

Pırlak Koyunlarında BMPR1B, BMP15 ve GDF9 Genlerinde Olası Polimorfizmlerin Araştırılması[#]

Koray ÇELİKELOĞLU^{1*}, Metin ERDOĞAN², Özlem HACAN¹, Serdar KOÇAK¹, Zehra BOZKURT¹, Mustafa TEKERLİ¹

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni A.D, Afyonkarahisar

²Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik A.D, Afyonkarahisar

[#]Bu çalışma AKÜ BAPK birimi tarafından 16.KARİYER.135 nolu proje ile desteklenmiştir.

*Corresponding author e-mail: kcelikeloglu@aku.edu.tr

ÖZ

Bu araştırmada, Afyonkarahisar İli Damızlık Koyun-Keçi Yetiştiricileri Birliği damızlık istasyonunda 2016 ve 2017 yıllarında çoklu ve tekli doğum yapanlardan sekizer baş olmak üzere toplam 16 baş Pırlak koyunda Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1B (BMPR1B), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) ve Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) genlerindeki polimorfizmin varlığı ve bunun tespit edilmesi durumunda çoklu doğumla ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere toplanan kan örnekleri hayvanların *V. jugularis*'lerinden EDTA'lı vakumlu tüplere alınmış ve genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonları yapılmıştır. İlgili genler yönünden gerçekleştirilen PCR ve DNA dizileme analizleri sonucunda her üç gen yönünden de Pırlakların monomorfik yapıda olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Pırlak, Döl verimi, BMPR1B, BMP15, GDF9

Investigation of Possible Polymorphisms in BMPR1B, BMP15 and GDF9 Genes in Pırlak Sheep

ABSTRACT

This study was realised to determine the presence of polymorphism in major proliferation genes named Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1B (BMPR1B), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) of 8 uniparous and 8 multiparous Pırlak sheep reared at Sheep and Goats Breeders Association's Breeding Station, Afyonkarahisar between 2016 and 2017. Blood samples collected for using in genetic studies were taken from *V. jugularis* of animals into EDTA vacuum tubes and DNA isolations were performed using genomic DNA isolation kit. The PCR and DNA sequencing analyzes carried out on the basis of the respective genes revealed that Pırlaks are monomorphic in the aspect of above mentioned genes.

Keywords: Pırlak, Proliferacy, BMPR1B, BMP15, GDF9

GİRİŞ

Yağlı kuyruklu Dağlıçlar ile yağsız kuyruklu Kıvırcıkların melezlenmesi sonucunda Pırlaklar elde edilmiştir. Bu ırk orta ırıkta olup renk beyaz, göz etrafında, kulak uçlarında ve ağız etrafında siyah lekelerle rastlanır. Ayakları siyah lekeli olanlar da görülmektedir. Kulaklar yere paralel ve ileriye doğrudur. Erkekler yanlara doğru açılan güçlü spiral boynuzlara sahiptir. Dişiler genel olarak boynuzsuzdur. Kuyruk inceden yarı yağlıya kadar farklılık göstermektedir. Kuyruk yağı uyluktan uca doğru azalan bir yapıdadır. Pırlakların çevre şartlarına direnç bakımından Kıvırcıklara ve kültür koyunlarına, canlı ağırlık ve kuzu verimi bakımından da Dağlıçlara göre daha üstün performans göstermesi nedeniyle yaygınlığının arttığını ve kesim kuzusu elde etmek amacıyla yetiştiricilerce tercih edildiklerini belirtmiştir (Çelikeloğlu 2012). Afyonkarahisar ili Şuhut ilçesinde yürütülen Pırlakların Halk Elinde Islahı-I projesinin sonuç raporunda 2015 - 2016 doğum sezonu için doğuran koyun başına düşen kuzu sayısı elit sürülerde 1.59 bildirilmiştir (Tekerli ve ark. 2016).

