

Karya Koyunlarda Mikrosatellit İşaretleyicilerle Babalık Testi ^[1]

Onur YILMAZ *  Orhan KARACA *

[1] Bu makale, Onur YILMAZ'ın Adnan Menderes Üniv. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (ZRF-7016) doktora tezi projesinden üretilmiştir

* Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, TR-09010 Aydın - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6512

Özet

Çalışmada 10 mikrosatellit lokusu (MAF65, OarJMP58, OarFCB193, OarFCB304, OarJMP29, BM8125, OarFCB128, OarCP34, OarVH72, DYMS1) kullanılarak Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP) çekirdek sürüsünde yer alan 16 koç ve bunların 101 yavrusunda babalık testi yapılmıştır. Çalışmada 105 allel gözlemlenmiştir. Lokuslar bazında gözlenen heterozigotluk oranı (Ho) 0.541 ile 0.841 arasında, beklenen heterozigotluk oranı (He) ise 0.699 ile 0.831 arasında olmuştur. Çalışmada, lokusların bireysel olarak dışlama olasılıkları (PE) ve artan lokus kombinasyonları için dışlama olasılıkları (CPE) hesap edilmiştir. PE değeri 0.295 ile 0.514; CPE değeri ise 0.363 ile 0.994 arasında değişmiştir. Karşılama olasılığı (MP) değeri 0.054 ile 0.154, tanımlama gücü (PD) değeri ise 0.85 ile 0.94 arasında değişmiştir. Elde edilen sonuçlar ülkemizdeki diğer popülasyonlar için bir referans teşkil edecektir.

Anahtar sözcükler: Paternity Analysis with Microsatellite Markers in Karya Sheep

Paternity Analysis with Microsatellite Markers in Karya Sheep

Summary

In the present study, 10 microsatellite loci (MAF65, OarJMP58, OarFCB193, OarFCB304, OarJMP29, BM8125, OarFCB128, OarCP34, OarVH72, DYMS1) were evaluated for their possible use to confirm paternity between 16 rams, their 101 offspring in nucleus flock of Adnan Menderes University Group Sheep Breeding Program (ADU-GKYP). A total of 105 alleles were observed in this study. The estimated observed heterozygosities (Ho) were between 0.541 and 0.841 and expected heterozygosities (He) were between 0.699 and 0.831. Probability of exclusion (PE) for each locus and probability of exclusion for increasing combinations (CPE) of the 10 loci were calculated. PE for each locus were between 0.295 and 0.514, CPE of the 10 loci were between 0.363 and 0.994. Matching probability (MP) (between 0.054 and 0.154) and power of discrimination (PD) (between 0.85 and 0.94) were also calculated. These results can also be used as a reference for the other sheep population in Turkey.

Keywords: Paternity analysis, Probability of exclusion, Karya sheep, Microsatellite

GİRİŞ

Yirminci yüzyılda özellikle çiftlik hayvanlarında yapılan ıslah çalışmalarında istatistik metotlar yaygın bir uygulama alanı bulmuştur ¹. Son birkaç on yılda ise moleküler biyoloji ve istatistik bilimindeki son gelişmeler, çiftlik hayvanlarında genetik ilerleme için büyük etkili kantitatif karakter lokuslarının (QTL) ve genomik varyasyonun tanımlanmasını ve kullanılmasını olanaklı hale getirmiştir ². İnsanoğlunun artan isteklerine cevap verebilmek için daha yüksek ve kaliteli üretim yapmak kaçınılmazdır. Bu nedenle özellikle hayvansal üretimde hayvanların bireysel olarak tanımlanması gerekmektedir. Önceleri bireysel tanımlamalarda kullanılan; kan gruplarının tiplendirilmesi ve biyokimyasal polimorfizm

tespitine yönelik yöntemlerin yerini DNA temeline dayalı tanımlama yöntemleri almıştır. 1989 yılında ilk kez mikrosatellit (STR - Short Tandem Repeat) olarak adlandırılan ve DNA'da ardışık tekrarlar şeklinde yer alan yüksek düzeyde polimorfik yapılar dikkati çekmiş ve bu yapılar kullanılmaya başlanarak başarılı sonuçlar alınmıştır. Moleküler belirteçler hayvancılıkta; popülasyonların tanımlanmasında, pedigr analizlerinde, hayvansal ürünlerin orijinlerinin belirlenmesinde, gen fonksiyonlarının belirlenmesinde, evrim hakkındaki bilgilerin artırılması, genom haritalarının çıkarılmasında, seleksiyonda, koruma programlarında genetik yapının korunup korunmadığının kontrolünde, kimlik tanımda ve



İletişim (Correspondence)



+90 256 7727023



oyilmaz@adu.edu.tr

hayvanların kimi ender genleri taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır³⁻⁵.

