T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İVESİ KOYUNLARINDA DOĞUM AĞIRLIĞI ÜZERİNE GDF9 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİN (SNP) ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurcan KILIÇ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İVESİ KOYUNLARINDA DOĞUM AĞIRLIĞI ÜZERİNE GDF9 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİN (SNP) ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurcan KILIÇ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Yrd. Doç. Dr. Selahattin KİRAZ danışmanlığında Nurcan KILIÇ'ın hazırladığı **''İvesi Koyunlarında Doğum Ağırlığı Üzerine GDF9 Geni Tek Nükleotid Polimorfizmlerin (SNP) Etkisinin Araştırılması''** konulu bu çalışma 05/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Selahattin KİRAZ …….

Üye : Yrd.Doç.Dr. Hasan KOYUN …….

Üye : Yrd.Doç.Dr. Gonca ÖZMEN ÖZBAKIR …….

Bu Tezin Zootekni Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 16165

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
1.1. Dünya'da Koyun Yetiştiriciliği 3
1.2. Türkiye' De Koyun Yetiştiriciliği 3
1.4. Doğum Ağırlığını Etkileyen Faktörler 5
1.5. Koyunlarda GDF9 (Growth/Differentiation Factor 9) Geni 7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 8
3. MATERYAL ve YÖNTEM 12
3.1. Hayvan Materyali ve Doğum Ağırlığı Bilgileri 29
3.2. Moleküler Çalışmalar 29
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu 29
3.2.2. DNA agaroz jel elektroforezi 29
3.2.3. Primerler 30
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 31
3.2.5. DNA sekans analizi 32
3.2.6. GDF9 geni ekzon2 bölgesi bilgileri değerlendirme 33
3.3. DNA Polimorfizmi ve SNP Genotiplendirme 33
3.4. SNP-Doğum Ağırlığı İlişkisi 36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 38
4.1. Moleküler Analiz Bulguları 38
4.1.1. DNA izolasyonu 38
4.1.2. PZR sonuçları 38
4.2.Dizileme Sonuçları ve SNP'ler 39
4.2.1. GDF9 gen polimorfizmi 39
4.2.2. SNP genotiplendirme 40
4.2.3. GDF9 geni ekzon2 SNP'ler ile doğum ağırlığı ilişkisi 43
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 52

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İVESİ KOYUNLARINDA DOĞUM AĞIRLIĞI ÜZERİNE GDF9 GENİ TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİN (SNP) ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurcan KILIÇ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Selahattin KİRAZ
Yıl: 2018, Sayfa: 52

Bu çalışmada, İvesi Koyunu ülkemizdeki yağlı kuyruklu koyun ırklarından biri olup, Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, Şanlıurfa, Gaziantep, Hatay illerinde yetiştirilmektedir. İvesi Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne adapte olan bir ırkımızdır. Bu çalışma ile, halk elinde yetiştirilmekte olan İvesi Koyunlarının doğum ağırlığına etki eden faktörler belirlenmiş ve bu özellikler göz önünde bulundurularak fenotipik ve genetik parametreler tahmin edilmeye çalışılmıştır. Koyunlarda DNA izole edilip koyun DNA örneklerinde GDF 9 geni ekzon 2 bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin gen dizi bilgileri belirlenmiştir. GDF9 geninde polimorfizm DNA dizi bilgilerini kullanılarak tespit edilmiştir. İlgili gen bölgesinde SNP1(G/C), SNP2(G/A), SNP3(A/G) ile SNP4(T/C) (SNP) tek nükleotid polimorfizmleri belirlenmiştir ve bu SNP'lere ait olan genotip ve allel frekansları belirlenmiştir. İvesi koyunlarında doğum ağırlıkları açısından, SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) genotipleri arasında çokta önemli bir farkın olmadığı görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: SNP, GDF9 geni, İvesi koyunu

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF EFFECT SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) IN GDF9 GENE ON THE BIRTH WEIGHT IN AWASSI SHEEP

Nurcan KILIÇ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor :Assist. Prof. Dr. Selahattin KİRAZ
Year: 2018, Page: 52

In this research, Awassi Sheep is one of the fat-tailed sheep breeds in our country, Turkey's South eastern Anatolia Region, Sanlıurfa, Gaziantep, Hatay province where is raise. İvesi is a race adapted to the South eastern Anatolia Region. In this research, the factors affecting the birth weight of the Ivesi sheep raised or kept in the hands of the people were determined and tried to estimate phenotypic and genetic parameters considering these characteristics. The DNA was isolated from the sheep and the sheep DNA samples were amplifiedwithGDF9broadexon2regionPZR.The gene sequence information of the PCR products was determined. Polymorphisms in the GDF9 gene were identified using DNA sequence information. Single nucleotide polymorphisms of SNP1 (G / C), SNP2 (G / A), SNP3 (A/G) and SNP4 (T/ C)(SNP) were determined in the relevant gene region. Genotype and allele frequencies belonging to these SNPs were estimated. It was observed that there was no significant difference between the genotypes of SNP2 (G / A), SNP3 (A / G) and SNP4 (T / C).

KEY WORDS: SNP, GDF9 gene, Awassi sheep

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması ve devam ettirilmesi aşamalarında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin KİRAZ' a çok teşekkür ederim. Çalışmalar yaptığımız zamanlarda ve bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayfer BOZKURT KİRAZ' a teşekkür ederim.

Laboratuvarda çalışma esnasında bana yardımcı olan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda yardımlarını esirgemeyen ve sabır göstermeye çalışan aileme çok teşekkür ediyorum.

Ayrıca maddi destek sağlayan HÜBAK'a, teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1 İvesi koyunu 5
Şekil 1.2. Gdf 9 geni kromozom bölgesi 9
Şekil 1.3. Gdf9 Geni kromozomal lokasyonu 9
Şekil 1.4. GDF9 aminoasit sekansı 10
Şekil 1.5. GDF9 amino asit sekansı 10
Şekil 4.1. Koyunlardan izole edilen DNA'lar (1kb ladder) 38
Şekil 4.2. PZR Ürünü Jel Görüntüsü 38
Şekil 4.3. GDF 9 gen ekzon 2 bölgesi DNA dizi bilgisi kromatoğram 39
Şekil 4.4. SNP1 (G/C) 40
Şekil 4.5. SNP2 (A/G) 41
Şekil 4.6. SNP3 (A/G) 41
Şekil 4.7. SNP4 (T/C) 42
Şekil 4.8. SNP'lere ait doğum ağırlığı değerleri 44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Türkiye küçükbaş hayvan varlığı (Tuik, 2017) 4
Çizelge 1.2. GDF9 Geni Ekzon2 Bölgesi SNP Listesi 10
Çizelge 3.1. PCR karışımı 32
Çizelge 3.2. PCR amplifikasyon şartları 32
Çizelge 4.1. İvesi koyunların GDF9 geni ekzon 2 gen bölgesine göre DNA polimorfizmi 40
Çizelge 4.2. SNP'lere ait allel ve genotip frekanslar 43
Çizelge 4.3. GDF9 geni ekzon2 bölgesi SNP genotiplerinin doğum ağırlığı üzerine etkileri 43

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	Ethylendinitrilotetrasetat
bp	Baz Çifti
dH2O	Distile Su
dNTP	Deosinükleotid Trifosfat
dk	Dakika
Et-Br	Etidium Bromür
HCL	Hidroklorik Asit
G-C	Guanin-Sitozin
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
kb	Kilobaz
GDF9	Growth\Different Factor9
gr	Gram
Lt	Litre
ug	Mikrogram
ul	Mikrolite
M	Molar
U	Ünite
mM	Milimolar
O	Ovis
Mmol	Mikromol
mg	Miligram
NaCl	Sodyum Klorür
pmol	Pikomol
ml	Mililitre
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBE	Tris Borik Asit Edta
TE	Tris Edta
K2P	Kimura 2 Parametre Model
HG	Haplogrup
Hd	Haplotip Farklılğı
Tm	Erime Sıcaklığı
UV	Ultraviyole
V	Volt
W	Ağırlık

1. GİRİŞ

Hayvancılık; gelişmiş ülkeler başta olmak üzere birçok ülkede genel ekonominin önemli sektörlerinden birisi konumundadır. Türkiye'de ise tarım kesiminde bulunan nüfusun önemli bir bölümü hayvancılıktan geçimini sağlamasına rağmen hayvancılık ülke ekonomisine istenilen katkıyı yapamamaktadır. Bunun en önemli göstergesi Türkiye'de hayvancılığın toplam tarımsal üretim değeri içinde yaklaşık yüzde 30'a yakın bir paya sahip olmasıdır (Akman ve Tatar, 2006). Türkiye 'de büyükbaş hayvan sayısı 14milyon 817bin baş, toplam küçükbaş hayvan sayısı 44milyon 573 bin baş, koyun sayısı 33milyon 562baş, keçi sayısı da 11milyon 11bin baş olarak belirlenmiştir (Tuik 2017).

Hayvansal üretimin amacı, hayvansal ürünleri ekonomik şekilde üretmek ve artırmaktır. Hayvansal üretimi artırmak iki şarta bağlıdır. Bunlardan ilki hayvanların genetik açıdan yüksek verime sahip olmaları, ikinci ve önemli olan diğer koşul ise verimlerine uygun şekilde hazırlanmış dengeli rasyon ile beslenmeleridir. Karlı bir hayvancılık için bakım beslemenin iyileştirilmesi zorunludur. Çiftlik hayvanlarında verimi etkileyen faktörler genetik ve çevre faktörleridir. Hayvancılıkta başarı için eğitim ve teknik eleman desteği şarttır. Damızlık değeri yüksek hayvanlardan arzu edilen verimin alınabilmesi için yetiştiricinin bakım, besleme ve sağlık korumada eğitilmesi, gereksinim duyduğu teknik desteğin sağlanması gerekir (Kutlu ve ark., 2004).

Koyun ve keçi yetiştiriciliğinin insanların ilk hayvansal üretim alanı olduğu bildirilmektedir (Zeder, 2008). Koyunlar, diğer çiftlik hayvanlarına göre birçok avantaja sahip olup oldukça farklı çevre koşullarında yetiştirilebilirler. Bitkisel üretim yapılamayan alanlarda, bitkisel üretim yapılıp yılın boş bırakılan dönemlerinde, anız tarlalarından yararlanarak, hiçbir hayvanın yararlanamayacağı bağ ve bahçe artıklarını ürüne dönüştüren koyunlar, besleme açısından çok az bir masrafla yalnızca bu alanları değerlendirerek insan beslenmesine önemli katkıda

bulunmaktadırlar. Dolayısıyla ülke ve dünya ekonomisine en az masraf ve giderlerle katkıda bulunan en önemli çiftlik hayvanlarındandır (Sönmez, 1974).

Dünyada koyun ve keçi birçok farklı özellikleri sebebiyle önemli yere sahiptir. Bu hayvanların bulundukları yerlere adaptasyon yeteneği oldukça yüksektir ve bu hayvanlar, insanların tüketimi için et, süt, deri ve yapağı gibi çeşitli birçok ürünlere dönüştürülebilmektedir. Ayrıca ekonomik öneminin yanında biyolojik ve fizyolojik özellikleri nedeniyle de büyük önem arz etmektedir. İnsanlık için dönüm noktalarından birisi olan "Evcilleştirme", Neolitik çağda, yaklaşık olarak 11.000 yıl önce Bereketli Hilal (*FertileCrescent*) olarak bilinen topraklarda başlamıştır (Zeder, 2008).Çiftlik hayvanlarının evcilleştirmesinde 4 türün adı geçmektedir. Bunlar domuz, sığır, koyun ve keçidir. Evcilleştirme tarihleri birbirlerine yakın olmakla beraber koyun ve keçinin ilk evcilleştirilen tür olduğu tahmin edilmektedir (Zeder, 2008).

Başarılı bir koyunculuk yapmak için bölgelerin ekonomik şartlarını ve bölgelerin coğrafi yapısının uygunluğuna göre küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yapmak amaca uygun koyun ırklarının veya tiplerinin seçilmesi gerekmektedir (Akçapınar, 1994).

Günümüz dünyasında biyolojik varyasyona sahip olan hayvansal genetik kaynakların korunması gelecek kuşaklar açısından büyük önem arz etmektedir. Bu varyasyona, bazı birkaç kaynaklarda, populasyonlar arası söz konusu olduğu zaman çeşitlilik, popülasyon içi söz konusu olduğu zaman ise polimorfizm de denmektedir (Hartl ve Clark, 2007). Genetik varyasyon kavramı canlı türlerin kalıtsal bilgilerinin zenginliğini ifade etmektedir. Biyolojik varyasyonun korunması herhangi bir ülke açısından değil aynı zamanda tüm dünyanın mevcut varlıklarından birisinin korunması anlamına gelmektedir. Bunlara bağlı olarak ırklar arasındaki farklılıklar genetik varyasyon açısından önemlidir. Günümüzde bu genetik ve biyolojik varyasyonlar, ırk, tür, ve gen düzeyinde azalma veya yok olma sebebiyle giderek önemli derecede azalmaktadır. Hayvancılıkta bu azalmaya sebep olan önemli faktörler olarak; sosyal, ekonomik ve çevresel gelişmelerin çeşitli düzeylerde

entansifleşmeyi zorunlu hale getirmesi, kültür ırkları yararına yapılan seleksiyonlar ile birlikte az girdi ile yetişebilen fakat düşük verim seviyesinde olan yerli ırkların yerini kültür ırklarının alması gösterilebilir. Şu an dünyada bulunan yaklaşık 40 hayvan türünün %30'dan daha fazlası özellikle gelişmekte olan birkaç ülkede yetersiz yararlanma sebebiyle yok olma tehlikesi taşımaktadırlar. Bu durumun yakın gelecekte dünya tarımını önemli derecede olumsuz yönde etkileyeceği tahmin edilmektedir. Bu sebeple dünyada son yıllarda hayvan gen kaynaklarının korunması konusundaki çalışmalarda hızlı bir şekilde artış gözlenmektedir (Ertuğrul ve ark., 2010).

1.1. Dünya'da Koyun Yetiştiriciliği

Dünya ticaretinde koyun ürünlerinden koyun etinin, koyun sütünün, yapağının önemi çok fazladır. Bu ürünler ülkelerarası önemli derecede ekonomik hareketliliğe sebep olmaktadır. Ülkelerin bu hareketliliklerinden dolayı bazı ülkelerin doğa ve iklim koşulları, bazı ülkelerin ise pazarlamalarında uzaklık durumu söz konusudur, Buna ek olarak milletlerin kültürü, koyun bakım ve beslemeleri, arzu edilen koyun ırkı tipi ve değişik verimlerine göre geliştirilmesinde etkili olmuştur. Bunun sonucunda dünya ülkelerinde koyunculuk hakkından bahsedilirken yalnızca koyun varlığını açıklamak yetmez koyunculuğun verim düzeyinden ve tipinden de bahsedilmelidir (Ensminger ve ark., 1986).

Dünyanın farklı ülkelerinde hayvansal üretim açısından koyunculuk ekonomik değer bakımından en ön sırada gelmekte, bazı ülkelerde de milli gelir olarak çok büyük öneme sahiptir. Bu ülkelerden en tipik örneklerinden biri Avustralya'dır. Koyun yetiştiriciliği yalnız beslenme ihtiyaçlarımız olarak kalmaz, aynı zamanda tekstilde hammadde olarak kullanılan ve dünya ticaretinde de önemli bir konuma sahip koyun deri ve yapağısı da önem teşkil etmektedir (Sönmez, 1974).

1.2. Türkiye' de Koyun Yetiştiriciliği

Koyun yetiştiriciliğinde üretimin artırılması, hayvan basına elde edilen verimlerin yükseltilmesine bağlıdır. Hayvanların verim seviyeleri başlıca iki ana

unsur tarafından tespit edilir. Bunlar genetik yapı ve çevre olarak belirlenmiştir. Türkiye'deki koyunların %97 si genetik kapasiteleri düşük seviyeli yerli ırklardan meydana gelmiştir. Mevcut olan koyun varlığı bilimsel, modern uygulamalardan önemli derecede yoksun daha çok geleneklere bağlı olarak yetiştirilmektedir. Özellikle koyunların beslenmeleri yetersiz ve dengesizdir. Türkiye'de yetiştirilen koyunlardan elde edilen toplam et, süt ve yapağı miktarı çevrenin ve genetik yapının iyileştirilmesiyle çok önemli derecelerde artacaktır. Bu durum koyunculuğun ülke ekonomisinde yerinin gelecekte de önemini devam ettireceğini göstermektedir (Kaymakçı ve Sönmez, 1992).

Başarılı koyunculuk yapılmasının en önemli şartı koyun yetiştiriciliğin yapılacağı bölgelerin ekonomik olanakları ve coğrafi şartları göz önüne alınarak yetiştirme yönünün veriminin iyi belirlenerek bu amaca uygun koyun tipinin ve ırkının seçilebilmesidir (Akçapınar, 1994).

Cumhuriyetin kuruluşundan bugüne kadar yerli koyunlarımızın üzerinde saf veya melezleme yoluyla yapılan ıslah çalışmaları sınırlıdır. Karacabey merinosu, Tahirova koyunu, Orta Anadolu Merinosu ve Ramlıç başlıca geliştirilmiş kültür koyun ırklarıdır (Akçapınar, 1983 ve Kaymakçı, 2001).Kültür koyun ırklarının toplam koyun varlığımız içinde %3 düzeyinde olması tüm çiftlik hayvanları içerisinde koyunculuğun ciddi derecede pek çok sorunlarla karşı karşıya olduğunu belirtmektedir. Yerli koyun ırklarımızda ise yapılan saf yetiştirme yönünde ıslah çalışmalarıyla ne özel çiftliklerde ne de kamu tarım işletmelerinde damızlık niteliğinde sürüler bulunmamaktadır. Yerli koyun ırklarından İvesi ırkı çoğunlukla Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilmektedir(Akçapınar, 2000).

Çizelge 1.1. Türkiye küçükbaş hayvan varlığı (Tuik, 2017)

Yıl	Koyun	Keçi	Toplam
2011	25.031.565	7.277.953	32.309.518
2012	27.425.233	8.357.286	35.782.519
2013	29.284.247	9.225.548	38.509.795
2014	31.115.190	10.347.159	41.485.180
2015	31.934.000	10.416.166	42.350.166
2016	30.983.933	10.345.299	41.329.232
2017	33.562.000	11.000.011	44.562.011

İvesi Koyunu, ülkemizdeki yağlı kuyruklu koyun ırklarımızdan biri olup, Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, Suriye sınırına yakın olan Şanlıurfa, Hatay, Gaziantep illerinde yetiştirilmektedir (Özcan, 1997).