Verim yönü et olan koyun yetiştiriciliğinin karlılığı kuzuların ağırlığına ve sayısına bağlıdır. Bu nedenle, seleksiyon genellikle bu özellikler üzerinde yoğunlaşmaktadır (Tosh ve Kemp 1994). Fertilite özelliğinin kuzu eti üretiminde karlılık ve verim anlamında büyük etkisi bulunmaktadır (Kumm 2008). Koyunlarda, ovülasyon oranı ve bir doğumdaki kuzu sayısı, fertilite özelliği için yüksek ekonomik öneme sahiptir (Notter 2008). Fertilite ile ilişkili özelliklerin genellikle kalıtım derecelerinin düşük olması nedeniyle bu yönlü ıslahta moleküler tekniklerin kullanılması ve sonuçların sayısal verilerle birleştirilmesi önem kazanmaktadır. Ayrıca koyunlarda ovülasyon oranı ve bir doğumdaki kuzu sayısı sadece dişi cinsiyet üzerinde ve ancak doğum yaptıktan sonra gözlemlenebilmektedir. Bu durumda ıslah sürecinin uzaması nedeniyle moleküler tekniklerin kullanımı ağırlık kazanmaktadır (Pramod ve ark. 2013).

Koyunlarda çoklu doğum özelliğine ait major genler üzerindeki genetik mutasyonlar ovülasyon oranını ve bir doğumdaki kuzu sayısını artırmaktadır (Karlı ve ark. 2012). Ovaryum'dan elde edilmiş Transforming Growth Factor- β (TGF β) süper familyasına ait BMPR1B, BMP15 ve GDF9 genleri ovülasyon oranına etkilidir (Pramod ve ark. 2013). Bu genlerin tek bir allelindeki mutasyon özelliğın ekspresyonu için yeterli olmaktadır (Davis 2005).

BMPR1B diğer adıyla Booroola (Fec B) geni, 6. kromozom üzerinde olup ovaryumdaki bone

morphogenetic protein 1B reseptörünü kodlamaktadır (Davis 2005). Booroola geni, 1980'li yıllarda Avustralya'da çoklu doğum genleri içinde ilk bulunan ve mutasyon tespit edilen gendir (Davis ve ark. 1982). Bu genin, 1790'lı yıllarda Hindistan'dan getirilen Garole veya Bengal koyunu olarak bilinen koyunla getirildiği, merinos sürülerinin fertilitelerini artırmak için kullanıldığı ve böylece Booroola hattının oluşturulduğu bildirilmektedir (Davis ve ark. 1982). Avrupa koyun ırklarında olmadığı tespit edilen bu mutasyonun Çin'de kısa kuyruklu Han ve Hu, Hindistanda Kendrapada ve Endonezya'da Javanese koyunlarında varlığı tespit edilmiştir (Davis ve ark. 2002, Davis ve ark. 2006, Fogarty 2009). BMPR 1B mutasyonu ovülasyon oranı için eklemeli, bir doğumdaki kuzu sayısı için kısmi dominanttır. Heterozigotluk halinde ovülasyon oranı 1.3- 1.72 ve homozigot mutasyon varlığında ise 2.7-3.0 kadar yükselirken, bir doğumdaki kuzu sayısı heterozigotluk halinde 0.9-1.32, homozigotluk halinde ise 1.1-1.7 düzeyinde artmaktadır (Piper ve ark. 1982, Logue ve ark. 1990, Dodds ve ark. 1991).