Bireyler arasındaki akrabalık ilişkileri ebeveyn testleri ile belirlenebilmektedir. Bunun için; biyokimyasal yöntemler, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism ve mikrosatellit (STR-Short Tandem Repeat) gibi moleküler genetik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Ebeveyn testleri ve genetik çeşitliliğin ortaya konmasında mikrosatellit işaretleyicilerin kullanımının, klasik kan grupları veya serum protein tiplendirme yöntemlerine göre daha güvenilir ve etkili bir yol olduğu bildirilmektedir⁶⁻⁹.

Hayvan ıslahında, özellikle damızlık hayvan seçiminde, düzenli bir soy kütüğünün tutulmasının yanı sıra ebeveynlere ait bilgilerin doğruluğu da önemli bir koşuldur. Özellikle koyun ve keçi gibi çoğuz doğum yapan ve sürüler halinde bir arada yetiştirilen çiftlik hayvanlarında, ebeveynlere ait bilgilerde çeşitli nedenlerden kaynaklanan hatalar yapılabilen ve soy kütüğüne yanlış bilgiler kaydedilebilmektedir. Bunun gibi şüpheli durumlarda ebeveyn kontrol yöntemlerine başvurularda doğru bilgiler ortaya çıkarılabilmektedir. Ebeveyn tahmininde yapılan hatalar, tahmin edilen döl farklılığı (EPD) üzerine olduğu kadar popülasyon genetiği parametrelerinin tahmininde de hatalara neden olmaktadır. Yapılan bu ebeveyn hatalarının %20 civarında olması, popülasyondaki yıllık genetik ilerlemenin şiddetli bir biçimde düşmesine neden olmaktadır¹⁰⁻¹⁵. Bu bağlamda büyük oranda ekstansif koşullarda gerçekleştirilen ülkemiz koyuncululuğu için oluşturulacak ıslah programlarında babalık testlerinin doğru biçimde kullanılması damızlık değeri tahminlerinin isabet derecesini artıracaktır. Buna ek olarak daha önce pedigrî bilgileri bilinmeyen bir popülasyona ait bilgiler temelden oluşturulabileceği gibi var olan pedigrîler kontrol edilerek yanlış kaydedilen bilgiler düzeltilebilecektir.

Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP), Aydın ili koyunculuk alt yapısına yönelik olarak 1994 yılında başlanan çalışmalar sonucunda yetiştirici katılımı sağlanarak hayata geçirilen bir ıslah programıdır. Program çerçevesinde yüksek üreme performansı ve süt verim yeteneğine sahip bir genotip olan Karya koyununa yönelik olarak tabakalı açık çekirdek yetiştirme sistemi öngörülerini gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır. Karya koyununun oluşumuna katkıda bulunan ırkların katkı düzeyi tam belli değildir. Yoğunluk Sakız ve Kıvrıkcık genotipine ait olmakla birlikte yöresel koyunların da katkısı söz konusudur. Yapılan saha araştırmalarında Karya koyununun Aydın dışında başta İzmir ve Denizli olmak üzere diğer komşu illerde de yetiştiriciler tarafından tercih edildiği ve yaygın olarak yetiştirildiği belirlenmiştir¹⁶⁻¹⁸.

Bu çalışmada, ADÜ-GKYP Karya Elit sürüsünde yer alan üstün verimli bireylerin damızlık olarak seçilebilmesi için gerekli olan baba bilgilerinin doğruluğunun test edilmesi ve bu genotipte babalık testlerinde kullanılabilecek uygun mikrosatellit belirteçlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada babalık testi için Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP) Karya Elit sürüsünde bulunan Karya hayvanlar kullanılmıştır. Çalışmada toplam 16 koç ve bunlardan olan 101 kuzudan tekniğine uygun olarak kan örneği alınmıştır.