İvesi koyunlarının baş kısmı kirli sarıdan veya siyah renkli olarak görülmekte, vücutları kahve renkli ve yağlı kuyruklu koyunlarımızdır. Kuyruk yapıları; yuvarlak, uç kısımları yukarı doğru kıvrımlı bir şekil halini alarak oyukluk meydana getirir ve oyukluğun bitmiş olduğu kısımda yağsız kuyruk ile yalnızca bir parça şeklinde görülmektedir(Sönmez, 1974).Yapağı ağırlığı 1.5 ile 2.0 kg oranlarında değişmektedir. Yapağıları halı, battaniye, kilim ve yatak yapımında kullanılır.

İvesi koyunlarında canlı ağırlıkları koyunlarda 35-45 kg koçlarda ise 55-60 kg arasında gelmektedirler. İvesiler, özellikle çok yaşlı olan veya çok uzun süre sağılmış ana dişi koyunların et lifleri kaba ayrıca daha uzun olur. Et lifleri arasında yağ toplanması azdır. Bu sebepten dolayı etleri çok iyi kaliteli değildir (Sönmez, 1974).



Şekil 1.1 İvesi koyunu

1.3. Hayvancılık Bilimlerinde Moleküler Teknikler

Hayvansal ürünlerinin üretiminde günümüze kadar önemli bilimsel ve teknolojik ilerlemeler sağlanmıştır. Son yıllarda genetik mühendisliği teknikleri, hayvancılık bilimlerinde kullanılan önemli araçlardan birisidir. Moleküler teknikler, gelişmiş ülkelerde hayvan genetiği ve ıslahı alanlarında da kullanılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda farklı genotipler geliştirmek için moleküler genetik alanında ortaya atılan yöntemler, çeşitli çiftlik hayvanlarına ait populasyonların DNA düzeyinde genetik yapılarının belirlenmesine ve bunlardan yararlanılmasına imkân sağlamıştır. DNA fragmentlerinin PCR (Polymerase Chain Reaction) kullanılarak çoğaltılması esasına dayanan birçok yöntem bulunmaktadır. Yöntemlerin hemen hepsi PCR esasına göre çalışmaktadır. Bu yöntemlerin daha yaygın bir şekilde kullanılanları; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), Mikrosatelit (Microsatellite), SNP (Single nucleotide polymorphism) ve RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA; Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)'tır. Bu yöntemler gelişmiş ülkelerde hayvan ıslahı ve genetiği alanında da kullanılmaya başlanmış, hayvanlarda ırk içi ve ırklar arası genetik varyasyonlar belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Hayvanlarda kantitatif karakterleri kontrol eden genlerin moleküler düzeyde incelenmesi, ıslah programlarında hayvansal ürünlerin daha verimli ve ekonomik olarak elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Son yıllarda kantitatif özellikleri kontrol eden genlerdeki farklılıkların nükleotid düzeyinde tespit edilmesinden dolayı QTN (Quantitati ve Trait Nucleotide) ifadesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde hayvanlarda verim özellikleri üzerine etkili QTL ve QTN' lerin tanımlanması çalışmaları hızlı bir şekilde devam etmektedir. Genom dizilimindeki tek bir nükleotidin değişimi ile oluşan DNA dizilimindeki çeşitlilikler tek nükleotid polimorfizm (SNP) olarak tanımlanmaktadır.

Genetik varyasyonun modern bileşeni tek nükleotid polimorfizmleri Single Nucleotide Polymorphism'dir. SNP'ler insan genomunda yüksek olasılıkla ortaya çıkan tek baz çifti değişiklikleri olarak görülmektedir. Bu baz değişikliklerinin boyutu tamamen bilinmemekle birlikte 3 milyar bazdan meydana gelen insan genomunda 10 milyon SNP'in bulunduğu öngörülmektedir. Bu genetik çeşitliliğin temelinde SNP'ler bulunur. SNP'ler insan genomunda genetik varyasyonun en yaygın formundan biridir. Birçok SNP insan popülasyonunun büyük bir çoğunluğunda dikkat çekici şekilde ortaktır. SNP'ler bazı koşullarda genetik

varyantların tersine genetik rahatsızlıkların nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. SNP'ler hastalığın gelişimi, hastalığa yatkınlık ve hastalıkların tanısında yararlanılan yararlı moleküler belirleyicilerdir. Son yıllarda yapılan birçok çalışmalar ile hastalığa yatkınlık, hastalığın tanısı ve hastalığın şiddetiyle ilgili insan genomunda birçok SNP tanımlanmış ve bunlar ilişkilendirilmiştir. Hastalığın tanısı, hastalığın ilerleyişi ve hastalık riskinin tanımlanması amacıyla ile benzer yapılan çalışmalar ülkemiz dışında da farklı toplumlarda çalışılmıştır (Akbulut ve ark., 2015).

1.4. Doğum Ağırlığını Etkileyen Faktörler

Canlılarda, zigot halden ergin yaşa gelinceye kadar pek çok önemli değişiklikler görülür. Görülen bu değişiklikler büyüme ve gelişme olarak tanımlanmaktadır. Büyüme, canlının ergin canlı seviyesine gelinceye kadar gösterdiği ağırlık artışıdır. Gelişme ise canlının vücut şeklinin ve yapısının çeşitli fonksiyonları yapabilecek seviyede değişikliğe uğramasıdır (Akçapınar ve Özbeyaz, 1999). Hayvanların verim seviyesine ulaşana kadar olan büyüme ve gelişme dönemleri yetiştiricilikte çok büyük önem taşır. Bu dönemlerde büyüme ve gelişme kabiliyeti ile yaşama gücünü etkilemekte olan etkenlerin önemi ve derecesinin bilinmesi ve gereken tedbirlerin zamanında alınması yetiştiricilikte ekonomikliği sağlar (Akçapınar ve Kadak, 1982). Büyüme ve gelişme doğum öncesi ve doğum sonrası olmak üzere iki ana bölümde, doğum sonrası büyüme ise süt emme dönemi ve süt kesim sonrası büyüme olarak iki alt bölümde incelenmektedir.

Doğum öncesi büyüme, doğum ağırlığını ortaya koyar ve ırk, cinsiyet, ananın yaşı, doğum tipi, ana ve babanın canlı ağırlıkları, ananın bakımı ve beslenmesi gibi birçok faktörlerden etkilenmektedir (Akçapınar ve Kadak, 1982).

Büyümenin karakteristik özelliği olan ağırlık artışı, gebeliğin ilk dönemlerinde doğal olarak çok daha düşüktür. Gebelik ilerledikçe bu hız artar, gebeliğin son 4 ile 5. haftalarında en yüksek seviyeye ulaşır ve kuzular doğduğu zaman normal doğum ağırlığını kazanmış olurlar. Bir canlının doğum ağırlığı ile çeşitli dönemlerdeki canlı ağırlıkları genotip ve çevresel faktörlerin etkisi altında şekillenir (Demirsoy ve ark., 1997). Kuzuların doğum sonrası dönem büyüme hızına etkisi yönünden ananın verim

gücünü ifade etmesi bakımında doğum ağırlığı önemli bir yere sahiptir. Doğum ağırlığı her hayvan türünde farklılık göstermektedir. Sığır atlar ve gibi iri yapıya sahip türlerin yavruları büyük ve ağır, domuz, koyun ve keçi gibi bir doğumda birden fazla yavru dünyaya getiren türlerin yavruları daha küçük ve hafif olur. Tekiz doğumlarda yavrular büyük, çoğuz doğumlarda ise yavrular daha küçüktür (Arıtürk, 1982).

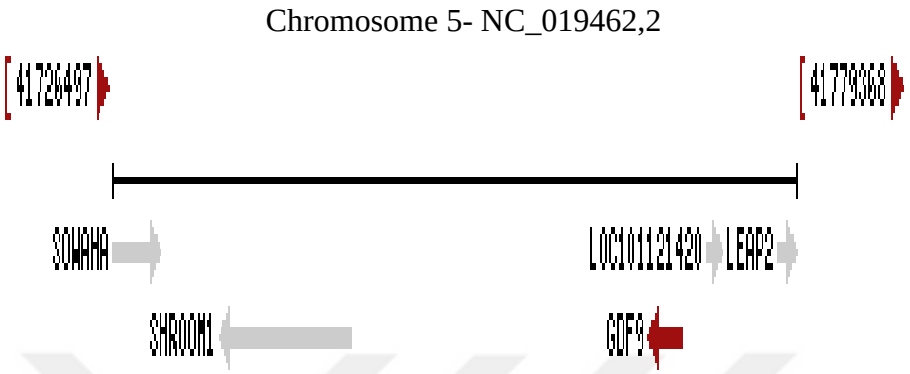
Üretim, insanların gereksinmelerinin doğa tarafından tam olarak karşılanamaması sebebiyle ortaya çıkan bir faaliyet, kalite ise bir ürün ya da hizmetin özelliklerinin insan topluluklarında istek potansiyelini yerine getirebilme derecesi olarak tanımlanmaktadır. Kalite ayrıca en iyi demek değildir. Amaca göre kalite kavramından anlaşılması gerekenler değişebilir. Büyümeyi karakterize eden özelliklerden en önemlileri çeşitli dönemlerdeki canlı ağırlıkları ve doğum ağırlığıdır. Gerek kuzuların doğum sonrası dönemde büyüme hızına etkisi bakımından gerekse ananın üretim gücüne etki etmesinden dolayı, büyüme ile ilgili olarak canlının doğum ağırlığı ve çeşitli dönemlerindeki canlı ağırlıkları kalite göstergesi olarak kullanılabilir.

1.5. Koyunlarda GDF9 (Growth/Differentiation Factor 9) Geni

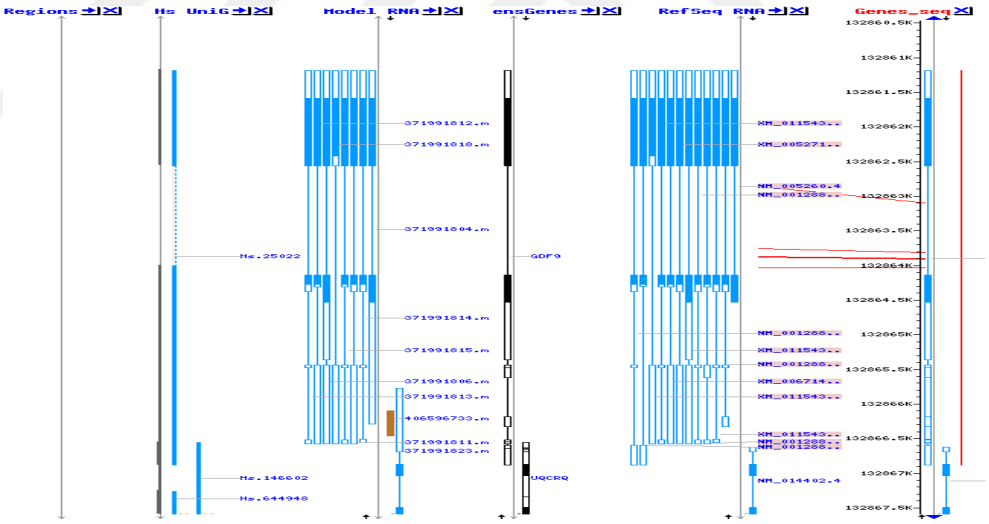
Koyunlar birçok farklı ırka sahip olduklarından dolayı ovulasyon oranı ve doğurganlık gibi fizyolojik özellikleri bakımından büyük çeşitlilik göstermektedir. Koyunların ovulasyon oranındaki farklılıklar birçok genin etkisi altında kalmaktadır (McNatty, 2005). Koyunlarda ovulasyon ve döl verim üzerinde etkili olan genlerden biride GDF-9 genidir (Davis ve ark., 2005). Koyunlarda ovulasyon ve doğum oranına etkisi olan GDF-9 geni yaklaşık 2.5 kb uzunluğunda olup 2 ekzon 1 intron bölgesi içerir. EkzonI 397bp, EkzonII 965bp ve İntronI 1126bp uzunluktadır. Bu gen 453 amino asitten oluşur (Sadighi ve ark., 2002).GDF9 geni üremede oldukça önemlidir (Miller ve ark., 1988).

GDF9 yumurtalık primer folikül geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Juengel ve ark., 2004). Bu oositin hücre büyümesinin yanı sıra farklılaşmasını ve

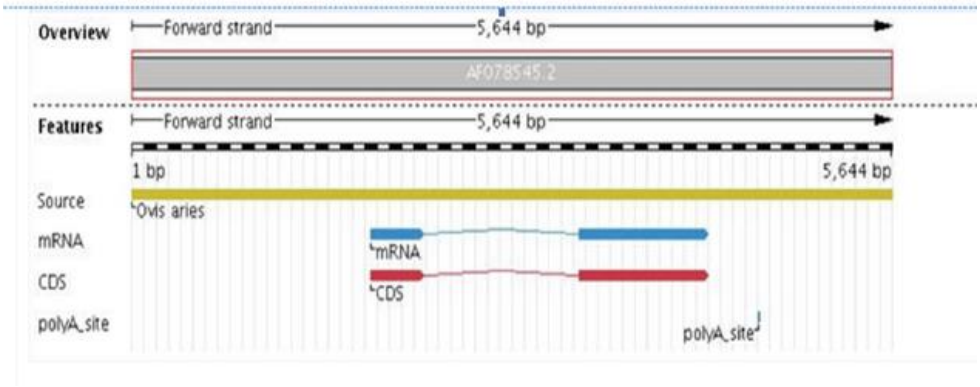
olgunlaşmasını sahiptir (Hreinsson ve Scott, 2002). GDF9 Geni Ekzon 2 Bölgesi SNP listesi çizelge 1.2.'de GDF9 geni amino asit sekansı 1.4. ve 1.5.'de verilmiştir.



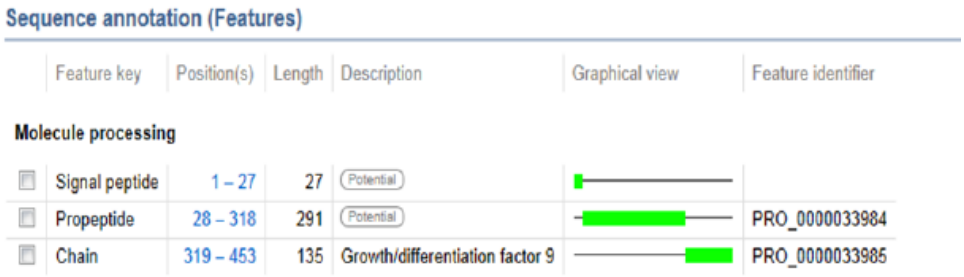
Şekil 1.2.Gdf 9 geni kromozom bölgesi



Şekil 1.3. Gdf9 Geni kromozomal lokasyonu



Şekil 1.4. GDF9 aminoasit sekansı



Şekil 1.5. GDF9 amino asit sekansı

Çizelge 1. 2.GDF9 Geni Ekzon2 Bölgesi SNP Listesi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)

SNP Kod	SNP Pozisyonu	Mutasyon	Sekans
rs161873285	5:41769076	M	TTAAACAGCAGATCCACTGATGGAA [A/G] GGTTCCTGAGAAGAAAAACAATCCA
rs160076413	5:41769002	S	AAGAAATGGAGTTGTTGAAAGTATA [C/T] AGCAAGACTGACTTGAATAAATGTT
rs160076412	5:41768883	M	CTTTCTAAATTCAAACTGTGAGTTA [A/T] AGGTAAATGAGTATGGAGCTCTAGG
rs160076411	5:41768843	M	CAAGAGGAGCTGTCACATCAATCTC [A/C] ATCCATTTGTATTTCTTTCTAAATT
rs160076410	5:41768828	S	AGGCCACCAGAGGCTCAAGAGGAGC [C/T] GTCACATCAATCTCAATCCATTTGT
rs160076409	5:41768760	M	TGAAGGATGCTGCAGCTGGTCTTTC [A/G] CACATGTAAAATTTACAGACATGTG
rs160076407	5:41768732	S	GAGTCATGTTAAACAGGCTGTCCCG [C/T] GCTGAAGGATGCTGCAGCTGGTCTT
rs160076406	5:41768701	M	AGATATAGAAGCAGTGAGGGCGCTA A/C] GAGAAGAGTCATGTTAAACAGGCTG

rs160076405	5:41768683	S	TGAGCACTTGTGTCGTTCAGATATA [A/G] AAGCAGTGAGGGCGCTAAGAGAAGA
rs160076404	5:41768681	S	CCTGAGCACTTGTGTCGTTCAGATA [C/T] AGAAGCAGTGAGGGCGCTAAGAGAA
rs160076403	5:41768607	M	AGACAGCCCTCTCTTCTGGTCAGGA [C/T] CCTGTGAAGGCTTCCTTTTAGGGTG
rs160076402	5:41768585	S	CTTCTTCTCCCACGGGGTAGGCAGA [C/G/T] AGCCCTCTCTTCTGGTCAGGACCCT
rs160076401	5:41768541	M	CTCCTGGTCTCTCCGGTGACGGGAC [A/G] ATCTTACACCCTCAGCAGCTTCTTC
rs160076400	5:41768528	S	CAGAGCTGACACTCTCCTGGTCTCT [C/G] CGGTGACGGGACAATCTTACACCCT
rs160076398	5:41768473	M	TGTTTGAAGTATTCACTCAGATTGA [A/C] TGAAGCTGGAACCAGAGGCTTCTTC
rs160076397	5:41768390	S	CCACAATCCAGTTGTCCCACTTCAG [C/T] TGACTAAAGCTAAGTCTAAAGTCAT
rs160076396	5:41768291	S	TGATGTTCATCACCATGGTGTGAAC [C/T] GGAGAGCCATACCGATGTCCGACCG
rs160076393	5:41768207	S	GCTCGATGGCCAAAACACTCAAAGG [A/G] CTATACTTGGCAGGTACACAGGATG
rs160076392	5:41768168	S	TCATATCTTCATATTCTTTATAAGC [A/G] ATTGAGCCATCAGGCTCGATGGCCA

M: missense, S: synonymous codon

Bu çalışma ile, İvesi koyunlarında GDF9 geninde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) araştırılmıştır. İvesi koyunlarının doğum ağırlığı belirlendi ve popülasyonda GDF9 geni SNP genotipleri ile doğum ağırlığı ile ilişkiler tespit edilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ricordeau ve ark. (1990), Finn ve Romanov koyunları gibi bazı koyun ırklarında ovulasyon oranı ve ayrıca doğumda kuzu sayısı her biri çok küçük etkiye sahip farklı bir dizi gen tarafından belirlenirken bazı ırklarda ise bu karakterlerin fekondite (Fec) geni olarak adlandırılmakta olan majör etkisi olan tek bir gen veya birbiri ile bağlantısı olan bir grup gen tarafından belirlendiğini düşünmektedir fakat yüksek fekonditeye sahip bireylerde, genom üzerindeki konumu, baz (Nükleotid) dizilimi ve fonksiyonu çok daha önceden belirlenip bazı genler üzerinde tek bir baz değişimi ile sonuçlanan mutasyonların olduğunu belirlemişlerdir.