BMP15 diğer adıyla GDF9B (FecX) geni, koyunlarda foliküler gelişim için gerekli olan ve ovaryum kökenli büyüme faktörü, bone morphogenetic protein 15'i kodlayan gendir (Hanrahan ve ark. 2004). Koyunlarda X kromozomunda bulunan FecX, 5.4 kb büyüklüğündedir ve bir intron ile iki eksondan oluşmaktadır. Bu gen 393 aminoasit içeren bir prepropeptid kodlamaktadır. Koyunlarda BMP15 folliküllerin preovülasyon safhasına gelişimlerini engellerken, follikülogenezin erken dönemlerinde folliküllerin gelişimini destekler. Bu nedenle BMP-15 ovülasyon sayısı ve kuzulama sayısının belirlenmesinde çok önemli bir rol üstlenir (Gürsel 2009). Bu gen X kromozomunda bulunduğu için erkekler bu genin sadece bir kopyasını taşıyabilirler ve bu kopyayı erkek yavrularına geçiremezken dişi yavrularına geçirebilmektedirler (Davis 2005). Homozigot taşıyıcı olan dişilerin kısır olduğu ilk olarak Romney ırkı koyunlarda bulunmuş ve Inverdale geni (FecX^I) olarak isimlendirilmiştir. Koyunlarda BMP15 folliküllerin preovülasyon safhasına gelişimlerini engellerken, follikülogenezin erken dönemlerinde folliküllerin gelişimini destekler. Bu nedenle BMP15 ovülasyon sayısı ve kuzulama sayısının belirlenmesinde çok önemli bir rol üstlenir (Gürsel 2009). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda BMP15 geni için Romney koyunlarında FecX^I, FecX^H, Galway koyunlarında FecX^G, Belclare koyunlarında FecX^B, Lacaune koyunlarında FecX^L, Rasa Aragonesa koyunlarında FecX^R, Grivette koyunlarında FecX^{Gr} ve Olkaska koyunlarında FecX^O olmak üzere sekiz adet tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide

polimorphism: SNP) tespit edilmiştir. (Davis 1982, Alink ve ark. 2005, Davis 2005, Bodin 2007, Gürsel 2009, Monteagudo ve ark. 2009, Demars ve ark. 2013, Drouilhet ve ark. 2013). BMP 15 geni yönünden, Romney koyunlarındaki FecX^L, FecX^H, Galway koyunlarındaki FecX^G, Belclare koyunlarındaki FecX^B, Lacaune koyunlarındaki FecX^L ve Rasa Aragonesa koyunlarındaki FecX^R mutasyonları heterozigot olarak taşındığında bunun ovülasyon oranını ve bir doğumdaki kuzu sayısını artırdığı, ancak homozigotluk durumunda infertilite problemlerine neden olduğu bildirilmiştir (Davis 2005, Gürsel 2009, Monteagudo ve ark. 2009, Demars ve ark. 2013, Drouilhet ve ark. 2013). Bununla beraber Grivette koyunlarındaki FecX^{Gr} ve Olkaska koyunlarındaki FecX^O mutasyonlarının diğerlerinin aksine homozigot hale geçmesi durumunda koyunların çoklu doğum oranında yükselmeye yol açtığı bildirilmiştir (Demars ve ark. 2013).

GDF9 geninin koyunlarda ovülasyon ve doğum oranlarına etkisinin olduğu ve koyunların 5. kromozomunda bulunan 2.5 kb büyüklüğünde bir adet intron ve iki adet eksondan oluştuğu, ayrıca 453 aminoasitten oluşan bir prepropeptidi kodladığı bildirilmektedir (Sadighi ve ark. 2002). GDF9 genindeki FecG^H mutasyonu C'nin T'ye değişmesi sonucu olgunlaşmış peptidin 77. pozisyonunda serinin yerine fenilalaninin geçmesine neden olmaktadır (Hanrahan ve ark. 2004). Gürsel (2009), GDF9 genindeki mutasyonun BMP15 mutasyonuna kıyasla ovülasyon oranı üzerine daha büyük etkisinin olduğunu bildirmiştir. Dahası bu araştırmacı ovülasyon oranının hem BMP15 hem de GDF9 mutasyonlarını birlikte heterozigot olarak taşıyanlarda, bu mutasyonların sadece birini heterozigot taşıyanlara göre daha fazla olduğunu ifade etmiştir.