Çalışmada flüoresan boya ile (D2, D3, D4) işaretlenmiş ve FAO tarafından tavsiye edilen mikrosatellit listesinden (19) seçilen 10 mikrosatellit lokusu (OarCP34, OarFCB193, OarFCB304, OarJMP29, OarFCB128, BM8125, OarJMP58, OarVH72, MAF65, DYMS1) kullanılmıştır. 10 mikrosatellit lokusunun 8'i ile 3 farklı multipleks grup oluşturulmuş primer bağlanma sıcaklıkları bu multipleks gruplara uymayan diğer 2 mikrosatellit lokusu (MAF65 ve DYMS1) ise ayrı ayrı yükseltgenmiştir. Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokuslarına ait bilgiler *Tablo 1*'de verilmiştir.

Kan örneklerinden DNA izolasyonu için DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır Touchdown polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile, ilgili DNA bölgeleri yükseltgenmiştir (*Şekil 1*).

Termal çeviricide primerlere özgü DNA bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan touchdown PZR programı *Tablo 2*'de verilmiştir.

Her bir mikrosatellit lokusu için tüplerdeki toplam hacim 25 µl olacak şekilde, dNTP (0.2 mM), MgCl₂ (2.0 mM), primerler (0.25 mM), ve Taq DNA polimeraz ile 100 ng Genomik DNA ve ddH₂O içeren PZR master miks oluşturulmuştur. Fragman analizleri Beckman Coulter CEQ 8000 cihazında yapılmıştır. Fragman analizi sonucu oluşan fragman uzunlukları (*Şekil 2*) Beckman Coulter CEQ 8000 yazılımında değerlendirilmiştir.

Mikrosatellit lokuslarına ait allel sayıları (n_A), etkili allel sayısı (n_E), polimorfik bilgi içeriği (PIC), gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e), ortalama heterozigotluk (\bar{H}) oranları ve null alleller hesaplanmıştır²⁰⁻²³. Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokuslarından elde edilen bilgilerin Hardy-Weinberg dengesine uygun olup olmadığını bir başka ifade ile gözlenen ve beklenen frekanslar arasındaki bağlantıyı bulmak için ki-kare (χ^2) testi kullanılmıştır.

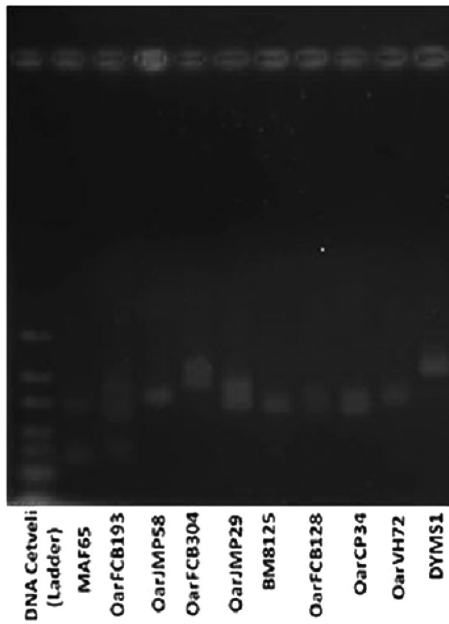
Babalık testi için, babalık indeksi (PI), ayırtılma gücü (PD), dışlama olasılığı (P_E) ve kombine edilmiş dışlama olasılıkları (CP_E) hesaplanmıştır²⁴⁻²⁶. İstatistik analizler için GenAEx²⁷, Cervus 3.0^{28,29}, PowerStatsV12³⁰ GENEPOP³¹ ve Popgene³² programları kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada 10 mikrosatellit lokusu (MAF65, OarJMP58, OarFCB193, OarFCB304, OarJMP29, BM8125, OarFCB128, OarCP34, OarVH72, DYMS1) kullanılarak Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP) Elit sürüsünde yer alan 16 koç ve bunların 101 yavrusunda

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mikrosatellitlere ait bilgiler**Table 1.** Details of considered microsatellites

Lokus Adı	Primerler	Baz Çifti (bp)	Multipleks Grup	Fluoresan İşaret
OarCP34	F: GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG R: GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC	112-130	1	D4
OarFCB304	F: CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG R: CGCTGTCTGCAACTGGGTCAGGG	150-188		D3
OarFCB193	F: TTCATCTCAGACTGGGATTCAGAAAGGC R: GCTTGGAAATAACCTCCTGCATCCC	96-136		D3
OarJMP29	F: GTATACACGTGGACACCGCTTTGTAC R: GAAGTGGCAAGATTCAGAGGGGAAG	96-150	2	D4
OarFCB128	F: ATTAAGCATCTTCTCTTTATTTCTCGC R: CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG	96-130		D2
BM8125	F: CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG R: GGGGGTTAGACTTCAACATACG	116-122		D3
OarJMP58	F: GAAGTCATTGAGGGGTCGCTAACC R: CTTTCATGTTACAGGACTTCTCTG	145-169	3	D4
OarVH72	F: GGCCTCTCAAGGGGCAAGAGCAGG R: CTCTAGAGGATCTGGAATGCAAAGCTC	121-135		D3
DYMS1	F: AACACATCAACAGTAAGAG R: CATAGTAACAGATCTTCTTACA	159-211	Bireysel	D2
MAF65	F: AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG R: CCACTCCTCTGAGAATATAACATG	123-135	Bireysel	D4