Koyuncu ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada doğum ağırlığını etkileyen bazı faktörleri araştırmak istemiş ve araştırmasında Bandırma Hayvancılık Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilmekte olan Karacabey Merinoslarının 3yıllık üremesine sahip bilgileri kayıt altına almışlardır. Kuzuların cinsiyeti, doğum ağırlığı, doğum tipi, doğum tarihi, ana ve babalarına ait verileri kaydetmiştir. Çalışmada Karacabey Merinosu koyunlarında doğum ağırlığı üstünde ana yaşının, cinsiyetin ve doğum tipinin çok önemli olduğunu bulmuştur. Doğum ağırlığının kalıtım derecesi 0.23±0.176 olarak hesaplamış. Doğum ağırlığı üzerinde hesaplanan tekrarlanma derecesi 0.26±0.079 olarak hesaplamıştır.

Doğan ve ark. (2003), çalışma doğum ağırlığı üzerinde etkisi görülen doğum tipi ve cinsiyetin araştırılması amacıyla (Akkaraman, Dağlıç, İmroz, İvesi, Kıvırcık, Karacabey Merinosu, Morkaraman, Konya Merinosu, Sakız vb.)kuzularında analizler yapmış. Çalışmada META analizine uygun olan çalışmalardan elde edilen bilgileri kullanmış ve Z testi kullanarak test etmiştir. Sonuç olarak erkek cinsiyetin dişiye, tek olan doğum tipinin ikiz doğuma göre doğum ağırlığını daha çok etkilediğini tespit etmiştir.

Hanrahan ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada mutasyonlarının belirlenmesi, varsayılan majör genleri (Thoka, Belclare, Cambridge, Javanese, Olkuska,

Woodlands ve Lacaune) taşıyan diğer popülasyonların mutasyonlara sahip olup olmadıklarını araştırmıştır. Cambridge ve Belclare koyunları yüksek ovulasyon oranı ve bu karakterde bireyler arasında aşırı varyasyonla karakterize olmaktadır. Ayrıca Inverdale koyunlarında gözlenen kısırlığa yol açan ovaryum anormallikleri bu ırklarda da belirlemişlerdir. Ovaryum anormalliklerinin ve döl verim kayıtlarının değerlendirilmesi her iki ırkta da ovulasyon üzerinde etkili olanlarda biri otozomal kalıtım yolu izleyen iki majör genin dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir. Ovaryum anormalliklerinin nedenini belirlemek üzere aday gen yaklaşımı kullanarak Cambridge ve Belclare koyunlarında yüksek ovulasyon oranına ilişkin mutasyonun olup olmadıklarını araştırmışlardır. Bu bağlamda kayıtları bulunan sürülerde growth differentiation factor 9 (GDF-9) ve BMP15 genlerinde baz dizilimi belirleme çalışması yapmışlardır.

Eliçin ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada ivesi ırkı kuzuların doğum ağırlıklarına ait kalıtım derecesi tahmininde etkisinin olduğu düşünülen baba familyasını araştırmıştır. Verimin artırılmasına yönelik çalışmalarda söz konusu olan özellikleri ait genetik parametrelerin araştırılması ve bilinmesi önem arz etmektedir (Misztal 1990). Çalışmasında doğum ağırlığına ait bilgiler 17baş damızlık koç ve 1062 baş tekiz kuzulardan veriler toplamıştır. Kalıtım derecesinin tahminlerini farklı sayılardaki (10, 15'e 17) baba bir üvey kardeşler familyasın dan elde edilen bilgilerden hesaplamıştır. Kalıtım derecesinin tahminini etkili olduğu düşünülen Bireysel Hayvan Modeli olan (animal model) esas alarak MTDFREML programını kullanmıştır. Sonuç olarak doğum ağırlığı kalıtım derecesi Baba -bir üvey kardeş familya sayısı 10 olduğu zaman 0.15, baba familya sayısı 15 olduğunda 0.22 ve baba familya sayısı 17 olduğu zaman ise 0.31 olarak hesaplamışlardır. Bu sonuçlara bakılacak olursa baba familya sayısı yükseldiği zaman kalıtım derecesinide arttırdığını göstermişlerdir.

Polley ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada, Hindistan prolifik siyah Bengal keçilerinde fekundute genlerinde (BMPR1B, BMP15 and GDF9) polimorfizmleri araştırmışlardır. Keçiler de sadece BMPR1B geninde FecBB ve FecB+ genotiplerini belirlediklerini ve frekanslarını ise sırasıyla 0.57 ve 0.43 olarak hesaplamışlardır.

BMP15 ve GDF9 genlerinin bilinen tüm nokta mutasyonları bakımından monomorfik olduğunu tespit etmişlerdir. BMPR1B geninde, taşımayan, heterozigot ve homozigot taşıyıcı genotiplerde döl verimini sırasıyla 2.7, 3.04 ve 3.11 olarak bulmuşlardır.

Nicol ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada doğurganlığın kontrolü, memelilerin yavru sağ kalımının belirlenmesinde kritik önemini araştırmışlar. Primatların ve büyük çiftlik türlerinin yaygın olarak tek bir yavruya sahip olması için, esas olarak ovulasyon hızı ile düzenlenir. Daha önce, koyunlarda doğal olarak düşük yumurtlama oranını arttıran birkaç mutasyon tespit edilmiştir; Bazı durumlarda homozigot koyunlar kısırdır. Bu çalışmada, İzlandalı Thoka koyunlarında bulunan büyüme farklılaşması faktörü 9'da (GDF9) yeni bir mutasyonun ayrıntılı bir karakterizasyonunu belirlemişlerdir. Bu mutasyon, olgun GDF9 proteininin C-ucunda, normal olarak oositlerde gelişmenin tüm aşamalarında ifade edilen, muhafaza edici olmayan bir amino asit değişimine (S109R) yol açan tek bir baz değişimi olduğunu göstermişler. (A1279C). Üreme kayıtlarının bulunduğu tüm hayvanların genotiplendirmesi, bu mutasyonun, heterozigot koyunlarda artan doğurganlık ve homozigotlarda infertilite ile ilişkili olduğu doğrulamışlardır. Homozigot ovarian morfolojisinin ve normal olarak büyüyen foliküllerde aktive edilen bir dizi genin analizi, GDF9'un oosit aktivasyonunda yer almadığını, ancak follikülün ileriki gelişmesinde olduğunu göstermiştir. Bu çalışmasında, fertilitenin düzenlenmesinde oosit faktörlerinin önemini vurgulamış ve biyolojik olarak aktif GDF9 üretmek için gerekli potansiyel olarak dimerizasyon veya translasyonel modifikasyonların yapısal analizi ve araştırması için yeni bilgiler sağlamıştır. Ayrıca bu hayvanların koyun üretimini arttırmak için kullanılması için bir temel oluşturmuşlardır.

Monteagugudo ve ark. (2009), Kemik Morfogenetik Protein 15 (BMP15) geninde 17 bp'lik bir silinme, Rasa Aragonesa koyun cinsinde artmış prolificacy ile ilişkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Kemik Morfogenetik Protein 15 (BMP15) ve Büyüme Fark Etkileyen Faktör 9 (GDF9) genlerindeki farklı mutasyonlar, koyunlarda doza duyarlı bir şekilde yumurtlama hızının ve infertilitenin artışına

neden olmuştur. Heterozigotlarda ovulasyon hızı ve ikiz ve üçlü doğumlar, homofizlerde ise toplam infertiliteye neden olmuştur. İspanyol cinsi Rasa Aragonesa'da bulunan, koyun BMP15 geninin ikinci ekzonuna yeni bir mutasyon sunmuşlar. Açık okuma çerçevesinin ve erken durma kodonlarının yer değiştirmesi ile sonuçlanan 17 bp'lik bir silme işleminden oluşmuştur. Sonuç olarak, BMP15 proteininin ikinci ekzonundaki yabani tipli aminoasitik zincir sekansının yaklaşık %85'i, 245 orijinalinin sadece ilk 45 amino asidi muhafaza edildiğinde modifiye edilip veya bastırılmış olgun peptid kaybolmuş, bu silme için heterozigot körler, 1.36 kuzunun ortalama sürüsel verimliliği ile karşılaştırıldığında çok yüksek verimlilik (2.66 kuz / doğum) gösterdiğini belirtmiştir. Silme, diğer mutasyonlarda erken durdurma kodonlarının etkisine kıyasla, BMP15'in ikinci ekzonunun tam işlevsellik eksikliğine neden olduğunu tespit etmişler.

Silva ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada Brezilya Santa Ines (SI) popülasyonundan 23 koyunda büyüme ve farklılaşma faktörü9 da yeni bir polimorfizm geninin yumurtlama oranına etkisini ve polimorfizm tespit etmek amacıyla çalışmışlardır. Koyunlar Booroola SNP (FecBB) için genotiplendirmişlerdir. Olgun peptitin muhafazakâr bir konumunda bir fenilalaninin bir sistein ile ikame edilmesine yol açan, FEcGE (Embrapa) olarak adlandırılan yeni bir GDF9 alleli bulmuşlardır. FECGE allelini sunmakta olan homozigot koyun yumurtlama hızında (%82) ve verimlilikte (%58) bir artış olduğunu göstermişlerdir ancak FecGE varyantının alelik etkileşimlerini aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu bu yeni fenotipin follikül gelişiminin genetik kontrolünü daha iyi anlamak için çok yararlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Kasiriyan ve ark. (2011), Kemik morfogenetik proteini 15 (BMP15) ve Büyüme Farklılaştırma Faktörü 9 (GDF9) genlerindeki farklı mutasyon olup olmadığını incelemişlerdir. Bu çalışmasında Dam Meyve Hayvan Islah Merkezi'ndeki İran'da bulunan 150 Sangsari koyun ırkından kan pıhtısı (140 akbaba ve 10 koç) ilk önce anti-pıhtılaşma maddesi (EDTA) kullanılarak almışlar ve daha sonra DNA içeriklerini tuzlayıp ve ekstre etmişlerdir. İki çift özel primer kullanılarak iki DNA fragmanı, GDF-9'un (462 bp) ekson 1'inden ve BMP15'in (141 bp)

genlerinden ekzon 2'den amplifiye etmişlerdir. Elde edilen PCR ürünlerini ve sırasıyla GDF9 ve BMP15 genleri için HinfI kısıtlama enzimleri kullanılarak kesmişlerdir. Ezim, GDF9 lokusunda bir G ila A substitüsyonu göstermiştir. ÇalışmadaBMP15 geni polimorfik olmadığını ancak İncelenen İran Sanghsari koyunlarında GDF9 polimorfik olduğunu tespit etmişler.

Yosefabad ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada, Markhoz keçilerinde Büyüme Faktörü beta (TGF $) süper ailesi Dönüşümü gelen Büyüme Farklılaşma Faktör-9 (GDF9) mutasyon tespit etmek için yapmışladır. Bu genin hayati bir öneme sahip olduğunu vurgulamışlardır Yumurtalık folikül gelişimi, yumurtlama hızı ve doğurganlıkta etkili olduğunu belirtmişler. Markhoz keçilerinden kan örnekleri almışlar standart fenol kloroform yöntemi kullanılarak DNA ekstre etmişler. Ekzon 1 ve 2 bölgesi için primerler tasarlamış, ekson 1 ve 2'nin uzunluğu, sırasıyla 463bp ve 997bp olduğunu belirlemişler. PCR ürünlerini,%1.2 agaroz jel elektroforez tekniği kullanılarak test etmiş ve sonuç olarak istenen fragmanlar doğru yükseltilmiş ve mutasyon tespit etmişlerdir.

Chu ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada Küçük Kuyruklu Han koyunlarının prolificacy için aday bir gen olarak GDF9 gen polimorfizm tespit etmeye çalışmışlardır. Kuzu GDF9 gen dizisine göre altı çift primer, her iki yüksek GDF9 geninin iki ekzonunun tek nükleotid polimorfizmlerini saptamak üzere tasarlamışlardır. (Small Tail Han sheep) ve düşük doğurganlık ırkı (Dorset koyunu) polimeraz zincir reaksiyon- tek sarmallı konformasyon polimorfizmi (PCR-SSCP) ile test etmişlerdir. Sadece 2-1 ve 2-2 primerleriyle güçlendirilen ürünler görüntülemişlerdir. Sadece Primer 2-1 için, her iki koyun ırkında da üç genotip (AA, AB ve BB) tespit etmişlerdir. Dizilim, Belclare ve Cambridge koyunlarında GDF9 geninin G3 mutasyonu olarak bilinen AA ile karşılaştırdıklarında BB genotipinde GDF9 geninin ekzon 2'sinde bir sessiz mutasyonu (G477A) ortaya çıkarmışlardır. Primer 2-2 için her iki koyun ırkında da iki genotip (CC ve CD) tespit etmişlerdir. Dizilim, ekzon 2'de tek bir nükleotid mutasyonunu (G729T) ortaya çıkarmışlardır. GDF9 geninin allel D'sinin Küçük Kuyruklu Han koyunlarında verimi iyileştirmek için potansiyel bir genetik belirteç olduğunu belirtmişlerdir.

Gürsel ve ark. (2011), yaptıkları çalışmalarında Türkiye'deki yerli ırk koyunlarımız arasında yer almakta olan İvesi, İmroz, Sakız, Kıvırcık ırkı koyunlarında çoklu gebeliği etkilediği düşünülen BMPR-1B, BMP ve GDF-9 genlerindeki mutasyonları araştırmışlardır. Çalışma kapsamında her bir ırktan birbirleriyle akrabalık bağı bulunmayan 50 adet koyun kullanılmıştır. Bulunan tüm hayvanlardan kan toplamış ve DNA izolasyonu yaptıktan sonra, BMPR-IB, BMP-15 ve GDF-9 genlerindeki hedeflenmiş bölgeler PCR ile çoğaltmaya çalışmıştır. GDF-9 geninde yer almakta olan mutasyonlarındaki genotipler heterozigot olarak bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmada heterozigot genotip ile çoklu doğum arasında pozitif korelasyon olduğu düşüncesini öne sürmüşler. Fakat Sakız ırkı koyunların bir batımdaki ortalama doğum sayısının 2 veya üzeri olmasına rağmen çalışmanın sonunda bunun incelenmekte olan genlerdeki mutasyonlardan etkilenmediğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca daha sonralarda yapılacak olan çalışmalarda özelliklede sakız ırkı koyunlarında çoklu doğumun genetik olarak açıklanması amacıyla farklı genlerin incelenmesinin de gerekli olduğu belirtmişlerdir.

Roy ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada Hindistan Bonpala koyunlarında bilinen doğurganlık genlerinin polimorfizminin belirlemek için çalışmışlar. Hindistan'ın Batı Bengal'in kuzey ilçelerinin köylerinden çiftçiler tarafından yetiştirilen 97 Bonpala koyundan farklı örneklerde kan örnekleri toplamışlardır. Düzenli bir koyun çiftliği bulunmadığından ve tüm örnekler kırsal çiftçiden toplandığı için, yaş, çiftlik vb. ile ilgili veriler kayıtlı değilmiş. Her bir hayvanın yaklaşık 10 ml'lik kan örnekleri juguler damardan toplamışlardır. DNA, standart fenol-kloroform yöntemi ile izole etmişler. Tetra primer amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi PCR kullanarak, 97 Bonpala koyunların BMP1B, BMP15 ve GDF9 genlerinin 11 noktalı mutasyonları genotiplendirmişlerdir. BMPR1B geninin FecB lokusunun ve GDF9 geninin iki lokusunun (G1 ve G4) polimorf olduğu bulmuşlar. FecB lokusunda, yabani tip (Feciş, 0.02), heterozigot (FecBş, 0.23) ve mutant (FecBB, 0.75) olmak üzere üç genotip belirlemişler. GDF9 geninin G1 lokusunda, üç genotip, yani yabani tip (GG, 0.89) heterozigot (GA, 0.10) ve mutant (AA, 0.01) saptamışlar. G4 lokusunda GDF9 geni, üç genotip, yani, yabani tip (AA, 0.01), heterozigot (AG, 0.14) ve mutant (GG, 0.85) tespit etmişlerdir. İstatistiksel

olarak bu cins, FecB, G1 ve G4 lokuslarının polimorfizm ile litre büyüklüğü arasında anlamlı bir korelasyon bulamamışlardır. BMP15'in beş lokusu ve GDF 9 genlerinin üç lokusu monomorfik olarak tespit etmişler. Bu çalışma, iki farklı doğurganlık geninin (BMPR1B ve GDF9) üç önemli lokusundaki (FecB, G1 ve G4) eşzamanlı polimorfizmin bulunduğu ilk koyun cinsi Bonpala koyunu olarak rapor etmişler.

Moradband ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada İran 152 Baluchi koyununda GDF9, BMP15 ve BMP15-1B mutasyon olup olmadığını tespit etmek için çalışmışlardır. Beklenen 462 bp büyüklüğündeki bir DNA fragmanı, GDF9 geninin ekzon I'inden amplifiye etmişlerdir. GDF9 eksonundaki G'den A'ya bir nükleotid değişikliği, 462-bp'lik PCR fragmanının 260 nükleotidinde bir HhaI restriksiyon enzim bölünme bölgesini (GCGC'den GCAC'ye) bozar. Çalışmada İran Baluchi koyun cinsi seçilen bu popülasyonunda FecXG ve FecB mutasyonlarının mevcut olmadığını göstermeyi amaçlamışlardır. FecG + (0.82) vahşi tipli alel frekansı FecG1 (0.18) mutant allel frekansından daha yüksek olduğunu belirlemişler ve FECG + / FecG +, FecG + / FecG1 ve FecG1 / FecG1 genotiplerinin frekansı sırasıyla GDF9 lokusunda 0.72, 0.20 ve 0.08 olarak hesaplamışlardır.FecG1 geninin önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.BMP15 ve BMP15-1B lokusu için vahşi tipli aleller tespit edilmiş ve tüm bireylerin FecB ve FecXG mutasyonları için taşıyıcı olmadığı bulmuşlar ancak GDF9 loküsünde bir G ila A nükleotid ikamesinin bulunduğu belirlemişler. Heterozigot (FecG + / FecG1) ve homozigot (FecG + / FecG +) taşıyıcı olmayan koyunlar sırasıyla homozigot (FecGl / FecG1) taşıyıcı koyunlardan 0.35 ve 0.21 daha fazla kuzuya sahip olduğunu tespit etmişler. ($p<0.05$).GDF9 lokusundaki FecG1 mutasyonu üzerinde yapılan polimorfizm analizi sonucunda bu seçilen popülasyonda prolififikasyonda önemli bir gen kalıtımını göstermişlerdir.