Pırlaklarda daha önce çoklu doğum ve buna ilişkin genler üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışma, bu yönüyle öncü niteliğinde olup çoklu doğum yönünden literatür bildirişleri doğrultusunda majör genler olarak bilinen BMP1B, BMP15 ve GDF9'daki olası polimorfizmlerin Pırlak koyunlarda varlığının araştırılmasını amaçlamıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Araştırma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) koordinatörlüğünde Halk Elinde Ülkesel Küçükbaş Hayvan Islahı projesi kapsamında Pırlaklarda yürütülen projeye paralel olarak Afyonkarahisar İli Damızlık Koyun-Keçi Yetiştiricileri Birliği damızlık yetiştirme ve test istasyonunda elit sürü olarak yetiştirilen en az iki

kez tek ve en az iki kez çoklu doğum yapmış 16 baş Pırlak koyun üzerinde 2016-2017 yılları arasında yürütülmüştür. Ayrıca mevcut çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 08.11.2016 tarihli ve 49533702/160 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

Kan Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu

Genetik çalışmalarda kullanılmak üzere toplanan kan örnekleri hayvanlarda *V. jugularis*'den EDTA'lı vakumlu tüplere alınmıştır. Kan örnekleri soğuk zincir ile laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonu aşamasına kadar cryo tüplere konup -20°C'de saklanmıştır. Kandan DNA izolasyonu spin kolon kullanılarak Boom ve ark. (1990)'nın yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri %0,6'lık agaroz jelde bütünlükleri açısından kontrol edilmiş, miktarı ve kalitesi spektrofotometre cihazları (Multiscan GO ve Qubit) kullanılarak ölçülmüştür. DNA örnekleri 20 ng/µl olacak şekilde ayarlanmış ve analize kadar -20°C'de saklanmıştır.

PCR ve DNA Dizileme Analizleri

PCR analizi için Tablo 1'de verilen ve FastPCR 6.0 paket programı ile hazırlanan primerler kullanılmıştır (Kalendar ve ark. 2009).

Toplam 25 µl olan PCR karışımında, 2 µl DNA (20 ng/µl), her bir primerden (10pmol) 0,7 µl, 10xPCR buffer 2.5 µl, dNTP karışımından 0.5 µl (10mM, Roche), Platinum Taq Polimeraz (Thermo) 0.125 µl ve ddH₂O dan 18.5 µl bulunmaktadır. Reaksiyonlar ABI Veriti PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR cihazı 94 °C'de 2 dk; 35 döngü 94 °C'de 40 sn, T_m (melting temperature) (Tablo 1) 30 sn ve 72°C'de 1 dk, son aşamada 72°C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir.

PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla %2'lik agaroz jel hazırlanmış ve Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. PCR ürünleri daha sonra ExoSAP ile temizlenmiştir. PCR ürünlerinin temizlenmesi amacıyla PCR tüpü içerisine 5 µl PCR ürününün, 0,5 µl Exonuclease-I (Thermo, EN0582) ve 1,0 µl FastAP (Thermo, EF0652) eklenmiştir. Hazırlanan karışım PCR cihazına konularak 37 °C ' de 15 dakika, 85 °C ' de 15 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

DNA dizileme analizi için BigDye Terminator v3.1'den 2 µl, 1x sequencing buffer'dan 11 µl, ileri veya geri primerden (1 pmol) 5 µl ve PCR ürününden 2 µl olmak üzere toplam 20 µl karışım hazırlanmış ve PCR cihazı 96°C' de 30 sn ön