Şekil 1. İncelenen 10 mikrosatellitin %2'lik agaroz jeldeki bant görüntüsü
Fig 1. PCR fragments belonging to 10 micorsatellites, separated on a 2% Agarose gel

babalık testi yapılmıştır. Çalışmada 10 mikrosatellit lokusundan 105 allel gözlemlenmiştir. 10 farklı mikrosatellit lokusuna ait allel sayısının 6 ile 14 arasında değiştiği en yüksek ve en düşük polimorfizm gösteren lokusların sırasıyla OarJMP58 ve OarCP34 olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan mikrosatellitlere ait gözlenen boyut aralığı (Allele size range), örnek sayısı (N), allel sayısı (n_A), gözlenen hetero-

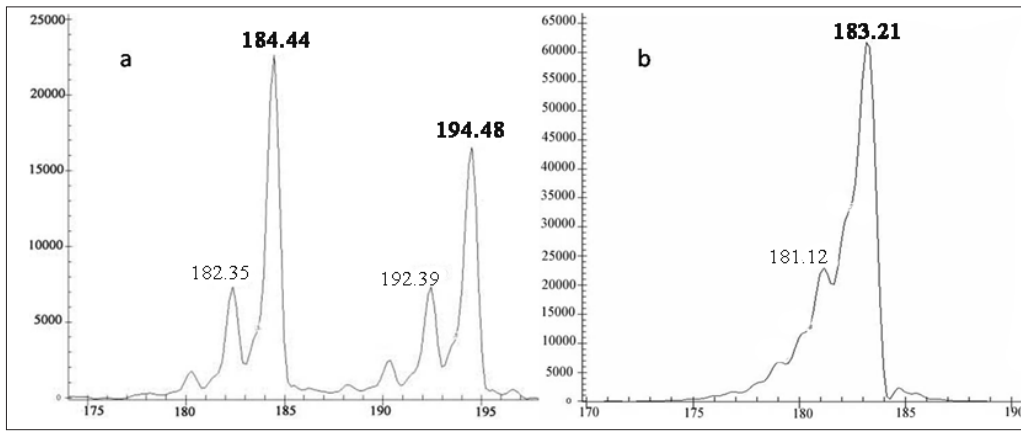
Tablo 2. Touchdown PZR koşulları**Table 2.** Thermal cycling conditions according to Touchdown PCR

Lokuslar	Denaturasyon (°C)	Süre (sn)	Bağlanma (°C)	Süre (sn)	Uzama (°C)	Süre (sn)
OarCP34	95	45	60-58	45	72	45
OarFCB193						
OarFCB304						
OarJMP29	95	45	61-57	45	72	45
OarFCB128						
BM8125						
OarJMP58	95	45	60-56	45	72	45
OarVH72						
MAF65	95	45	59-57	45	72	45
DYMS1	95	45	52-50	45	72	45

zigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e), polimorfik bilgi içeriği (PIC) ve ortalama heterozigotluk (\bar{H}) değerleri *Tablo 3*'te, elde edilen null allel frekansları ise *Tablo 4*'te verilmiştir. En yüksek gözlenen heterozigotluk değeri OarCP34 (0.841) lokusunda, en düşük değer ise OarFCB128 (0.541) lokusunda olmuştur.

Özellikle OarFCB304, OarFCB128, OarJMP58 ve OarVH72 lokuslarına ait null allel frekansları dikkat çekici bulunmuştur. Null allel frekansı 0.05'den yüksek olduğunda, null allel varlığına ve dolayısıyla heterozigotluk kaybına yönelik şüphe uyandırmaktadır.