Mohammadi, (2012), yaptıkları çalışmada iki koyun ırkında (Lory-Bakhtiari ve Arapça) FecXB, FecXG, FecXH, FecXI, FecB ve FecGH mutasyonlarının belirlenmesini amaçlamıştır. FecX, FecB ve FecG genleri TGFβ süper ailesine ait genlerdir. Bu genlerin koyunlarda litre büyüklüğü ve yumurtlama oranı üzerinde katkı etkisi düşünmüştür. Genetik belirteçler hayvan genetik potansiyelinin

değerlendirilmesinde en iyi yöntemlerden birisi olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışmasında, Lory Bakhtiari (50 koyun) ve Arap ırkı (50 koyun) üretken koyunlarından 100 kan numunesi toplamış. Kan örneklerinin DNA'sı modifiye tuzlama yöntemi ile çıkarmıştır. Mutasyon bölgesi, spesifik primerler kullanılarak amplifiye edip ve PCR ürünlerini, FecXB, FecXG, FecXH, FecXI, FecB ve FecGH mutasyonları için özel sınırlandırılmış enzimler ile sindirmiştir. Sonuç olarakİran Lory-Bakhtiari ve Arap koyun ırklarında FecXB, FecXG, FecXH, FecXI, FecB ve FecGH mutasyonları tespit edildiğini göstermiştir.Bu nedenle, FecXB, FecXG, FecXH, FecXI, FecB ve FecGH mutasyonları bu ırklarda çoğalmaya neden olmamıştır ve bu tür ırklarda doğurganlık genleri ile litre büyüklüğü ve yumurtlama oranı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu tespit etmişlerdir.

Vage ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada Norveç beyaz koyunlarındaki GDF9 mutasyonunu yumurtlama hızını etkilediği düşünülmeyen GDF9 geninin bir polimorfizmi Norveç beyaz koyunlarında da tespit etmeye çalışmışlardır. Norveç beyaz koyunları, yerel ve yabancı üretken ırklar arasında bir geçiş olan sentetik bir ırktır. Norveç beyaz koyun popülasyonunda, c.1111G> A SNP, Illumina 50K kuzu SNP çipi üzerindeki diğer tek SNP'lerden daha güçlü bir ilişki gösterdiğini bildirmişlerdir.GDF9 proteininin biyoaktif bölümünde bir missense mutasyonu tespit etmişlerdir. Tahmini üreme değerlerine dayanarak, c.1111A için homozigot olan AI koçlarının kızları, yabani tipli koçların kızlarına göre en az 0.46-0.57 daha fazla kuzu üreteceğini belirtmiştir. Mutasyon, kızlarının yavru sayısına göre aşırı yüksek ve düşük üreme değerlerine sahip koç taramasından sonra tespit etmişlerdir. Mutasyon, GDF9 proteininin biyoaktif bölümünde ve genin olgun bölgesinde bulunur ve bir amino asit ikamesi olduğunu belirtmişler. Mutasyonun Norveç ırkları arasındaki doğurganlığı artırmak amacıyla 1970'lerde meydana gelen üretken Fince arazisi ile melezlenmesinden kaynaklandığı tahmin etmişlerdir. Homozigot koyunlar verimli olduğundan, bu mutasyon ticari kullanım için koyun üreticileri arasında üretkenliği artırmak için büyük önem taşıdığını üreme performansı kayıtları olan daha büyük miktarlarda koyun da dahil olduğu bu polimorfizm üzerine daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğine karar vermişlerdir. Bu ırktaki polimorfizm GDF9 yumurtlama

hızında bir artışa neden olduğunu belirtmişler. Koyun genotiplendirmesiyle yumurtlama oranı üzerindeki etkisini tahmin etmişlerdir.

Shafieiyan ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, İran Lorestan vilayetinin Lory koyun cinsi FecB ve FecGH genlerinin muhtemel mutasyonlarını belirlemek amacıyla yapmışlardır. Altmış kan numunesi toplamışlar ve DNA tamamen taze kanından ekstre etmişler. FecB ve FecGH mutasyonlarının saptanması için, PCR ürünleri AvaII ve DdeI ile sınırlandırılmış enzimler ile inkübe etmişler. Elde edilen verilere dayanarak, FecB ve GDF9 genleri, tüm numunelerde çoğaltmışlar. PCR ürünlerinin elektroforezi sırasıyla FecB ve GDF9 geni için 190 bp ve 139 bp bantları gösterdiğini belirtmişler. FecB mutasyonları, dünyanın en üretken koyun ırklarının Avustralya Booroola Merino, Hint Garole, Endonezya Cava, Smalltailed Han ve Çin'in Hu koyunlarında bildirildiğini ve FecGH mutasyonun ise sadece Belclare ve Cambridge koyunlarında bildirildiğini gözlemleyip bu çalışmada da mutasyonun olabileceğini düşünmüşlerdir ancak bu çalışmada, FecB ve FecGH'yi aday olarak kullanmalarına rağmen, mutasyonları Lory koyun cinsinde bulamamışlardır. Bu koyun ırk popülasyonunda FecB ve FecGH mutasyonlarını tespit edememişlerdir, böylece bu mutasyonların, Lory'nin yüksek verimliliğinin sebebi olamadığını göstermişlerdir. Ayrıca bu koyun cinsinde daha fazla çalışma yaparak yüksek verimliliğinin genetik veya çevresel nedenlerini belirlemek için gerekli olduğunu belirtmişlerdir.

Tang ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada 174 Çin Holstein ineğinde Sığır GDF9 gen polimorfizmini incelemiş ve yüksek ovulasyon performansıyla ilişkisini analiz etmişler. Büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9), transforme edici büyüme faktörü β süper ailesine ait olduğunu ve yumurtalık folikül gelişiminde ve ovulasyon hızında kritik bir rol oynadığı üzerinde durmuşlardır. Sığır GDF9 geninin dizilimine dayanarak, altı çift primer, polimeraz zincir reaksiyonu-tek telli konformasyon polimorfizmini kullanarak GDF9'un ekson 2 ve intron 1'in tek nükleotid polimorfizmlerini saptamak üzere tasarlamışlardır. Yalnızca primer 3-1 ile amplifiye edilen ürünler polimorfizm sergilemiştir. Bu amaçla kullanılan 174 Çin Holstein ineğinde, GDF9 geninin intron 1'inde A485T ve A625T'nin iki mutasyonunu ortaya

çıkarmışlardır. Bu analiz sonucunda, A485T ve A625T'nin bu iki tek nükleotid polimorfizminin transfer edilebilir olduğunu embriyo sayısı üzerine önemli etkileri olduğunu ve A625Tpolimorfizmi toplam sayı ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu göstermiştir ($P < 0.05$). Buna ek olarak, A485T Polimorfizmlerin transfer edilebilir embriyo sayısı üzerinde önemli bir etkisi tespit etmişlerdir. ($P < 0.05$).Bu çalışmanın sığır GDF9'taki iki polimorfizmi tanımlayan ve Çin Holstein ineklerinin yüksek ovulasyon özellikleriyle olan korelasyonlarını tanımlayan ilk çalışma olduğunu göstermişlerdir.

Mullen ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada iyi bilinen yüksek verimli bir koyun cinsi olan Fin Landrace (Finnsheep) iyi bilinen yüksek verimli bir koyun cinsi olduğunu ve birçok ülkede yerel ırkların verimliliğini artırmak için genetik materyal kaynağı olarak kullanıldığını belirtmiştir. Bugüne kadar yapılmış olan analizler, yumurtlama oranı üzerine büyük bir etkiye sahip olan mutasyonların Finnsheep' in sıra dışı üretkenliğinden sorumlu olmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı, koyunlarda yumurtlama hızı üzerine büyük etkiye sahip 12 bilinen mutasyondan herhangi birinin veya herhangi bir diğer DNA sekansının aday genler GDF9 ve BMP15 içindeki varyantların etki edip etmediğini araştırmıştır. Genotiplendirme sonuçları, 108 Finnsheep örneğinde mevcut olan 12 bilinen mutasyon (FecBB, , FecXG,FecXO,FecXB, FecXGR, FecXH, FecXI, FecXL, FecXR, FecGE, FecGH veya FecGT) hiçbirinin bulunmadığını göstermiştir ve bu nedenle ırkın istisnai verimliliğine katkıda bulunmadığını tespit etmiştir Bununla birlikte, Finnsheep koyunları için yumurtlama oranı verilerinin analizi tespit edilememiştir.GDF9 konservatif bölgelerinin dönüşüne ve sarmalına etki eden bu mutasyon tipleri, TGFâ proteinleri ile fizyolojik ve fonksiyonel etkileşim gösterdiğini belirlemişler.GDF9 ve BMP15 gibi doğurganlık genlerinin kullanılması koyun ıslah programındaki üreme özelliklerinin iyileştirilmesine yardımcı olduğunu belirtmişlerdir.

Bahrami ve ark. (2014), Yaptıkları çalışmada Tacikistan Hisari koyunlarında GDF9 geninin ekzon1 bölgesindeki mutasyonları tespit etmek istemişlerdir.110 baş ivesi koyunundan kan örnekleri almış PCR RFLP yöntemi kullanarak polimorfizm tespit edilmeye çalışılmış DNA'lar elektroforezde yürütüp ve 462bplık bölge Hhal

enzim ile kesmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, gen lokusu GDF-9'da genetik polimorfik ve mutasyon olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılması gereken daha büyük numuneler kullanılarak GDF-9 geninin veya diğer genlerin ekzon 1 bölgesi hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini önermiştir.

Kiraz ve ark. (2015), Yaptıkları çalışmada Şanlıurfa yöresi İvesi ve Akkaraman koyunlarıyla birlikte Diyarbakır Karakaş koyunlarında GDF9 geni polimorfizmi tespit etmek maksadıyla yapmışlardır.GDF9 g ve geni üremede önemli bir role sahip olduğunu belirtmişler. Koyun GDF9 geni yaklaşık 2.5kb uzunluğunda olup 2 ekzon 1 intron bölge içerdiğini, EkzonI 397 bp, EkzonII 965 ve İntronI 1126 uzunluğunda olup GDF9 geni üremede önemli bir role sahip genlerden biri olduğunu belirtmişler. GDF9 geni ekzon II bölgesinden 815 bp'lik kısmı ileri (5-gagccagagttttctagcaaga-3) ve geri (5-gacaggtacacttagtggcta-3) primerler kullanılarak PCR çalışması yapmışlardır. PCR ürünleri HaeIII kesme enzimi yardımı ile kesmişlerdir. Tüm örneklerde aynı kesim partenti görmüşler ve polimorfizm tespit edememişlerdir. Çalışma ile GDF-9 geninin üremede etkili olan bir gen olduğunu göstermişlerdir.

Kolosov ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, Salskaya ve Romanov cinslerinin koyunlarında GDF9 polimorfizmini belirlemeye çalışmışlar. PCR-RFLP yöntemi ile polimorfizm tespit etmeye çalışmıştır.GDF9 geninin alel ve genotip frekanslarının elde edilen sonuçları, çalışılan Salskaya koyun popülasyonunun popülasyonunda G1 ve G4 noktalarıyla çok düşük polimorfizm seviyesi göstermiş. Salskaya koyunları, G1 altındaki G allelinin (0.95) ve GG genotipinin (%90) ve A allelinin (0.95) ve AA genotipinin (%90) GDF9 geninin G4 noktasında yüksek frekans göstermiştir. Çalışma popülasyonunda homozigot AA genotipi (G1) ve GG (G4) gözlenemediğini belirtmişler. Çalışmada bulunan Romanof koyununun popülasyonunda, GDF9 geninin alel ve genotip frekanslarının sonuçları, Salskaya koyun popülasyonu ile karşılaştırdıklarında, G1 ve G4 noktaları tarafından daha yüksek bir polimorfizm seviyesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. PCR-RFLP, çeşitli araştırma gruplarının koyunların çeşitli ırklarında polimorfizm geni GDF9'u incelemek için kullanılan güvenilir ve basit bir yöntem olduğunu vurgulamışlar. Rusya'nın Rostov bölgesindeki Salskaya ve Romanov cinslerinde yapılan çalışmanın verileri alelik

sıklığının düşük olduğunu ve G1 noktasında AA genotipinin yokluğunu göstermişlerdir.

Smith (2015), yaptığı çalışmada GDF9'daki birçok polimorfizm, tüm dünyada incelenmiştir, ancak bu soruşturma öncesinde New Zelanda'da çalışılmamıştır. Bu çalışmada, Yeni Zelanda'da bulunan koyun ırklarında GDF9'da polimorfik varyasyon olup olmadığı üzerinde durmuştur. Polimorfizmlerin birçoğu aynı zamanda üreme potansiyelindeki artışlarla ilişkili olup, Yeni Zelanda koyun ırklarında daha fazla çalışmak için GDF9'u ve ideal adayı yapmıştır. Eğer polimorfizm mevcutsa, bu genlerden yararlanmayı göstereceğini belirtmiştir. Bu çalışmasının amacı, Yeni Zelanda koyun ırklarının bir seçkisini, ekson 2 bölgesi içindeki olası polimorfizmleri için analiz etmeye çalışmışlar. Çalışmada kullanılan örnekleri, Lincoln Üniversitesi Gene-Marker Laboratuvarı'ndan kullanılabilen ve daha önce koyunlarda yapılan testleri isteyen çiftçiler tarafından gönderilen örneklerden oluşturmuşlardır. Her ırkın Yeni Zelanda nüfusunu temsil etmek için rasgele seçmemişlerdir. PCR-SSCP yoluyla cins başına yaklaşık 20 numuneyi analiz ederek, varyasyon bulma imkânı oluşturmuşlardır. Araştırmada, çiftlikler arasında meydana gelebilecek farklılıkları hesaba katmak için cins başına yaklaşık dört çiftlik de kullanmışlardır. Bu nedenle tüm sonuçlar dikkatle incelemiş ve yalnızca her cins için değişen frekansların ne olduğunun bir göstergesi olarak görmüşlerdir. Bu çalışmada saptanan varyantlar, varyantlarda bulunan SNP varlığı arasında daha fazla analiz, üreme potansiyeli ile bağlantılı olabilen bir ilişki var olana kadar sürü performansını veya markör gelişimini iyileştirmek için kullanılamadığına değinmişlerdir. Bu çalışmalarında, yalnızca, farklı oranlarda incelenen ırklarda ekson 2'de kısaltılmış iki SNP bulunduğunu tespit etmişlerdir. Yeni Zelanda koyun ırklarında GDF9 geninin doğum ağırlığıyla ilişkili olduğunu belirtmişler. Bu çalışma, farklı koyun ırklarının farklı genotiplere ve değişken frekanslara sahip olduğunu göstermişlerdir.

Wang ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada Çin'de yetiştirilen Küçük Kuyruklu Han koyunları ve Hu koyunları Küçük Kuyruksuz Han'da BMPR-IB (Kemik morfogenetik protein reseptörü IB), BMP-15 (Kemik morfogenetik protein 15) ve FSHR'nin (follikül stimüle edici hormon reseptörü) polimorfizmleri araştırmışlardır.

BMPR-IB'de (c.746A> G) FecB mutasyonu, BMP-15'de (c.718C> T) FecG mutasyonu ve FSHR'de mutasyon (g 47C> T) olmak üzere üç polimorfizm, iki Koyun ırkında tespit etmişlerdir. Kısacası Küçük Kuyruklu Han koyununun ve Hu koyununun verimle ilişkili üç polimorfizm (FecB, FecG ve FSHR g.47C> T) taşıdıklarını göstermişlerdir. Koyun BMPR-IB, BMP-15 ve FSHR genleri, Küçük Kuyruklu Han koyunlarında ve Hu koyunda litre boyu üzerinde birleşik bir etkiye sahip olduğunu ve çok verimli koyunların yetiştirme sürecini kısaltmanın bir yolunu sağlayabileceğini belirtmişlerdir.

Ahmadi ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada deneyini gerçekleştirmek için, Missense mutasyonlarının protein fonksiyonları üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, DNA dizilimi kullanılarak İran'ın batısındaki Hanedan eyaletinde bulunan on iki mehraban koyununda GDF9 ve BMP15 genlerinin polimorfizmleri taramışlar ve bunu protein yapısı modellemesi izlemişlerdir. Hayvan başına 5 ml oranında damardan kan örnekleri toplamışlar. Genomik DNA DNPTM Kiti (SinaClon BioScience Co.) kullanılarak dna izole etmiştir. gDNA'nın niceliği ve kalitesi, A260 / A280 oranında emişe dayalı NanoDrop® ND-1000 kullanılarak belirlemiştir. FecG mutasyonları (G1-G6) olarak bilinen altı tek nükleotid polimorfizm (SNP), GDF9 geninin ekson 1 ve 2'sinde tespit etmişlerdir. G1 mutasyonları (GDF9 ekson 1 g.2118 G> A), G4 (GDF9 ekson 2 g.3451 T> C) ve G6 (GDF9 ekson 2 g.3974 G> A), amino asit ikamesini göstermiştir. BMP15 geninin ekson 1 ve ekson 2'sinde hiçbir polimorfizm saptamamışlardır. Tanımlanmış polimorfizmleri temelinde bireyler, mutasyona uğramamış üç haplotip yabani haplotip, haplotip A (eşzamanlı G1, G2, G3 ve G4 mutasyonları) ve haplotip B (G5 ve G6'nın eşzamanlı mutasyonları) olarak sınıflandırmışlardır. A ve B haplotipindeki GDF9 proteininin 3D yapısı, yabanı haplotipten 90 ° ve 45 ° döndürülmüştür. G1 / p.Arg87His, G4 / p.Glu241Lys ve G6 / p.Val332Ile varyasyonları iyi huylu olarak belirlenmiş. GDF9 geni Phyloge-netic ağacı, A ve B haplotipleri olan bireylerin sırasıyla 63 ve 76 önyükleme değerleri olan yabani haplo tiplerinden farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında, A ve B haplo tiplerindeki GDF9 proteini, eşzamanlı mutasyonların sinerjik etkilerinden dolayı yabani haplotipe göre daha yüksek bir performans gösterdiğini tespit etmişler.