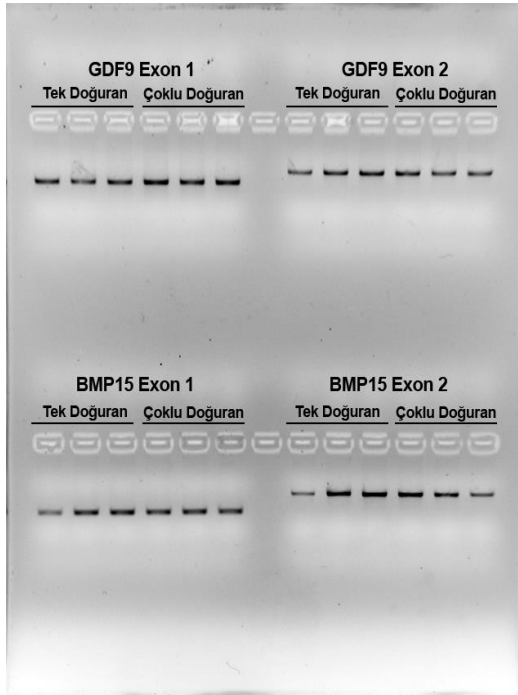
denatürasyon; ayrılma 96°C’ de 10 sn, yapışma 50°C’ de 15 sn ve uzatma 60°C’ de 4 dk 30 döngü olacak şekilde programlanmıştır. Daha sonra PCR ürünleri BigDye XTherminator ile temizlenmiş ve DNA dizileme cihazına (ABI 3500) yerleştirilmiştir. DNA dizileme analizi sonucu her bir örnek Sequencher 5.4.1 (Gene Code Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA) analiz programı ile düzenlenmiş, *BioEdit* 7.0.9 Sequence Alignment (Hall 1999) programı yardımıyla hizalanmış ve polimorfizmler belirlenmiştir.

BULGULAR

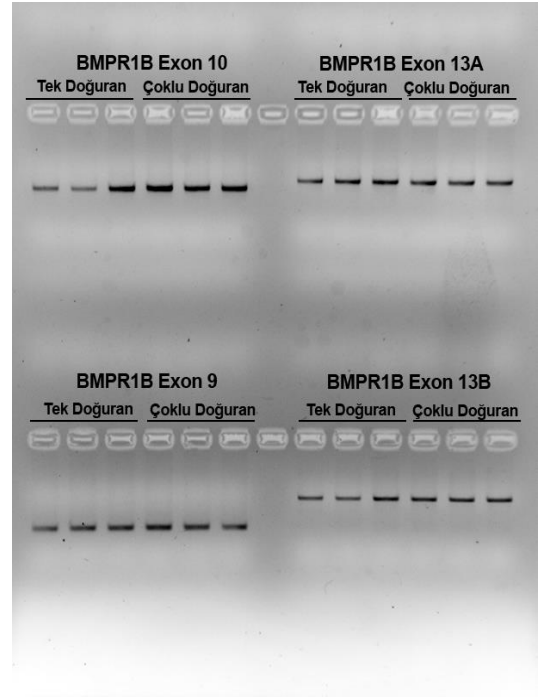
PCR analizi sonucunda BMPR1B geninin 9. eksonunda 419 bp, 10. eksonunda 696 bp ve 13. eksonunda 852 bp ile 957 bp büyüklüğünde, BMP15 geninin 1. eksonunda 462 bp ve 2. eksonunda 924 bp, GDF9 geninin 1. eksonunda 708 bp ve 2. eksonunda 1043 bp büyüklüğünde PCR ürünleri elde edilmiştir (Şekil 1-2, Tablo-1). Yapılan DNA dizileme analizi sonrası DNA dizileri düzenlenmiş ve hizalanarak polimorfizmler yönünden değerlendirme yapılmıştır. Analizler sonucunda tek ve çoklu doğum yapan Pırlıklarda BMPR1B, BMP15 ve GDF9 genlerinde polimorfizm saptanmamıştır.