Eğer popülasyon belli varsayımları yerine getiriyor ise



Şekil 2. DYMS1 Mikrosatellit lokusu bakımından heterozigot (a) ve homozigot (b) genotipe sahip birey

Fig 2. Individuals with heterozygote (a) and homozygote (b) in terms of DYMS1 locus

Tablo 3. Kullanılan mikrosatellitlere ait gözlenen boyut aralığı (GBA, bp), örnek sayısı (N), n_A , n_E , PIC, H_o , H_e ve \hat{H} değerleri
Table 3. Allele size range (bp), N, n_A , n_E , PIC, H_o , H_e and \hat{H} values in considered microsatellites

Lokuslar	GBA (bp)	N	n_A	n_E	H_o	H_e	\hat{H}	PIC
OarCP34	112/122	226	6	4.247	0.841	0.765	0.765	0.726
OarFCB193	96/140	230	13	3.323	0.774	0.699	0.699	0.653
OarFCB304	148/188	230	13	5.440	0.800	0.816	0.816	0.793
OarJMP29	110/158	226	13	4.876	0.770	0.795	0.795	0.768
OarFCB128	100/134	222	11	3.902	0.541	0.744	0.744	0.716
BM8125	108/130	226	8	3.355	0.726	0.702	0.702	0.669
OarJMP58	143/169	230	14	5.921	0.748	0.831	0.831	0.815
OarVH72	123/139	228	9	5.893	0.798	0.830	0.830	0.811
MAF65	121/139	226	7	3.436	0.823	0.709	0.709	0.659
DYMS1	181/203	228	11	5.128	0.763	0.805	0.805	0.781
Ortalama		227	10.5	4.55	0.758	0.773	0.770	
St.Dev.			2.838	1.032	0.083	0.053	0.053	

n_A : Allel sayısı, n_E : Etkili allel sayısı, PIC: Polimorfik bilgi içeriği, H_o : Gözlenen heterozigotluk oranı, H_e : Beklenen heterozigotluk oranı, \hat{H} : Ortalama heterozigotluk değeri

allel frekanslarından genotip frekanslarını hesaplamak için Hardy-Weinberg kanunu olarak bilinen basit matematiksel ilişkilendirme söz konusudur. 10 mikrosatellit lokusundan elde edilen bilgiler Hardy-Weinberg dengesine uygunluk bakımından χ^2 testi kullanılarak test edilmiştir. OarFCB304 ($P < 0.01$), OarFCB128 ($P < 0.001$), OarJMP58 ($P < 0.001$) ve OarVH72 ($P < 0.001$) lokuslarının bu eşitliğe uygunluk göstermediği, diğer lokusların ise Hardy-Weinberg eşitliğine uygun olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5).

Çalışmada 10 mikrosatellit lokusunun babalık indeksi (PI), ayırılma gücü (PD), karşılama olasılığı (MP) ve dışlama gücü (P_E) hesaplanmıştır (Table 6).

Tablo 6 incelendiğinde OarCP34 ve MAF65 isimli mikrosatellit lokuslarının babalık indeksi (PI) değerlerinin diğerlerine oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Allel sayılarına ilişkin bulgular ışığında yüksek sayıda allel veren lokusların ayırılma gücünün de (PD) diğerlerine göre

Tablo 4. İncelenen 10 mikrosatellit lokusuna ait null allel frekansları
Table 4. Null allele frequencies obtained from 10 STR loci

Lokuslar	Null Allel Frekansı
OarCP34	0.0129
OarFCB193	0.0000
OarFCB304	0.1693 (*)
OarJMP29	0.0000
OarFCB128	0.1733 (*)
BM8125	0.0000
OarJMP58	0.0540 (*)
OarVH72	0.0556 (*)
MAF65	0.0000
DYMS1	0.0386

*: yüksek null allel frekansını göstermektedir

Tablo 5. İncelenen 10 mikrosatellit lokusuna ait Ki-kare test değerleri**Table 5.** Chi-Square test values belong to 10 microsatellites

Lokuslar	DS	χ^2	Prob	Önem Düzeyi
OarCP34	15	12.326	0.654	NS
OarFCB193	78	37.164	1.000	NS
OarFCB304	78	115.917	0.003	P<0.01
OarJMP29	78	81.850	0.361	NS
OarFCB128	55	152.422	0.000	P<0.001
BM8125	28	15.923	0.967	NS
OarJMP58	91	238.865	0.000	P<0.001
OarVH72	36	88.909	0.000	P<0.001
MAF65	21	16.580	0.736	NS
DYMS1	55	44.779	0.836	NS