Castro ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 ve Kemik Morfogenetik Protein 15'in Yumurtalık Fonksiyonundaki Rolünü ve Memelilerin Kadın Doğurganlığında Önemini belirlemeye çalışmışlardır. Büyüme faktörleri erken yumurtalık gelişimi ve folikülogenez sırasında germ hücrelerinin gonadal sırtına göçünü düzenlediği için önemli bir rol oynadığını belirlemişler. Büyüme faktörleri arasında, büyüme faktörü 9 (GDF9) ve kemik morfogenetik proteini 15 (BMP15), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) süper ailesine ait olduğunu ve foliküler gelişim için gerekli olduğu düşünmüşlerdir. GDF9 ve BMP15, primer follikülün primer folikül için evrimine katıldığı ve foliküler gelişme ve olgunlaşmanın sonraki evrelerinde önemli rol oynadığını tespit etmişler. Etki düzeyi tam olarak belirtmemiş olmasına rağmen, in vitro gözlemler, GDF9 ve BMP15 faktörlerinin, yumurtalık foliküllerinin büyümesini ve hücre ve granülozdaki mitozun indüklenmesi ile kümülüs hücrelerinin çoğalmasını ve foliküler ile bağlantılı genlerin sentezlenmesini stimüle ettiğini ortaya koymuşlardır. Böylece bu büyüme faktörlerinin oositlerin gelişimi üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için, bu çalışmada GDF9 ve BMP15'in yumurtalık fonksiyonundaki rolünün önemini belirtmişlerdir.

Barakat ve ark. (2016), yaptıkları araştırmada GDF9 ve BMP15 genlerindeki mutasyonların ve başlıca Mısır koyunlarındaki doğurganlık üzerindeki etkilerinin saptanmasını amaçlamışlardır. Kan numuneleri Mısır'daki farklı yerlerde Barki, Ossimi ve Rahmani koyun ırklarından EDTA kullanılarak toplamışlar ve daha sonra tuzlama yöntemi kullanılarak DNA izole etmişler. Genlerin PCR ürünleri, GDF9 geni için MseI ve DdeI kısıtlama enzimleri ve BMP15 geni için HinfI ve DdeI ile sindirmişlardir. Araştırmada, restriksiyon enzimleri ile sindirilen PCR ürünlerinin Ossimi ve Rahmani koyun ırklarındaki GDF9 geninin G7 yerinde bir değiştirme sergilediğini ve tüm koyun ırklarında GDF9 geninin FecGH yerinde bir ikame gösterdiğini ortaya koymuşlar. Öte yandan, yalnızca HinfI ile sindirilen BMP15 gen lokusu mutasyon gösterdiğini, ancak bu üç Mısır ırkının tüm örneklerinde görülmemiştir. Çalışma sonucunda BMP15 gen lokusu hiçbir polimorfizm göstermediğini sadece Barki, Ossimi ve Rahmani koyun ırklarında GDF9 gen lokusu polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir.

Oraon ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada Chhotanagpuri koyunlarında Booroola doğurganlık (FecB) geninin farklı alelik ve genotipik frekanslarının ve bunun doğum sonrası ve doğum sonrası büyümeyle ilişkisinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Mega koyun tohumu projesi altında muhafaza edilen 92 Chhotanagpuri kuzusu, Birsa Tarım Üniversitesi, Kanke, Jharkhand, Hindistan'daki Ranchi Veteriner Yüksekokulu Öğretimsel Küçük Ruminant Çiftliğinde yetiştirilen kuzularda benzer besleme ve yönetim koşulları altında muhafaza edilen kuzu kan örneğinden almışlardır. DNA ekstre edip ve PCR ile güçlendirmişler. FecB gen ürününün SSCP analizi kullanmışlardır. Kuzular, beslenme öncesi (0-3 aylık) dönemlerde barajlarıyla birlikte doğal besleme sistemi altında tutmuşlardır. Bununla birlikte, yetişkin koyunlar günde 7-8 saat otlatma ile yarı yoğun yönetim sistemi altında tutmuşlardır. Büyüme oranını incelemek için doğumda, 4., 8., 12., 24., 36., 48. ve 52. haftalarda Chhotanagpuri koyunlarının mutlak vücut ağırlıkları kaydetmişler. Kuzuların doğum ağırlıkları doğumdan 2 saat sonra kaydedip, vücut ağırlıklarını ise yem teklif etmeden sabah kaydetmişlerdir. FecB geninin DNA izolasyonu ve gen spesifik amplifikasyonu, Özel genotiplerin hedef gen ile ilişkili olarak belirlenmesi için özel nükleotid sıralama ve tek telli yapısal polimorfizm analizi gerçekleştirildi. FecB gen polimorfizmlerinin allelik ve genotipik frekanslarının belirlenmesi ve doğumdan 52 haftalık kuzuların çoğul doğum ve doğum sonrası gelişimi ile istatistiksel analiz yürütmüşlerdir. Çalışmalarının sonucunda SSCP, gözlemlenen farklı bant modeline dayanılarak AA, AB ve BB olarak tasvir edilen üç genotip içeren bir polimorfik model ortaya koymuşlardır. AA ve BB genotipinde üç bant mevcutken, dört bant AB genotipinde mevcut olduğunu belirtmişler. Locus-2, FecB geni için monomorfik iken FecB geni için polimorf olduğu için "AA" "AB" ve "BB" genotipleri locus-1'de bulmuşlardır. Locus-1'deki "A" alelinin daha yüksek frekansı tek doğumlu kuzularda bulmuşlarken Çok doğumlu kuzular arasında "B" alleli ağırlık kazandığını belirtmişlerdir. "BB" genotipli kuzular 52 haftalıkken "AB" ve "AA" genotiplerinden ağır ($p \leq 0.01$) olduğunu tespit etmişlerdir. BB "genotipi çok doğumda ve daha iyi büyüme göstergesi için tercih edilen genotip olarak ortaya çıkardığını belirtmişler. Bu

nedenle, "B" alleli için homozigot kuzular seçilmesi gerektiğini ve daha iyi büyüme oranı için ıslah programında kullanılmak gerektiğini önermişlerdir.

Khodabakhshzadeh ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada, Kermani koyun cinsi PCR-SSCP ile GDF9 geninin ekson 2'sinde tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) saptamaya çalışmışlardır. Toplanan numunelerin tam kanından, tuzlama yöntemi kullanılarak genomik DNA ekstrakte etmişlerdir. GDF9 geninin tamamı ekson 2, dizayn spesifik primerler kullanılarak amplifiye etmişlerdir(634 bp ve 647 bp fragmanları). PCR ürünlerinin tek zincirli konformasyon polimorfizm (SSCP) modelleri, akrilamid jel üzerinde elektroforez ve gümüş nitrat boyama yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Son olarak, ilk astar çifti için 4 bantlama örüntüsü ve ikinci astar çifti elde etmişlerdir. Ayrıca, SNP başına popülasyon genetik indeksleri, Gen Alex 6.41 yazılımı kullanılarak hesaplamışlardır. Sıralama sonucundan3 mutasyonun (SNP) (443, 477ve 721 pozisyon)olduğunu tespit etmişlerdir.

Lassoued ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada Barbarine koyununda büyüme ve farklılaşma faktörü 9 (GDF9) veya kemik morfogenetik protein 15 (BMP15) genlerinde doğal olarak oluşan mutasyonlar olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır. BMP15 geninin ekson 1'inde verimlilik artışı ve sterilite artışı ile ilişkili olan yeni bir polimorfizm tespit etmişlerdir. FecXBar adı verilen bu yeni mutasyon, koyun BMP15 cDNA'sında tek bir nükleotid ikamesini (c.301G> T), 3 bp silme (c.302_304delCTA) ve bir C sokma (c.310insC) ile bir çerçeve kaymasına yol açan bileşik bir polimorfizm olduğunu göstermişlerdir.

Fiky ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada Mısır koyunlarında üreme farklılığı faktörü 9 (GDF9) genindeki (ekzon 1) polimorfizmleri araştırmışlardır. 24 Saidi ve 13 Ossimi koyundan kan numuneleri toplanıp genomik DNA ekstrakte etmişlerdir. GDF9 geninin 710 bp'lik bir kısmı, spesifik primerler kullanılarak amplifiye etmişler Mısırlı koyunların filogenetik ilişkisini açıklığa kavuşturmak için analiz etmişlerdir. Mısır filogenetik analizleri, diğer birçok koyun ırkı ırkları arasında Mısır ırklarının konumunu incelemek amacıyla nükleotid dizilerine dayanılarak gerçekleştirildi. Buna ek olarak, Pst1 veya Msp1 kısıtlama enzimlerini kullanan PCR-RFLP yöntemi,

eşleştirme için moleküler belirteçler oluşturmak üzere GDF9 geninin kısmi ekson 1'in polimorfizmlerini belirlemeye çalışmışlar. Çalışmada Kuzulama oranı yüzdesi ve litre büyüklüğü, Saidi cinsinin varyasyon katsayısı Ossimi cinsinden daha büyük iken, her bir cins için tek tek ve çift kuzu üreten koyunlar arasında önemli fark gösterdiğini tespit etmişler. GDF9 geninin, GenBank'ta bulunan altı Ovis koçluk sayısıyla karşılaştırıldığında, benzerlik sergilediğini ileri sürmüşlerdir. Ovis aries'in AF078545 erişim numarasının Saidi ve Ossimi koyunlarıyla yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali ve Doğum Ağırlığı Bilgileri

GDF9 geni ekzon2 bölgesi SNP etkisinin doğum ağırlığı üzerine etkisinin araştırılması için yetiştirici koşullarındaki İvesi ırkı koyunlar havan materyali olarak seçilmiştir. İvesi koyunlarında düzeltilmiş doğum ağırlığı verileri kullanılmıştır.

3.2. Moleküler Çalışmalar

Moleküler çalışmalar, Harran Üniversitesinin Ziraat Fakültesi Hayvansal Biyoteknoloji laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Koyunlardan DNA izolasyon kiti (GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit #K0781, Thermo) kullanılarak DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA örneklerini görüntülemek için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır.

DNA İzolasyon protokolü:

1. Edtalı tüplerde bulunan kan örneklerini eldiven takılarak ve kan örneklerinin birbiriyle bulaşmasını önlemek maksadıyla her örnekte eldiven değiştirilmiştir.
2. Kolon bulunduran 2 ml'lik tüplere Column preparation Solution'dan tam olarak 500 µl ilave edilerek 12000 g'de 1 dk santrifüj edildikten daha sonra alt kısımdaki dökülür.
3. Yeni bir tüp içerisine 20 µl proteinase K, sonra 200 µl örnek ile 20 µl oranında RNase aktarıldıktan sonra 2 dk bekletilir.
4. Tüp içine Lysis Solution'dan 200 µl ilave edilerek 15 sn vorteks yapıldıktan daha sonra 55 ºC'de 10 dk inkübe edilir.

5. Bu aşamada ise tüp içine 200 µl etanol (%99) koyularak 5-10 sn vorteks edilip ve içerik kolon içermekte olan tüplere döküldükten sonra 6500 g'de 1 dk santrifüj edilip ve daha sonra alt kısımdakiler dikkatli bir şekilde dökülür.
6. Bir sonrası aşama için tüpün içine 500 µl prewash solution ilave edilerek 6500 g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt kısım yavaş bir şekilde dökülür.
7. Sonra ise tüp içine 500 µl wash solution konularak 12000 g'de 3 dk tekrar santrifüj edilir.
8. Kolonlar yeni tüplerin içine konularak 200 µl elution solution ilave edilerek 5 dk dinlendirilip ve 6500 g'de 1 dk santrifüj edilir.
9. Tüpün içindeki kolon atılıp alt kısımda kalan sıvıdaki DNA'nın olup olmadığı agaroz jel elektroforezinde görüntülenir ve izole edilen DNA'dan moleküler çalışmalarda yararlanmak amacıyla derin dondurucuda muhafaza edilir.

3.2.2. DNA agaroz jel elektroforezi

Erlenmayer içine 100 ml 1XTBE çözelti ile 1g agaroz hassas terazide dikkatli bir şekilde tartılıp konularak mikrodalga fırın içerisinde eritilmeye çalışılmıştır. Mikro dalga fırından çıkarılan agaroz jel yaklaşık 20-25 dakika ılıması için bekletildi. Küvet içerisine boşaltılarak taraklar yerleştirilip jelin kalıp haline gelmesi beklenmektedir. Daha sonra ise 1XTBE içerikli elektroforez tankının içine küvet yerleştirilerek, tarak dikkatlice çıkarılmıştır. Jel kuyularının ilk sıralarına molekül ağırlık markerleri yüklenmektedir. Markerlar DNA'lar için 1 kb ladder, PCR için 100 bp'lık ladder kullanılmıştır (Favorgen, Tayvan). Diğer kuyulara ise 4 µl DNA örnekleri 1 µl yükleme tamponu (%40 sükroz,100 mM ETDA, pH: 8.0,%0.25 bromofenol mavisi,) yüklenmiştir (PCR ürünleri 5 µl + 1 µl yükleme tamponu). Yüklemeden az zaman sonra güç kaynağında (Biolab), jelin bulunduğu tanka 90 V akım verilerek jeller 35-40 dk yürütülmüştür. Sonrasında jeli, etidyum bromür (0,5 µg/ml) bulunan ortam içine eklenerek 10 dakika bekletip DNA'lar boyanmaya bırakılmıştır. Boyanan jel, ultraviyole ışın ile DNA'ların olup olmadıkları görüntülenebilmiş ve fotoğrafı çekilerek bilgisayar ortamında değerlendirilmiştir.

Koyun DNA örneklerinde GDF9 geni ekzon 2 bölgesini çoğaltmak amacıyla gerekli olan F ve R primerlerin tasarlanması için öncelikli olarak, Gen Bankasından (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), (Ovis aries) evcil koyun ile ilgili genom bölgesi (Ovis aries breed Texel chromosome 5) ait dizi bilgileri temin edilmiştir. GDF9 geni dizi bilgileri kullanarak, ekzon 2 bölgesini içerecek şekilde primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler ile 815 bp'lik bölgenin çoğaltılması hedeflenmiştir.

>gi|417531957:c41843517-41840787 Ovis aries breed Texel chromosome 5, Oar_v3.1, whole genome shotgun sequence

GGATTGTTTTTCTTCTCAGGAACCTTTCCATCAGTGGATCTGCTGTTTAACCTGGATCGTGTTACTGT
TGTGGAACATTTATTCAAGTCAGTTTTGCTATATACTTTCAACAACTCCATTTCTTTTCCCTTTCCTG
TTAAATGTATATGCAACCTGGTGATAAAAGAGCCAGAGTTTTCTAGCAAGACTCTCCCTAGAGCTCCA
TACTCATTTACCTATAACTCACAGTTTGAATTTAGAAAGAAATACAAATGGATGGAGATTGATGTGAC
GGCTCCTCTTGAGCCTCTGGTGGCCTCCCACAAGAGGAATATTCACATGTCTGTAAATTTTACATGTG
CGAAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCCTGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCC
TCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTGCTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAA
AAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTGACCAGAAGAGAGGGCTATCTGCCTACCCCGTGGGAGAAGAAGCTG
CTGAGGGTGTAAGATCGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCT
CTGGTTCCAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGAATGTGA
GCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACTGGATTGTGGCCCCACACAAAT
ACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCGGTCGGACATCGGTATGGCTCTCCGGTTCAC
ACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAAACTTGACTCCTCAGTGCCAAGACCATCCTGTGTACCTGC
CAAGTATAGCCCTTTGAGTGTTTTGGCCATCGAGCCTGATGGCTCAATCGCTTATAAAGAATATGAAG
ATATGATAGCCACTAAGTGTACCTGTCGTTAACAGACTCCTGTCAAGTAAAACCATGAGTGTCCTGGC
CAGTGTAAATGCCGCGCCCCTGTCTATGCCTTTGGGAGGAAGTTTCATGTGTCAAATCTCTGACTGTA
CGACACTGTGTGTTGTGTAAGGAGGAGCCTGTATAGATTAGCATATTCTGTGGCATCTATCAATGTAA
GGGATAACAGCTGCCTTCCTCATGGCCAAATGTTTAAATGAAATGTATTTCTTTTGGAGAACTTTGAA
TTTTTTC

3.2.3. Primerler

Koyunlarda GDF 9 gen bölgelerinin PCR ile çoğalabilmesi amacıyla oldukça yararlı görülen primer kullanılmış bulunmaktadır. Bu primerler ile ekzon bölgesinin 815 bp'lik bölgesinin çoğaltılması amaçlanmıştır.

İleri primer: 5'-GAGCCAGAGTTTTCTAGCAAGA-3'

Tm=55.6 °C MW:6783

Geri primer: 5'-TAGCCACTAAGTGTACCTGTCG-3'

Tm=56.7 ºC MW:6710

3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Koyunların GDF 9 gen bölgelerinin PZR tekniğiyle çoğalmasında kullanılan PCR karışım Çizelge 3.1.'de gösterilmektedir. Yapılan bu bileşenler; hepsi belirtilmiş oranlarda buz üzerinde 0.2 ml'lik PCR ependorf tüpler içerisine aktarıldıktan sonra PCR şartları daha önceden ayarlanan PCR cihazı içerisine yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılmıştır.
PCR şartları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR karışımı

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar
Kalıp DNA	20-30 ng/µl	1.5µl
PCR Buffer	10X	4.0 µl
İleri Primer	10 pmol/µl	1.0 µl
Geri Primer	10 pmol/µl	1.0 µl
dNTP mix	1.0 nM	1.0 µl
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0.4 µl
dH_2O		31.5µl
Toplam		40.0 µl

Çizelge 3.2. PCR amplifikasyon şartları

Döngü işlemi	Sıcaklık (°C)	Döngü sayısı	Süre
Ön denaturasyon	95	1	4 dakika
Denatürasyon	94	30	45 saniye
Yapışma (T_m)	53-60		60saniye
Sentez	72		1.5 dakika
Son uzama	72	1	5 dakika
Bekleme	4	∞	∞

Yapılan bu bileşenler belirtilen oranlarda buz üzerinde 0.2 ml'lik PZR ependorf tüpler içinde hazırlanıp sonra, PZR şartları çok önceden ayarlanmış PZR cihazına (Boeco) koyulmuştur. Belirtilen PZR bileşen ve PZR amplifikasyon şartları genel olup, örneklere göre modifiye edilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünlerin görüntülemede %1'lik agaroz jeli kullanılmıştır. PCR jelinin yürütülmesi amacında marker olarak 100 bp'lik ladder (*Fermentas*) kullanılmıştır.