Tablo 1. Çoklu doğumu etkileyen genler, büyüklükleri ve Tm dereceleri
Table 1. Sizes and Tm degrees of Genes affecting fecundity

Gen	İleri (Forward) primer	Geri (Revers) primer	T _m (°C)	Büyükük (bp)	
BMPR1B	Ekson 9	TGTGTCTGCTGTATTGGCACAC	GCTAGGAAACCCTGAACATCG	59	419
	Ekson 10	AGACACCTATGACAAAAGGACG	GCACACAATCCCAGACATTAGC	59	696
	Ekson 13a	GTATCGAGTGCCAGCCTTGCA	TCCACATCCTCTGAAGCTGC	63	852
	Ekson 13b	TCTGGGGATTCCCACCCATGAC	GCAAAGAAGAGGGGCTTCCCAA	59	957
BMP15	Ekson 1	ACATGTTGCTGAACACCAAGC	AGGCAATGTGAAGCCTGACA	63	462
	Ekson 2	CAGTTTGTACTGAGCAGGTC	GGCAATCATAACCCTCATACTCC	63	924
GDF9	Ekson 1	GAATTGAACCTAGCCCACCCAC	AGCCTACATCAACCCATGAGGC	63	708
	Ekson 2	AGGAACCTTTCCATCAGTGGA	TCTTCCCAAAGGCATAGACAGG	58	1043



Şekil 1. GDF9 ve BMP 15 genlerine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü
Figure 1. Gel electrophoresis of PCR products of GDF9 and BMP15 genes



Şekil 2. BMPR 1B genine ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü
Figure 2. Gel electrophoresis of PCR products of BMPR1B gene

TARTIŞMA

Ovülasyon oranını artıran BMPR1B (booroola) geninin, Garole, Han, Hu, Kendrapada ve Javanese koyun ırklarında varlığı tespit edilmiştir (Davis ve ark. 2002, Davis ve ark. 2006, Fogarty 2009). BMPR 1B mutasyonu ovülasyon oranı için eklemeli, bir doğumdaki kuzu sayısı için kısmi dominanttır. Heterozigotluk halinde ovülasyon oranı 1.3-1.6 ve homozigot mutasyon varlığında ise 2.7-3.0'e yükselirken, bir doğumdaki kuzu sayısı heterozigotluk halinde 0.9-1.2, homozigot mutasyon halinde ise 1.1-1.7 düzeyinde artmaktadır (Piper ve ark. 1982, Dodds ve ark. 1991). Logue ve ark. (1990) tarafından yapılan bir çalışmada Texellerle Booroola Merinoslarının melezlenmesi sonucu meydana gelen Texel x Booroola Merinosu F₁ koyunlarının ovülasyon düzeyinin Texel ırkı koyunlara kıyasla 1.72 ve bir doğumda kuzu sayısının ise 1.32 kat yükseldiği tespit edilmiştir.. Bu bulgulara göre BMPR1B geninin diğer ırklarda da döl verimi üzerine pozitif etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada Pırlak koyunlarda BMPR 1B geninde incelenen eksonlar bakımından polimorfizme rastlanmamıştır.

BMP15 geninde FecX^I ve FecX^H mutasyonlarına sahip heterozigot koyunlarda ovülasyon 1.0, çoklu doğum 0.6 düzeyinde yükselmekte iken homozigotluk durumunda infertilite problemleri çıktığı bildirilmiştir (Davis 1992, Alink ve ark. 2005, Davis 2005). Belclare allelinin bir kopyasını taşıyan heterozigot koyunlardaki ovülasyon oranı 1.0 düzeyinde yükselmekte olup diğer FecX mutasyonlarında olduğu gibi homozigot FecX^B koyunlarının steril olduğu belirtilmektedir (Davis 2005). Galway allelinin bir kopyasını taşıyan koyunların ovülasyon oranının 0.7 oranında yüksek olduğu tespit edilmiştir. FecX^I ve FecX^H mutasyonlarında olduğu gibi FecX^G mutasyonunu homozigot olarak taşıyan koyunlarda sterilite şekillenmektedir (Davis 2005, Gürsel 2009). Lacaune ırkında saptanan FecX^L mutasyonunu heterozigot olarak taşıyanların, taşımayanlara göre ortalama 1.5 adet daha fazla ovülasyona sahip olduğu bildirilmiştir. Bu mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda ise infertilite problemi olduğu saptanmıştır (Bodin 2007). İspanya koyun ırklarından olan Rasa Aragonesa koyunlarında bulunan FecX^R mutasyonunu taşıyan heterozigot koyunlarda çoklu doğum oranı 2.66'ya yükselirken taşımayan koyunlarda bu oranın 1.36 olduğu tespit edilmiştir. Mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda infertilite problemi yaşandığı bildirilmiştir (Monteagudo ve ark. 2009). Demars ve ark. (2013) Fransa'nın Grivette ve Polonya'nın Olkaska koyun ırklarındaki BMP15 geninde FecX^{Gr} ve FecX^O mutasyonları bulunduğunu ve diğer mutasyonların aksine homozigot mutasyona sahip

