 1987.
91. BINDON BM, FINDLAY JK, PIPER LR. Plasma FSH and LH in prepubertal Booroola ewe lambs. *Aust J Biol Sci* 38 215-20, 1985.
92. MCNATTY KP, HUDSON N, GIBB M, BALL K, HENDERSON KM, HEATH DA, LUN S & KIEBOOM LE 1985 FSH influences follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J Reprod Fertil* 75 121-31
93. FRY RC, CLARKE IJ, CUMMINS JT, BINDON BM, PIPER LR & CAHILL LP. Induction of ovulation in chronically hypophysectomized Booroola ewes. *J Reprod Fertil* 82: 711–5, 1988.
94. MCNATTY KP, LUN S, HEATH DA, BALL K, SMITH P, HUDSON NL, MCDIARMID J, GIBB M & HENDERSON KM. Differences in ovarian activity between booroola X merino ewes which were homozygous, heterozygous and non-carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil* 77 193–205, 1986.
95. CAMPBELL BK, SCARAMUZZI RJ, WEBB R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *J Reprod Fertil* 106: 7–16, 1996.
96. S FABRE, A PIERRE, C PISSELET, P MULSANT, F LECERF, J POHL, P MONGET AND D MONNIAUX. The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-IB functionality. *Journal of Endocrinology*, 177: 435–444, 2003.
97. MCNATTY KP, HENDERSON KM, LUN S, HEATH DA, BALL K, HUDSON NL, FANNIN J, GIBB M, KIEBOOM LE, SMITH P. Ovarian activity in Booroola X Romney ewes which have a major gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil* 73, 109–20, 1985.
98. BK CAMPBELL, DT BAIRD, CJ SOUZA, AND R WEBB. The FecB (Booroola) gene acts at the ovary: in vivo evidence *Reproduction*, 126: 101–111, 2003.
99. PIERRE A. Les Bone Morphogenetic Proteins dans l'ovaire. Contribution à l'étude de leurs mécanismes d'action dans les cellules de la granulosa. THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOURS, 2004.
100. GIBBS RA. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction *Analytical Chemistry*, 62: 1202–1214, 1990.

101. ERLICH HA, GELFAND D, SNINSKY J Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252: 1643–1651, 1991.
102. ERLICH HA, ARNHEIM N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual Review of Genetics*, 26: 479–506, 1992.
103. WHITE TJ, ARNHEIM N, ERLICH HA. The polymerase chain reaction. *Trend in Genetic*, 5(6): 185–189, 1989.
104. SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491, 1988.
105. CANER V, ÇARLI KT. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve bazı tavuk infeksiyonlarındaki yeri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (1–2): 137–145, 2001.
106. BEJ AK, MAHBUBANI MH, ATLAS RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3-4): 301-334, 1991.
107. VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, EGGEN A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34, 275–305, 2002.
108. DENG G. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene *c-Ha-ras* in DNAs of gastric cancer. *Nucl. Acids Res.*, 16:6231, 1988.
109. JIANG W, KAHN SM, GUILLEM JG, LU SH, WEINSTEIN IB. Rapid detection of *ras* oncogenes in human tumors: Applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene*, 4:923-928, 1989.
110. HALIASSOS A, CHOMEL JC, GRANDJOUAN S, DRUH J, KAPLAN JC, KITZIS A. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: A new approach for a sensitive diagnosis of tumor progression markers. *Nucl. Acids Res.*, 17:8093-8099, 1989.
111. SAMBROOK J, FRISHCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2 nd ed.), Cold Spiring Harbor Laboratory Press, 1989.
112. G.H. DAVIS, L. BALAKRISHNAN, I.K. ROSS T. WILSON, S.M. GALLOWAY, B.M. LUMSDEN, J.P. HANRAHAN, M. MULLEN, X.Z. MAO, G.L. WANG, Z.S. ZHAO, Y.Q. ZENG, J.J. ROBINSON, A.P. MAVROGENIS, C. PAPACHRISTOFOROU, C. PETER, R. BAUMUNGI, P. CARDYN, I. BOUJENANE, N.E. COCKETT, E. EYTHORSDDOTTIR, J.J. ARRANZ, D.R. NOTER. Investigation of the Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecXI*) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science* 92: 87–96, 2006.
113. M. AVDI, P. CHEMINEAU AND M. A. DRIANCOURT Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios sheep. *Animal Reproduction Science* 46: 223–235, 1997.

TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve tez çalışmalarım boyunca bu tezin gerçekleştirilmesi için gerekli maddi kaynağı sağlayan ANNEM, BABAM ve kardeşim Özgür'e, her şart altında sabır, iyi niyet ve yardımını esirgemeyen eşim Prof.Dr. Burak POLAT'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı bitirmemde büyük katkısı olan, beni yönlendiren ve her zaman ihtiyaç duyduğum her türlü desteği bana sağlayan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Tuna GÜLTEN'e, bu konuda beni yönlendiren Yrd. Doç. Dr. Hakan CANGÜL'e, tez çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Cengiz ELMACI'ya, laboratuvar çalışmalarım boyunca sürekli yanımda olan, bana yardım eden ve her zaman moral kaynağı olan sevgili arkadaşım Dr. Elif EVKE'ye, benimle beraber Çeşme ve Urla'da dolaşarak Sakız koyunlarından örnek toplayan sevgili arkadaşlarım Vet. Hek. Meral GÖKDAĞ ve Vet. Hek. Erhan GÖKDAĞ'a, hayvan materyali bulmamda desteklerini hiçbir zaman unutmayacağım Ayvacık Tarım İlçe Müdürlüğü'ne, tez çalışmamın planlanmasında ve çalışmaya başlamamda emeklerini hiçbir zaman unutmayacağım bana elindeki bütün kapıları açan değerli hocam Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL'a ve ayrıca bana her zaman moral kaynağı olan, desteğini ve dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen benimle beraber materyal bulmak için Çanakkale ilçe ve köylerinde Sakız koyunu araştıran ve buralarda kan örnekleri toplarken hep yardımcı olan sevgili dostum Yrd. Doç. Dr. Ece TURHAN'a teşekkürü borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

29. 10. 1972 tarihinde Tekirdağ'da doğdum. İlkokul öğrenimimi İstanbul Kartal Merkez Eczacıbaşı İlkokulu'nda, ortaokul ve lise öğrenimimi Galatasaray Lisesi'nde tamamladım. 1991 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitime başladım ve 1996 yılında mezun oldum. 1997 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım ve aynı yıl içinde Yüksek Öğrenim Kurulu tarafından verilen yurt dışı bursu ile Belçika Liege Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Bölümüne burslu öğrenci olarak gönderildim ve 1999 yılında yüksek lisansımı burada tamamladım. 2000 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Zootečni Anabilim Dalı'nda Doktora eğitime başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosunda görev yapmaktayım.