GDF 9 gen bölgesinin PZR amlifkasyon gerçekleşmiş örneklerin gen dizilemesi için seçilmişleri (F) ve (R) zincir olmak dizileme işlemi hizmet alımı ile

yaptırılmıştır. Gen dizileme için örnekler 40 µl olarak (8.5µl PCR ürünü + 31.5µl ddH_2O) hazırlanmıştır.

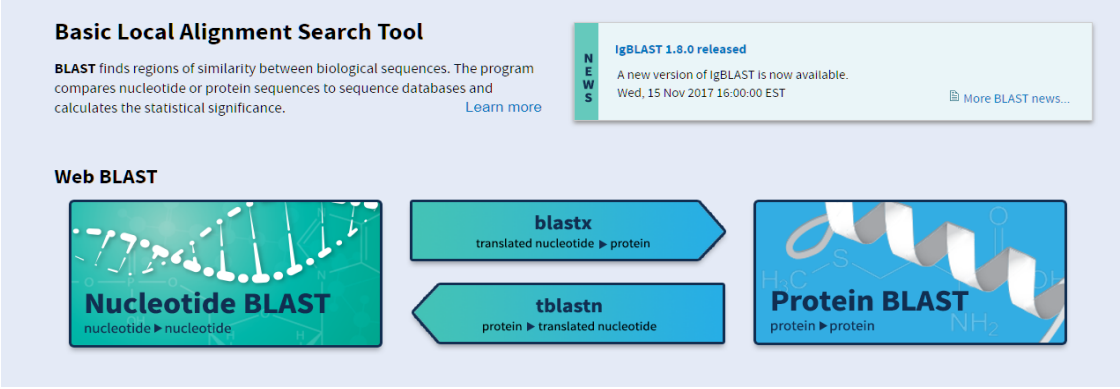
3.2.5. DNA sekans analizi

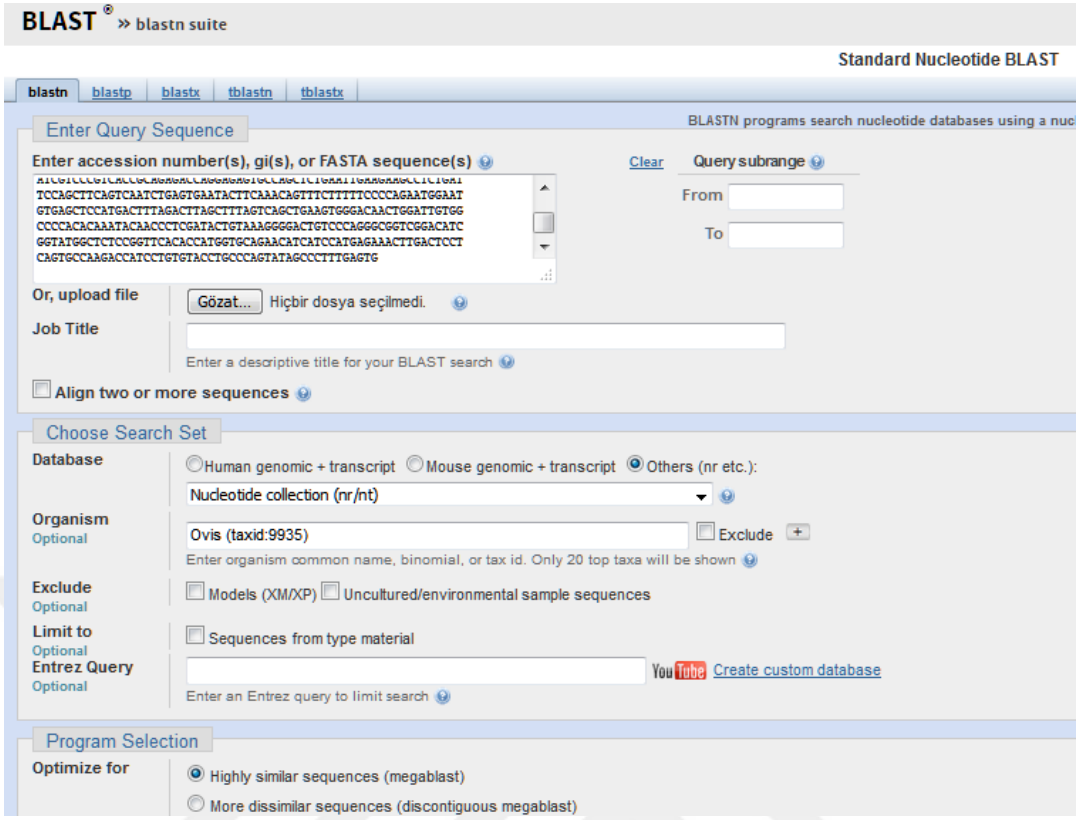
GDF 9 gen bölgesi PCR amlifkasyonu gerçekleştirmek amacıyla DNA örneklerinde dizileme işlemi yapılmıştır. (İontek, İstanbul). Gen dizileme için örnekler 40 µl olarak (20µl PCR ürünü + 20µl water) hazırlanmıştır.

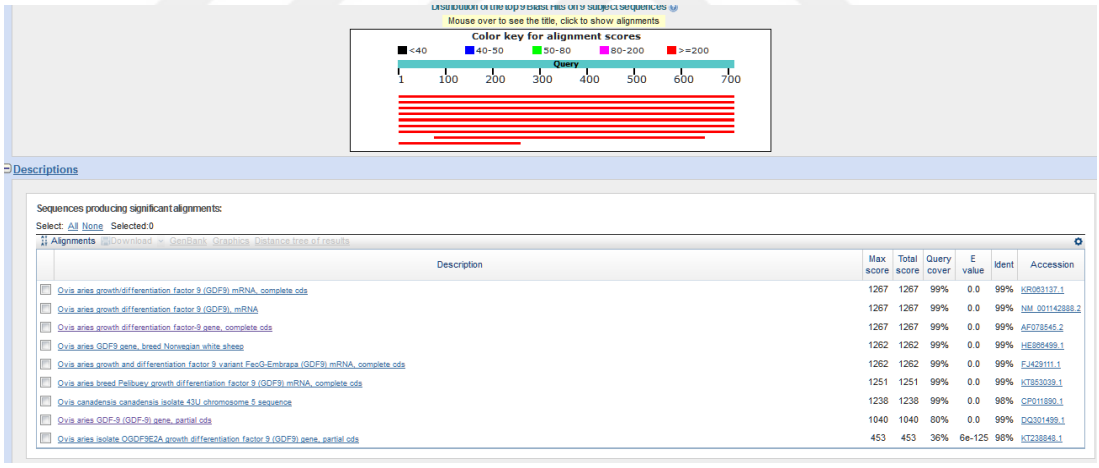
3.2.6. GDF9 geni ekzon2 bölgesi bilgileri değerlendirme

Sekans işlemi sonrası örneklere ilişkin DNA sekans bilgileri ve pikler *Chromas* paket programında incelenmiş, sekans bilgileri *FASTA* formatta aktarılmıştır. Gen dizi sonuçları *BLAST* işlemine tabii tutularak GDF9 genine ilişkin doğrulama ve incelemeler yapılmıştır. Bu işlemlerde örnek dizi olarak N1 örneğinde yapılan *BLAST* işlemi sonuçları aşağıda verilmiştir.

```
>N1-GDFF sequence exported from chromatogram file
AAGCTCATACTCATTTACCTATAACTCACAGTTTGAATTTAGAAAGAAATACAAATGGATGGAGATTG
ATGCCACTGCTCCTCTTGAGCCTCTGGTGGCCTCCCACAAGAGGAATATTCACATGTCTGTAAATTTT
ACATGTGCGGAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAGCCTGTTTAACATGACTCTTCTCGT
AGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAGTGCTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCC
ACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCCTGACCAGAAGAGAGGGCTATCTGCCTACCCCGTGGGAGAA
GAAGCTGCTGAGGGTGTAAGATCGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAATTGAA
GAAGCCTCTGATTCCAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATG
GAATGTGAGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACTGGATTGTGGCCCC
ACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCGGTCGGACATCGGTATGGCTCTC
CGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAAACTTGACTCCTCAGTGCCAAGACCATCCTGT
GTACCTGCCCAGTATAGCCCTTTGAGTG
```




BLAST » blastn suite
Standard Nucleotide BLAST
blastn blastp blastx tblastn tblastx
BLASTN programs search nucleotide databases using a nuc
Enter Query Sequence
Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)
Clear
Query subrange
From
To
TCCAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGGAAT
GTGAGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACTGGATTGTGG
CCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCGGTCGGACATC
GGTATGGCTCTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAAACTTGACTCCT
CAGTGCCAAGACCATCCTGTGTACCTGCCCAGTATAGCCCTTTGAGTG
Or, upload file
Gözat... Hiçbir dosya seçilmedi.
Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search
Align two or more sequences
Choose Search Set
Database
Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):
Nucleotide collection (nr/nt)
Organism
Optional
Ovis (taxid:9935)
Exclude
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown
Exclude
Optional
Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences
Limit to
Optional
Sequences from type material
Entrez Query
Optional
Create custom database
Enter an Entrez query to limit search
Program Selection
Optimize for
Highly similar sequences (megablast)
More dissimilar sequences (discontiguous megablast)


Mouse over to see the title, click to show alignments
Color key for alignment scores
<40 40-50 50-80 80-200 >=200
Query
1 100 200 300 400 500 600 700
Descriptions
Sequences producing significant alignments:
Select: All None Selected:0
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results
Description Max score Total score Query cover E value Ident Accession
Ovis aries growth/differentiation factor 9 (GDF9) mRNA, complete cds 1267 1267 99% 0.0 99% KR063137.1
Ovis aries growth differentiation factor 9 (GDF9), mRNA 1267 1267 99% 0.0 99% NM_001142888.2
Ovis aries growth differentiation factor-9 gene, complete cds 1267 1267 99% 0.0 99% AF078545.2
Ovis aries GDF9 gene, breed Norwegian white sheep 1262 1262 99% 0.0 99% HE986499.1
Ovis aries growth and differentiation factor 9 variant FecG-Embrapa (GDF9) mRNA, complete cds 1262 1262 99% 0.0 99% FJ429111.1
Ovis aries breed Pelibuey growth differentiation factor 9 (GDF9) mRNA, complete cds 1251 1251 99% 0.0 99% KT853039.1
Ovis canadensis canadensis isolate 43U chromosome 5 sequence 1238 1238 99% 0.0 98% CP011890.1
Ovis aries GDF-9 (GDF-9) gene, partial cds 1040 1040 80% 0.0 99% DQ301499.1
Ovis aries isolate OGDF9E2A growth differentiation factor 9 (GDF9) gene, partial cds 453 453 36% 6e-125 98% KT238848.1

Download GenBank Graphics

Ovis aries growth/differentiation factor 9 (GDF9) mRNA, complete cds

Sequence ID: KR063137.1 Length: 1852 Number of Matches: 1

Range 1: 634 to 1340 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1267 bits(686)	0.0	701/708(99%)	2/708(0%)	Plus/Plus

```
Query  2     AGCT-CATACTCATTTACCTATAACTCACAGTTTGAATTTAGAAAGAAATACAAATGGAT  60
             ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  634   AGCTCCATACTCATTTACCTATAACTCACAGTTTGAATTTAGAAAGAAATACAAATGGAT  693

Query  61    GGAGATTGATGCCACTGCTCCTCTTGAGCCTCTGGTGGCCTCCCACAAGAGGAATATTCA  120
             ||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  694   GGAGATTGATGTGACGGCTCCTCTTGAGCCTCTGGTGGCCTCCCACAAGAGGAATATTCA  753

Query  121   CATGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  754   CATGTCTGTAAATTTTACATGTGCGGAAGACCAGCTGCAGCATCCTTCAGCGCGGGACAG  813

Query  181   CCTGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  814   CCTGTTTAACATGACTCTTCTCGTAGCGCCCTCACTGCTTTTGTATCTGAACGACACAAG  873

Query  241   TGCTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  874   TGCTCAGGCTTTTCACAGGTGGCATTCCCTCCACCCTAAAAGGAAGCCTTCACAGGGTCC  933

Query  301   TGACCAGAAGAGAGGGCTATCTGCCTACCCCGTGGGAGAAGAAGCTGCTGAGGGTGTAAG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  934   TGACCAGAAGAGAGGGCTATCTGCCTACCCCGTGGGAGAAGAAGCTGCTGAGGGTGTAAG  993

Query  361   ATCGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCTGAT  420
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  994   ATCGTCCCGTCACCGCAGAGACCAGGAGAGTGCCAGCTCTGAATTGAAGAAGCCTCTGGT  1053

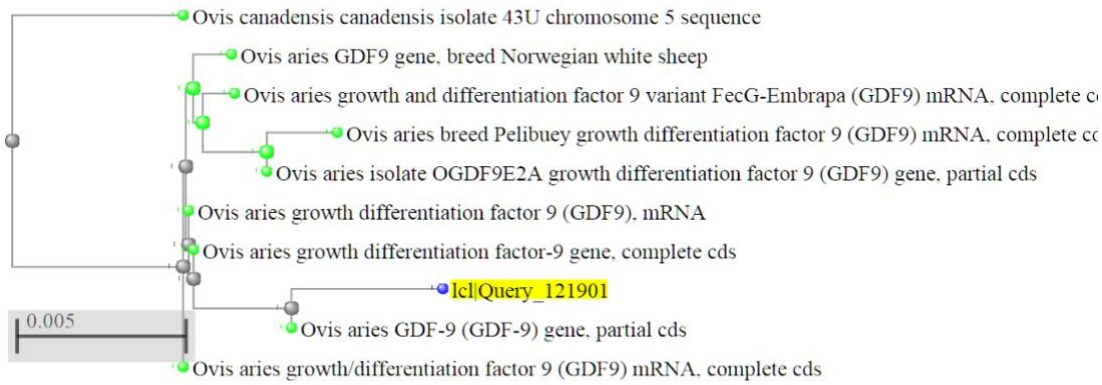
Query  421   TCCAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAATGGAAT  480
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  1054  TCCAGCTTCAGTCAATCTGAGTGAATACTTCAAACAGTTTCTTTTTCCCCAGAAT-GAAT  1112

Query  481   GTGAGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACTGGATTGTGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1113  GTGAGCTCCATGACTTTAGACTTAGCTTTAGTCAGCTGAAGTGGGACAACTGGATTGTGG  1172

Query  541   CCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCGGTCGGACATC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1173  CCCCACACAAATACAACCCTCGATACTGTAAAGGGGACTGTCCCAGGGCGGTCGGACATC  1232

Query  601   GGTATGGCTCTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAAACTTGACTCCT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1233  GGTATGGCTCTCCGGTTCACACCATGGTGCAGAACATCATCCATGAGAAACTTGACTCCT  1292

Query  661   CAGTGCCAAGACCATCCTGTGTACCTGCCCAGTATAGCCCTTTGAGTG  708
             ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  1293  CAGTGCCAAGACCATCCTGTGTACCTGCCAAGTATAGCCCTTTGAGTG  1340
```



3.3. DNA Polimorfizmi ve SNP Genotiplendirme

Örnekler için toplam bölge sayıları, polimorfik bölgesi sayıları (S), haplotiplerin sayıları (h), haplotiplerin farklılıkları (H_d: haplotype diversity), nükleotidlerin farklılıkları (π: nucleotide diversity) ve ortlama nükletid farklılık sayısıları (k) değerleri DnaSP 5,0 (Librado ve Rozas, 2009) programı ile hesaplanmıştır.

Haplotip çeşitliliği (h_d):

Haplotip çeşitliliği, bir popülasyonda paylaşılan haplotiplerin oranını yada frekansını gösterir(3.1) (Nei, 1987).

$$h_d = \frac{\left(1 - \sum \chi^2\right) n}{n-1} \qquad (3.1)$$

Formülü ile hesaplanır.

n: haplotip sayısı
x_i: haplotiplerin frekansı

Nükleotid çeşitliliği (π):
Nükleotid çeşitliliği popülasyon içinde diziler arasındaki nükleotid farklılıklarının ortalamasıdır (3.2) (Nei, 1987).

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^{h_1} \sum_{j=1}^{h_2} \chi_i \chi_j d_{ij}}{L} \qquad (3.2)$$

x_i ve x_j: i. ve j. haplotiplerin frekansları
dij: i. ve j. haplotipler arasında gözlenen farklılıklasın sayısı
h_1 ve h_2: haplotip sayıları
L: dizi uzunluğu

Dizi bilgileri referans sekans ile birlikte CLUSTA OMEGA ile homoloji yapılarak değerlendirme ve düzenleme yapılmıştır. Örneklere ait pikler incelenerek piklerde görülen SNP'ler belirlenmiştir.

3.4. SNP-Doğum Ağırlığı İlişkisi

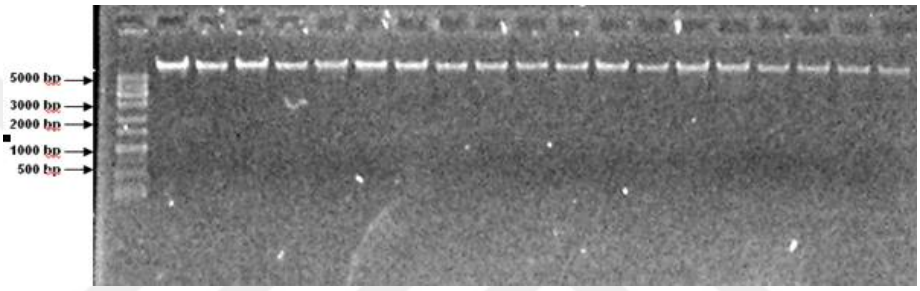
GDF9 geni ekzon2 bölgesi SNP genotiplere ait doğum ağırlıkları üzerine etkisi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Moleküler Analiz Bulguları

4.1.1. DNA izolasyonu

Şanlıurfa yöresindeki yerli koyunlardan alınan örnekler sonucunda DNA izole edildi. Daha sonra İzole edilmiş olan DNA'ların agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.