koyunların çoklu doğum oranında yükselme olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada BMP 15 geni bakımından Pırlakların bir varyasyon göstermedikleri ve monomorfik oldukları tespit edilmiştir.

Koyunlarda yapılan ölçümlere dayanılarak GDF9 mutasyonunun BMP15 mutasyonuna kıyasla ovülasyon oranı üzerine daha büyük etkisi olduğu ve Cambridge ile Belclare ırklarında bir adet FecG^H taşıyanların ovülasyon oranlarının ortalama 1.4 civarında arttığı bildirilmiştir (Gürsel 2009). İlginç bir şekilde hem BMP15 hem de GDF9 mutasyonlarını heterozigot taşıyanlar, bu mutasyonları ayrı ayrı taşıyan heterozigot taşıyıcılardan daha yüksek ovülasyon miktarına sahip olmaktadır (Gürsel 2009). Bu çalışmada GDF9 geni yönünden pırlaklarda herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır.

SONUÇ

Araştırmada, çoklu doğumu belirleyen BMPR1B, BMP15 ve GDF9 isimli üç farklı gen ele alınmış ve her üç gen yönünden de Pırlak koyunların monomorfik yapıda oldukları tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, Pırlaklarda çoklu doğumu belirleyen bu genler yönünden daha kapsamlı araştırmalar yapılması ve çoklu doğumu etkileyen diğer genler yönünden de ırkın incelenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alink F M, Mylne MJA, Watt RG, Kenyon P, Wood MJ, McEvoy TG.** Inverdale fecundity gene (FecXI) influences twin ovulation incidence in pubertal ewe lambs from Texel sires and Cheviot or Scottish 2005; <http://www.bsas.org.uk/wp-content/themes/bsas/proceedings/Pdf2005/055.pdf>Blackface dams, 15.01.2016.
- Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P.** A Novel Mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causing Defective Protein Secretion Is Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Lacaune Sheep. *Endocrinology*, 2007; vol. 148(1), ss. 393–400.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim Van Dillen PME, Van der Noordaa J.** Rapid and simple method for purification on nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990; ss.495-503.
- Çelikeloğlu K.** Pırlak Kuzularında Büyüme Eğrilerini Etkileyen Genetik ve Çevresel faktörlerin belirlenmesi ve eğri parametreleri

yönünden baba koçların değerlendirilmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Afyonkarahisar, 2012.