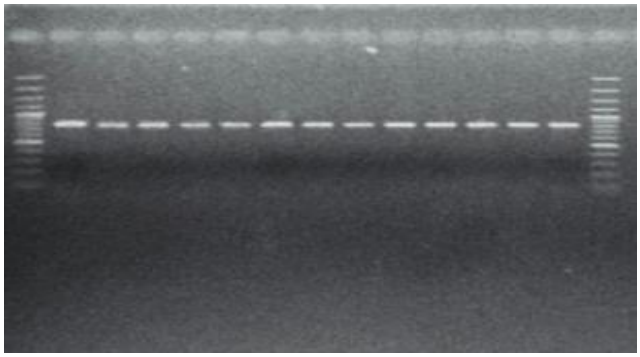


Şekil 4.1.Koyunlardan izole edilen DNA'lar (1kb ladder)

4.1.2. PZR sonuçları

İzole edilmiş DNA kan örneklerinden GDF 9 genine ait bölgeler için primer kullanılıp PZR çalışması yapılmıştır. Tüm örnekler PZR ile ürünler elde edinilmiştir. Koyunlarda GDF 9 gen ekzon2 bölgeleri 815 bç'lik kısmı PZRile çoğaltılmıştır. (Şekil 4.2.).

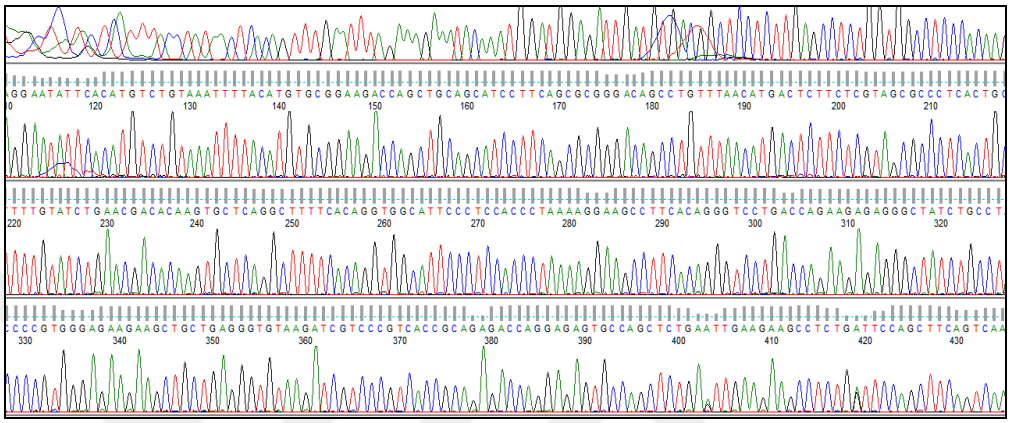
815 bp



Şekil 4.2. PZR Ürünü Jel Görüntüsü

4.2.Dizileme Sonuçları ve SNP'ler

Şanlıurfa'da yetiştirilen ivesi koyunlarının GDF9 geni ekzon 2 bölgeleri PCR ürünlerinin dizi analiz sonuçları elde edilmiştir. Ekzon 2 bölgesi için sırasıyla 815 bp, PCR ürününden, diziler düzenlenme ve değerlendirilmesi sonucu 650 bp gen dizi bilgileri elde edilmiştir.



Şekil 4.3.GDF 9 gen ekzon 2 bölgesi DNA dizi bilgisi kromatoğram

4.2.1. GDF9 gen polimorfizmi

Tüm örneklerde GDF9 geni ekzon2 bölgesini içeren 815 baz çifti (bç) uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. GDF9 geninde polimorfizm DNA dizi bilgileri kullanılarak belirlenmiştir.

Şanlıurfa yöresi ivesi koyunlarının ekzon 2 bölgesi gen dizilerine göre; Polimorfik bölgelerin sayısı(S), haplotiplerin sayısı (h) haplotiplerin farklılıkları (Hd) nükleotidlerin farklılıkları (π), toplam dizi sayısı, ortalama nükleotidlerin farklılık sayıları (k) hesaplanarak DNA polimorfzmleri belirlenmiştir.

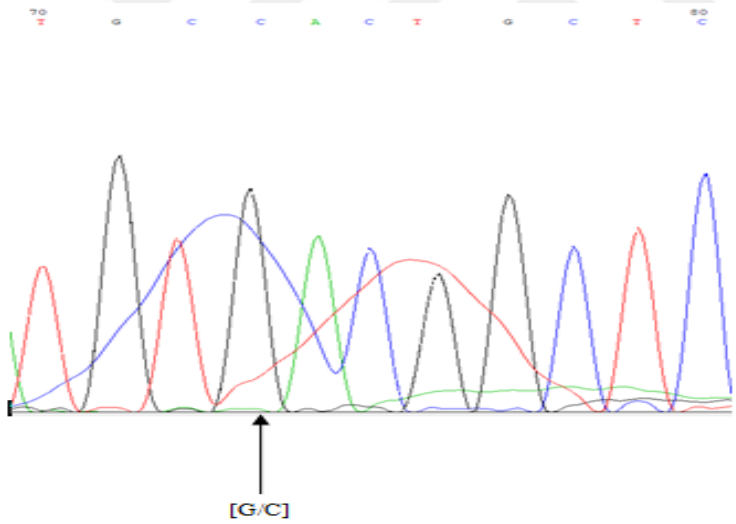
Ekzon 2 bölgesi gen dizi analizi yapılarak DNA polimorfzmin özelliği belirlenmiştir. Şanlıurfa yöresi ivesi koyunlarında 4 polimorfik bölge tespit edilmiş, koyunların haplotipler ve nükleotidler farklılıkları sırasıyla; 0.771±0.038 ve 0.00293±0.00092 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1.İvesi koyunların GDF9 geni ekzon 2 gen bölgesine göre DNA polimorfizmi

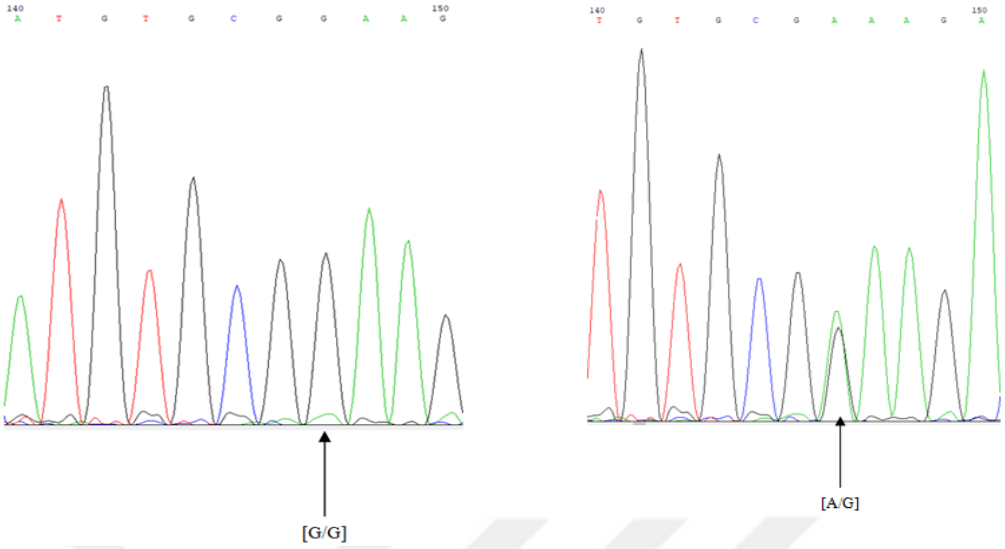
Özellikler	
Toplam bölge sayısı	650
Polimorfik bölge sayısı (S)	7
Haplotip sayısı (h)	8
Haplotip farklılığı Hd:	0.771±0.038
Nukleotid farklılığı (π)	0.00293±0.00092
Ort. nükletid farklılığı sayısı (k)	2
G/C oranı	0.49

4.2.2. SNP genotiplendirme

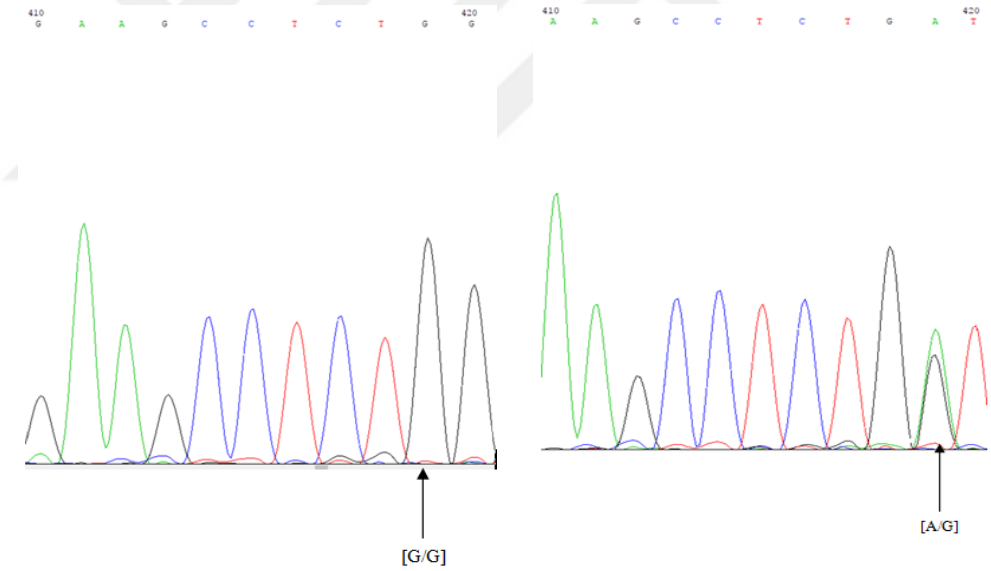
İvesi koyunlarında GDF9 geni ekzon2 bölgesinde SNP1(G/C), SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tespit edilmiştir. tespit edilen SNP pikleri şekil 4.4,şekil 4.5,şekil 4.6, şekil 4.7'te gösterilmiştir.



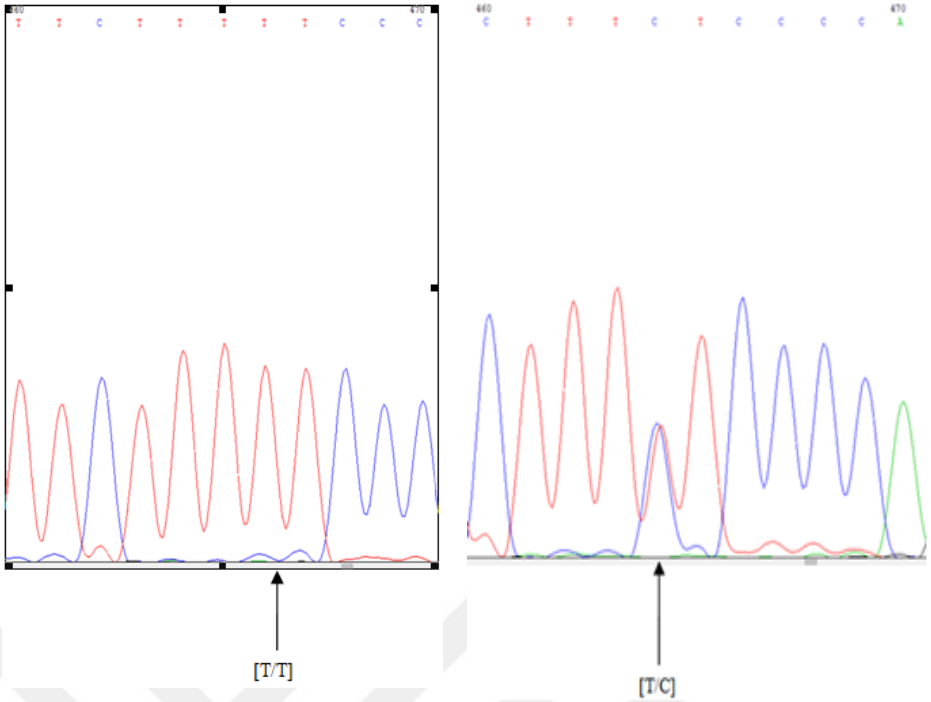
Şekil 4.4. SNP1 (G/C)



Şekil 4.5. SNP2 (A/G)



Şekil 4.6.SNP3 (A/G)



Şekil 4.7. SNP4 (T/C)

Tüm örneklerde GDF9 geni ekzon2 bölgesini içeren 815 baz çifti (bç) uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. GDF9 geninde polimorfizm DNA dizi bilgileri kullanılarak belirlenmiştir. İlgili gen bölgesinde SNP1(G/C), SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tespit edilmiştir. Bu SNP'lere ait allel ve genotip frekansları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Aşağıda verilen çizelge incelendiğinde, SNP1(G/C), SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) için sırasıyla; GC; GG, AG; GG, GA ve TT, TC genotipleri tespit edilmiş, frekansları ise sırasıyla; %100; 86.21, 13.79; 96.55, 3.45 ve 96.55, 3.45 olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada, SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) allel ve genotip frekansları bakımından populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.2. SNP'lere ait allel ve genotip frekanslar

SNP ID	Genotipler	G allel Frekans	A allel frekans	Gözlenen frekans %	Beklenen frekans %	HWE p-değeri
SNP1 *rs160076410*	GC n=58	0.50	0.50	100.00	50.00	0.000
SNP2 *rs160076408*	GG n= 50	0.93	0.07	86.21	86.68	0.573
	AG n= 8			13.79	12.84	
SNP3	GG n= 56	0.98	0.02	96.55	96.58	0.894
	GA n= 2			3.45	3.39	
SNP4	TT n=56	0.98	0.02	96.55	96.58	0.894
	TC n=2			3.45	3.39	

4.2.3. GDF9 geni ekzon2 SNP'ler ile doğum ağırlığı ilişkisi

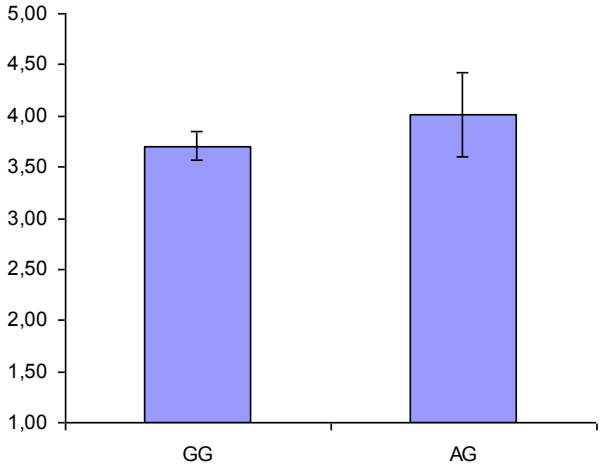
GDF9 geni SNP1(G/C), SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) taşıyan İvesi koyunlarında, doğum ağırlığına ilişkin değerler Çizelge 4.2. 'de verilmiştir.

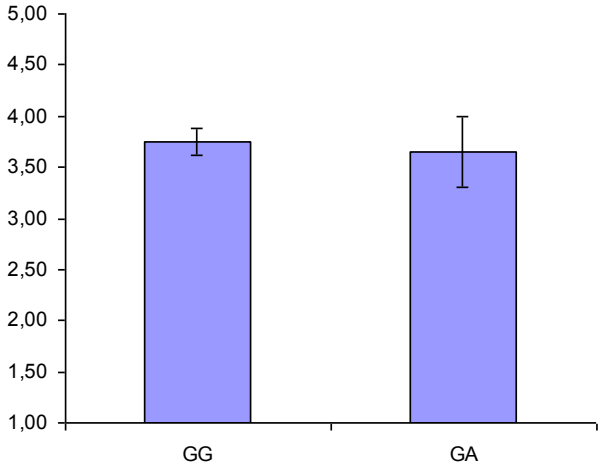
Bu çalışmada, İvesi koyunlarında doğum ağırlıkları bakımından, SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) tüm genotipler arasında önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

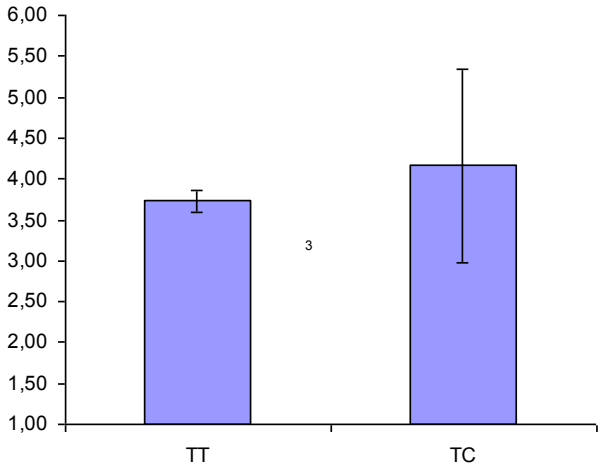
İvesi koyunlarda, GDF9 geni SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) genotiplerine ait doğum ağırlığı değerleri Şekil 4.8.'te grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. GDF9 geni ekzon2 bölgesi SNP genotiplerinin doğum ağırlığı üzerine etkileri

SNP	Genotip	N	Ortalama kg	Std. Hata ±	P
SNP1	GC	58	3.75	0.13	-
SNP2	GG	50	3.70	0.14	0.430
	AG	8	4.01	0.41	
SNP3	GG	56	3.75	0.13	0.898
	GA	2	3.65	0.35	
SNP4	TT	56	3.73	0.13	0.555
	TC	2	4.16	1.18	







Şekil 4.8. SNP'lere ait doğum ağırlığı değerleri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada İvesi Koyunlarında Doğum Ağırlığı Üzerine GDF9 Geni Tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP) Etkisinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Türkiye'de yetiştirilen çiftlik hayvanlarından ivesi koyunlarında yapılan ilk çalışmadır. İvesi Koyunu ülkemizdeki yağlı kuyruğa sahip koyun ırklarından biri olup, Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, Gaziantep, Şanlıurfa, Hatay illerinde yetiştirilmektedir. İvesi Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne adapte olmuş ırklarımızdan biridir.

Şanlıurfa'da halk elinde yetiştirilmekte olan İvesi Koyunlarının doğum ağırlığına etki eden faktörler belirlenmiş ve bu özellikler göz önünde bulundurularak fenotipik ve genetik parametreler tahmin edilmeye çalışılmıştır. Koyunlardan DNA izole edilip tüm örneklerde GDF9 geninin ekzon2 bölgesini içeren 815 baz çifti (bç) uzunluğunda PCR ürünleri elde edilmiştir. GDF9 geninde polimorfizm DNA dizi bilgileri kullanılarak belirlenmiştir. İlgili gen bölgesinde SNP1(G/C), SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) (SNP) tek nükleotid polimorfizmleri tespit edilmiştir. Bu SNP'lere ait olan allel ve genotip frekansları belirlendi. İvesi koyunlarında doğum ağırlıkları açısından, SNP2(G/A), SNP3(A/G) ve SNP4(T/C) genotipler arasında önemli bir farkın olmadığı görülmüştür.

Daha fazla örnekte sürü yönetimindeki iyileştirmelerde elde edilecek daha güvenilir kayıtlarla değerlendirilmesi daha faydalı olacağı öngörülmektedir.

GDF 9 geninin üremede birtakım özelliklerle ilişkisinin bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmekle beraber ilgili gen bölgesinde SNP'lerin yerli çiftlik hayvanlarımızda araştırılması ilgili gen bakımından ekonomik özellikler ile ilişkisinin tespit edilmesi durumunda bu özelliklerin iyileştirilmesine yönelik yapılacak olan seleksiyon stratejilerine büyük katkı sağlayacağı söylenebilir.

Türkiye çok zengin biyoçeşitliliğe sahip ender ülkelerden bir tanesidir. Arkeolojik ve moleküler genetik çalışmalar ile koyun, keçi ve sığır gibi önemli birçok çiftlik hayvanlarınında evcilleştirilme yeri olarak bilinmektedir. Buna ek olarak yerli çiftlik hayvanlarımızda moleküler teknikler aracılığıyla genetik çalışmalara yönelik araştırmalar desteklenmelidir. Hayvan popülasyonlarında moleküler tekniklerle filogenetik ilişkilerin ve genetik polimorfizmin belirlenmesi, verim ile belirteç gen ilişkilerinin saptanması ve bu ilişkilerin uygulamaya geçilmesi ile birlikte hayvancılığın geliştirilmesi yakın gelecekte mümkün olabilecektir.

Türkiye'de bulunan koyun varlığımızın son çeyrek yılda yarısından daha fazlası azalmıştır. Bu nedenlerden dolayı gen kaynaklarını korumamız gerekmektedir. Türkiye yerli hayvan kaynakları bakımından zengin çeşitliliğe sahiptir. Gen kaynaklarımızı korumak amacıyla önemli olan yerli ırklarımızın genetik yapılarının moleküler açıdan tanımlanması, ırklar içi ve ırklar arasında bulunan farklılıkların belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

AHMADI, A., AFRAZ, F., TALEBI, R., FARAHAVAR, A., and VAHIDI, S. M. F., 2016. Investigation of *GDF9* and *BMP15* Polymorphisms in Mehraban Sheep to Find the Missenses as Impact on Protein. İranian Journal of Applied animal science, 6(4):863-872.

AKBULUT, E., ERDEMİR, A., ÖZGEN, M., BASKIN, Y., YALÇIN, F., BALIK, D, T.,2015. Genotypıng and analysıs of rs27037 polymorphısm forankylosıng spondylıtıs. Research Article. Genotypıng and analysıs of rs27037 polymorphısm. Sigma J. Eng. & Nat Sci., 6 (1): 117-125.

AKMAN, N., ve TATAR, A., 2006. Türkiye ve AB'nde Hayvancılık, Pankobirlik Dergisi, Sayı: 85, Ankara

AKÇAPINAR, H., 1994. Koyun Yetiştiriciliği. Medisan Yayın Serisi, Ankara, s1-4

AKÇAPINAR, H., 1983. Alman Et Merinosu ve Karacabey Merinoslarının Canlı Ağırlık, Beden Yapısı ve Yapağı Verimi Yönünden Karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 30(1): 202-203

AKÇAPINAR, H., ve KADAK, R., 1982. Bazı faktörlerin Akkaraman ve Morkaramanlarda gebelik süresi ve doğum ağırlığı üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 29: 392-400.

AKÇAPINAR, H., 2000. Koyun Yetiştiriciliği.Yenilenmiş 2. baskı. İsmat Matbaacılık, Ankara, 975- 96978-1-5.

ARITÜRK, E., 1982. Evcil Hayvanlarda Büyüme. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 7: 239-254.

BAHRAMI, Y., BAHRAMI,S., MOHAMMADİ, H. R., AZAR,V.C., 2014.The Polymorphism of GDF-9 Gene in Hisari Sheep.Biological Forum–An International Journal, 6 (2): 46-52.

BARAKAT, IBRAHİM A., SALEM1, LAMIAA M., DAOUD, NIVEEN M., KHALIL, WAGDY K.,MAHROUS, KARIMA F., 2016. Genetic polymorphism of candidate genes for fecundity traits in Egyptian sheep breeds.Biomedical Research, 28 (2): 851-857.

CASTRO, F. C., CRUZ, M. H. C., AND LEAL, C. L. V., 2016. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian Female Fertility. Asian Australas. J. Anim. Sci., 29 (8) 1065-1074.

CHU, M. X., YANG, J., FENG, T., CAO, G. L., FANG, L., DI, R., HUANG, D. W., TANG, Q. Q.,MA, Y. H., LI, K., LI, N.,2011. GDF9 as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. Mol. Biol.Rep., 38:5199-5204.

DAVIS, G.H., 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. Genet. Sel. Evol., 37: 11-23.

DEMİRSOY, Ş., AKÇAPINAR, H., 1997. Kuzularda büyümeyi etkileyen çevresel faktörlerin kovaryans analizi ile incelenmesi. Lalahan Hayvan Araştırma Enstitüsü Dergisi, 37:37-55.

DOĞAN, İ., ŞAHİN, F.,2003.Kuzularda Doğum Ağırlığını Etkileyen Faktörlerden Doğum Tipi ve Cinsiyetin Bare-Bones Meta Analizi ile Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 50:135-140.

DOĞAN,İ., DOĞAN,N.,2005. Kuzularda Doğum Ağırlığının Kalite Göstergesi Olarak Kullanılması ve Bunu Etkileyen Faktörlerin Taguchi Yaklaşımı İle İncelenmesi. Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med., 24(1-2-3-4): 53-58.

ELİÇİN, M., TEKEL, N., ELİÇİN, A., 2004. İvesi Kuzularında Doğum Ağırlığının Kalıtım Derecesinin Tahmininde Baba Familya Sayısının Önemi Üzerinde Araştırmalar. Tarım Bilimler Dergisi, 10(2):198-204.

ENSMINGER, M.E., ve PARKER, R.O., 1986. Sheep Boat Science The İnterstate Printers, U.S.A.

ERTUĞRUL, M., DELLAL, G., ELMACI, C., AKIN, A. O., PEHLİVAN, E., SOYSAL, M. İ. AND ARAT, S., 2010. Çiftlik hayvanları genetik kaynaklarının korunması ve sürdürülebilir kullanımı. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak, Ankara s.11-15.

FIKY, Z. A. E., HASSAN G. M., NASSAR, M.,2017. Genetic polymorphism of growth differentiation factor 9 (GDF9)gene related to fecundity in two Egyptian sheep breeds. J Assist Reprod Genet, 34(12):1683-1690

FUENTE, LF., GAB -NA., CAROL_NO, N., UGARTE, E., 2006. The Awassi and Assaf Breeds İn Spain and Porugal, European Association For Animal Production (Eaap), 57 Annual Meeting, Antalya, Sheep and Goat Commission, Awassi Sheep, 14:142.

GÜRSEL, F., AKIŞI., DURAK H., MENGI. A., ÖZTABAK. K.,2011. Determination of BMP-15, BMPR-1B and GDF-9 Gene Mutations of the Indigenous Sheep Breeds in Turkey. Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(5): 725-729.

HANRAHAN, J.P., GREGAN, S.M., MULSANT, P., MULLEN, M., DAVIS, G.H., POWELL, R., GALLOWAY, S. 2004. Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovis aries). Biol. Reprod, 70: 900-909.

HARTL, D.L. and CLARK, A.G. 2007. Principles of Population Genetics Principles of Population Genetics. 4th Edition Sinauer Associates, 978-0-878-93308:2.

HREINSSON, J., SCOTT, J., RASMUSSEN, C., SWAHN, M., HSUEH, A., HOVATTA, O., 2002. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. J. Clin. Endocrinol. Metab., 87(1): 316-321.

JUENGEL, J., BODENSTEINER, K., HEATH, D., HUDSON, N., MOELLER, C., SMITH, P., GALLOWAY, S., DAVIS, G., SAWYER, H., MCNATTY, K., 2004. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. Anim. Reprod. Sci., 82-83:447–460.

KASIRIYAN, M.M.,HAFEZIAN, S.H., and HASSANI, N., 2011. Genetic polymorphism BMP15 and GDF9 genes in Sangsari sheep of Iran. International Journal of Genetics and Molecular Biology, 3(1):.31-34

KAYMAKÇI, M., ve SÖNMEZ, R., 1992. Koyun Yetiştiriciliği, 3. Hasad Yayıncılık, İstanbul, , 78(3): 281-286.

KAYMAKÇI, M., ve TASKIN, T., 2001. Batı Anadolu Ve Trakya'da Melezleme İle Elde Edilen Yeni Koyun Tipleri. Hayvansal Üretim, 42(2): 45-52.

KHODABAKHSHZADEH, R., MOHAMMADABADİ, M.R., ESMAILIZADEH, A.K., SHAHREBABAK, H.M., BORDBAR, F., NAMİN, S.A.,2016.

Identification of point mutationsin exon 2 of *GDF9* gene in Kermani sheep.Polish Journal of Veterinary Sciences, 19(2): 281–289.

KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutinary substituons through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111-122.

KİRAZ, S., KONCAGÜL, 2015. GAP VII. Tarım Kongresi bildiri kitabı, 28 Nisan - 01 Mayıs, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa s655.

KOLOSOV, YU A., GETMANTSEVA , L. V., SHİROCKOVA ,NV., KLİMENKO, A., BAKOEV, S YU., ET AL. 2015 Polymorphism of the *GDF9* Gene in Russian Sheep Breeds. J. Cytol. Histol., 6:1.

KOYUNCU, M., TUNCEL. E., KARAUZUN, Ş., 2001. Karacabey Merinosu Koyunlarda Doğum Ağırlığı Gebelik Süresine Bazı Çevre Faktörlerinin Etkileri ve Genetik Parametreler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,31(2):163-167.

KUTLU, H.R., GÜL, A., GÖRGÜLÜ, M., 2004. Türkiye Hayvancılığının Sorunları ve Çözüm Yolları. Yem Magazin Dergisi, 35:36-37.

LIBRADO, P., and ROZAS, J., 2009. DnaSP v5: A software for comrehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioninformatics, 25: 1451-1452.

LASSOUED, N., BENKHLIL, Z., WOLOSZYN, F., REJEB, A., AOUİNA,M., REKİK,M., FABRE,S., AND ROMDHANI, S. B.,2017. FecXBar a Novel BMP15 mutationresponsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. BMC Genetics, 18:43.

MCNATTY, K.P., SMİTH, P., MOORE L.G., READER, K., LUN S., HANRAHAN, J.P., GROOME N.P., LAİTİNEN M., RITVOS O., JUENGEL J.L., 2005. Oocyte-cxpressed genes affecting ovulation rate. Mol. Cell. Endocrinol, 234: 57-66.

MEADOWS, J. R., CEMAL, I., KARACA, O., GOOTWINE, E., and KIJAS, J. W., 2007. Five ovine mitochondrial lineages identifed from sgeep breeds of the near East. Genetics, 175(3): 1371-1379.

MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res, 16: 1215.

MOHAMMADİ, G.,2012.Determination of *BMP15*, *BMPR1B* and *GDF9* Mutations in Two Breeds of Iranian Sheep (Lory-Bakhtiari and Arabic) by PCR-RFLP.Department of Clinical Science, Veterinary Faculty, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.Proceedingsof the 15th AAAP Animal Science Congress 26-30 November, Thammasat University, Rangsit Campus, Thailand, 1598-1602.

MONTEAGUGUDO, L. PONZ, R. TERESA TEJEDOR, M. LAVINA,A., SİERRA, I., 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. Anim Reprod Sci., 110: 139-146.

MORADBAND, F., RAHIMI, G. AND. GHOLIZADEH, M., 2011. Association of Polymorphisms in Fecundity Genes of GDF9, BMP15 andBMP15-1B with Litter Size in Iranian Baluchi Sheep. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 24(9) : 1179 - 1183.

MULLEN, M. P., HANRAHAN, J. P.2014. Direct Evidence on the Contribution of a Missense Mutation in GDF9 to Variation in Ovulation Rate of Finnsheep.GDF9 Mutation and Ovulation Rate in Sheep Plos,One April, 4:1-6.

NEI, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Colombia University Prees, New York, 3: 679-696.

NICOL, L., BISHOP, SC., PONG-WONG, R., BENDIXEN, C., HOLM, LE., RHIND, SM., MCNEILLY, AS., 2009.Homozygosityfor a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. Reproduction,138:921–933.

ODABAŞIOGLU, F., ARSLAN, M., YERTÜRK, M.,1996. Morkaraman ve Corriedale x Morkaraman (F1) Kuzularda Doğum Ağırlığı ve Yaşama Gücüne, Morkaraman Koyunlarda Gebelik Süresine Bazı Faktörlerin Etkisi. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Dergisi, 7(1 -2): 1-7.

ORAON, T., SİNGH, D. K., GHOSH, M., KULLU, S. S., KUMAR,R., and SİNGH, L. B.,2016. Allelic and genotypic frequencies in polymorphic Booroola fecundity gene and their association with multiple birth and postnatal growth in Chhotanagpuri sheep. Research artıcleVeterinary World, EISSN: 2231-0916.Veterinary World, 9(11): 1294-1299.

ÖZCAN, L., 1997. Küçükbaş Hayvan Yetiştirme II (Koyun ve Yapağı Üretimi). Çanakkale Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay, Adana, s106.

POLLEY, S., DE, S., BATABYAL, S., KAUSHIK, R., YADAV, P., ARORA, J.S., CHATTOPADHYAY, S., PAN, S., BRAHMA, B., DATTA, T.K., GOSWAMİ, S, L. 2009. Polymorphism of fecundity genes (BMPR1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. Small Ruminant Research, 85: 122–129.

RICORDEAU, G., THIMONIER, J., POIVEY, J.P., DRIANCOURT, M.A., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., TCHAMITCHIAN, L. 1990. Research on the Romanov sheep breed in France. A review. Livest. Prod. Sci., 24:305-332.

RODA, D.S., OTTO, P.A., SANYOS, L.E., DOS, DUPAS, W., FEİTOZA, A.S., BIANCHINI, D.,1990. Effect of type of pregnancy (sıngle or twin) on the viability and growth of Polwart snd Corriedale Lambs.Boletim de Industrıa Animal, 47(2):115-119

ROY, J., POLLEY, S., DE, S.,MUKHERJEE, A., S BATABYAL, S., PAN, S., BRAHMA, B., DATTA, T. K., ANDGOSWAMİ, S. LAL., 2011. Polymorphısm of fecundıty genes (fecb, fecx, and fecg) In The Indıan Bonpala Sheep.Animal Biotechnology, 22: 151–162.

SADIGHI, M., BODENSTEİNER, K.J., BEATTIE, A. E., GALLOWAY, S.M. 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. Anim. Genet., 33 (3): 244-24.

SAITOU, N., and NEI, M., 1987. The neighbor-joining method a new method for reconstruction phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.

SILVA, B. D. M., CASTRO, E. A., SOUZA, C. J. H., PAIVA, S. R., SARTORI, R.,FRANCO, M. M.,AZEVEDO, H. C., SILVA, T. A. S. N., VIEIRA, A. M. C., NEVES, J. P., AND MELO, E. O., 2010. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9(GDF9) gene is associated with increased

ovulation rate andprolificacy in homozygous sheep. The Authors, Animal Genetics. Stichting International Foundation for Animal Genetics, 42: 89–92.

SHAFIEIYAN, Z., MOHAMMADİ, G., JOLODARZADEH, A., AMIRI, S.,2013. No mutations of FecB and FecGH in Iranian Lory sheep. Veterinary Research Forum, 4 (4): 265 – 268.

SMITH, J.A. H. 2015.Investigation of polymorphic variation in thegrowth differentiation factor-9 gene (*GDF9*) in New Zealand sheep breeds. Lincoln University Digital Dissertation, 1-47.

SÖNMEZ, R., 1974. Koyunculuk ve Yapağı Elazığ Üniversitesi Ziraat Fakültesi. 2. Baskı No: 108.

TANG,K.Q. YANG,W.C., LI, S.J. ANDYANG, L.G., 2013. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 gene associated with süper ovulation performance in Chinese Holstein cows.Genetics and Molecular Research, 12 (1): 390-399.

TUİK, 2017. https:// www.tuik.gov.tr

VAGE, D. I., HUSDAL, M., MATTHEW, P. K., KLEMETSDAL, G., BOMAN, I. A., 2013. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep. BMC Genetics, 14:1.

WANG, W., LIU, S., LI, F., PAN, X., LI, C., ZHANG, X., MA, Y., LA, Y., XI, R., AND Lİ, T., 2015. Polymorphisms of the Ovine *BMPR-IB*, *BMP-15* and *FSHR* andTheir Associations with Litter Size in Two Chinese Indigenous Sheep Breeds. International Journal of Molecular Sciences, 16:11385-11397.

YOSEFABAD, S.F., SHAYEGH, J., MAHERI-SIS,N., BARZEGARI, A.,GORBANI, A., BIROONARA, A., GHOREISHİ,H., AND LOTFI,A., 2011.Sequence Assigning of the Growth Differentiation Factor-9(GDF9) Gene in Markhoz Goats. International Journal of Animal and Veterinary Advances, 3(4): 274-276.

ZEDER, M.A. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Orgins, diffusion and impact. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 105 (33): 11597-11604.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Nurcan KILIÇ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi :Şanlıurfa 11.11.1991
Telefon :0545 784 24 84
e-mail : A155116019@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Şanlıurfa Kız Lisesi, Merkez, Şanlıurfa	2010
Üniversite	: Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Merkez, Şanlıurfa	2015
Yüksek Lisans	:Harran Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Merkez, Şanlıurfa	2018

UZMANLIK ALANI : Zootekni Bilimi

YABANCI DİLLER : İngilizce