- Davis GH, Montgomery GW, Allison AJ, Kelly RW, Bray AR.** Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1982; vol. 25, ss. 525–529.
- Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar B, Gray GD, Subandriyo I, Tiesnamurti B, Martyniuk E, Eythorsdottir E, Mulsant P, Lecerf F, Hanrahan JP, Bradford GE, Wilson T.** DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*, 2002; vol. 66, ss. 1869–1874.
- Davis GH.** Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 2005; vol. 37, ss.11–23.
- Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway SM, Lumsden BM, Hanrahan JP, Mullen M, Mao XZ, Wang GL, Zhao ZS, Zeng YQ, Robinson JJ, Mavrogenis AP, Papachristoforou C, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett NE, Eythorsdottir E, Arranz JJ, Notter D.** Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science*, 2006; vol. 92, ss. 87–96.
- Demars J, Fabre S, Sarry J, Rossetti R, Gilbert H, Persani L, ... & Martyniuk E.** Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS genetics*, 2013; 9(4), e1003482.
- Dodds KG, Davis GH, Elsen JM, Isaacs KL, Owens JL.** The effect of Booroola genotype on some reproductive traits in a Booroola Merino flock. In Elsen J.M., Bodin L., Thimonier J. (Ed), “Major genes for reproduction in sheep”. INRA, Paris: 1991; 359-366.
- Drouilhet L, Mansanet C, Sarry J, Tabet K, Bardou P, Woloszyn F, Lluch J, Harichaux G, Viguie' C, Monniaux D, Bodin L, Mulsant P, Fabre S.** The Highly Prolific Phenotype of Lacaune Sheep Is Associated with an Ectopic Expression of the B4GALNT2 Gene within the Ovary. *PLoS Genetics*, 2013; vol. 9(9): e1003809.
- Fogarty NM.** A review of the effects of the Booroola gene (FecB) on sheep production. *Small Ruminant Research*, 2009; vol. 85, ss. 75-84.
- Gürsel FE.** Mutations in BMPR-1B, BMP-15 and GDF-9 genes and their effects on fecundity and ovulation rate in sheep. *Veteriner Fakültesi Dergisi (İstanbul)*, 2009; Vol 35(2), ss. 57-66
- Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 1999; 41, ss. 95-98.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM.** Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction*, 2004; vol. 70, ss. 900–909.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH.** FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 2009; 3(1): 1-14.
- Karşlı T, Şahin E, Karşlı BA, Alkan S, Balcioğlu, MS.** An investigation of mutations (FecXG, FecXI, FecXH, FecXB) on BMP-15 gene in some local sheep breeds raised in Turkey. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2012; 25(1): 29-3.
- Kumm KI.** Profitable Swedish lamb production by economic scale. *Small Ruminant Research*, 2008; vol. 81, ss. 63–69.
- Logue DN, Gill A, MacAuslan J, Waterhouse A, Boyd JS, Harvey MJA.** The incorporation of the 'Booroola gene' into the Texel breed of sheep. *Animal Breeding Abstracts*, 1990; 60-3033.
- Monteagudo LV, Ponz R, Tejedor MT, Lavina A, Sierra I.** A 17 bç deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science*, 2009; vol. 110, ss. 139–146.
- Notter DR.** Genetic Aspects of Reproduction in Sheep. *Reproduction in Domesticated Animals*, 2008; vol. 43, ss. 122-128.
- Piper LR, Bindon BM, Nethery RD.** The Booroola Merino and the performance of medium non-peppin crosses at Armidale. The Booroola Merino, *Proceedings of a*

Workshop, Armidale, CSIRO, 1982. ss. 9–19.

Pramod KR, Sharma SK, Kumar R, Rajan A. Genetics of ovulation rate in farm animals. *Veterinary World*, 2013; vol. 6(11), ss. 833-838.

Sadighi M, Bodensteiner KJ, Beattie AE, Galloway SM. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Anim. Genet.*, 2002; 33 (3): 244-245.

Tekerli M, Erdoğan M, Koçak S, Çelikeloğlu K, Bozkurt Z, Hacan Ö. Halk Elinde Küçükbaş Hayvan Islahı Ülkesel Projesi, Pırlak koyunlarının halk elinde ıslahı projesi kesin raporu, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2016.

Tosh CC, Kemp RA. Estimates of variance components for lamb weights in three sheep populations. *Journal of Animal Science*. 1994; 72: 1184-1190.