DS: Genotip sayısı,
 χ^2 = Elde edilen Ki-kare değeri

Tablo 6. Kullanılan mikrosatellitlere ait PI, PD, MP ve P_E değerleri**Table 6.** PI, PD, MP and P_E values in considered microsatellites

Lokuslar	PI	PD	MP	P _E
OarCP34	3.14	0.89	0.109	0.364
OarFCB193	2.21	0.85	0.149	0.295
OarFCB304	2.50	0.93	0.069	0.471
OarJMP29	2.17	0.93	0.072	0.433
OarFCB128	1.09	0.89	0.110	0.365
BM8125	1.82	0.88	0.120	0.307
OarJMP58	1.98	0.94	0.062	0.514
OarVH72	2.48	0.95	0.054	0.498
MAF65	2.83	0.85	0.155	0.293
DYMS1	2.11	0.94	0.064	0.453
				0.994

PI: Babalık indeksi, PD: Tanımlama gücü, MP: Karşılama Olasılığı, P_E: Dışlama Olasılığı

Tablo 7. Artan lokus kombinasyonlarına göre kombine edilmiş dışlama olasılıkları (CP_E)**Table 7.** Probabilities of exclusion for increasing combinations (CP_E)

Kombine Dışlama Olasılığı	Lokus Sayıları										
	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CP _E	117	0.3638	0.5517	0.7627	0.8655	0.9146	0.9408	0.9713	0.9856	0.9898	0.9944

nispeten yüksek olduğu söylenebilir. Bütün lokuslar göz önüne alındığında PD değerinin >0.80 olduğu görülmektedir. Aynı DNA profilini bulunduran birey sayısının saptanmasını sağlayan karşılama olasılığı değerleri (MP) 0.054-0.154 arasında bulunmuştur. Kullanılan lokusların bireysel dışlama olasılıkları değerlendirildiğinde en yüksek değeri OarJMP58 isimli lokusun gösterdiği (P_E=0.514) bunu OarVH72 isimli lokusun takip ettiği (P_E=0.498) görülmektedir. 10 mikrosatellit lokusunun aldığı dışlama olasılığı değerleri 0.295 ile 0.514 arasında değişmiştir.

Çalışmada bireysel dışlama olasılığının yanı sıra artan lokus kombinasyonlarına göre kombine dışlama olasılığı (CP_E) değerleri de hesaplanmıştır (Tablo 7). CP_E değerleri kullanılan lokusların farklı kombinasyonları ile elde edilmiştir.

Elde edilen bulgulardan anlaşıldığı gibi lokus sayısı arttıkça dışlama olasılığı daha yüksek bir değer almaktadır. Dışlama olasılığı değerinin artması gerçek biyolojik babanın daha yüksek bir isabetle tespit edildiğini göstermektedir. Kombine edilmiş dışlama olasılıkları değerlendirildiğinde CP_E değerlerinin 0.3638 ile 0.9944 değerleri arasında değiştiği görülmektedir. 10 mikrosatellit işaretleyicinin kombinasyonu sonucunda elde edilen CP_E değerinin 0.9944 olduğu görülmektedir.

Bu değerler incelendiğinde ≥ 0.90 değerine 5 lokus kombinasyonu ile ulaşıırken babalık testleri için güven sınırı olarak kabul edilen 0.99 değerine 10 mikrosatellit lokusunun kombinasyonu ile ulaşılmıştır. Bu durum çalışmada kullanılan 10 mikrosatellit lokusunun Karya koyunlarda babalık test-

lerinde yüksek düzeyde güvenilirlikle kullanılabilirliğini göstermektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP) kapsamında yer alan Karya Koyun sürüsünde yer alan üstün verimli bireylerin damızlık olarak seçilebilmesi için gerekli olan pedigr bilgilerinin doğruluğunun test edilmesi ve bu genotipte babalık testlerinde kullanılacak uygun işaretleyicilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada elde edilen gözlenen heterozigotluk değerleri bazı literatürlerde belirtilen aralıktadır³³⁻³⁸. Ancak çalışmada MAF65 ve OarCP34 lokuslarından elde edilen gözlenen heterozigotluk değerleri Yıldırım ve Çakır³⁹ tarafından Bafra, İvesi, Karayaka, Morkaraman, Sakız ve Türk merinosunda yapılan çalışmadan elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur.

Hardy-Weinberg dengesi için elde edilen değerler ilgili literatürde^{36,38,40} belirtilen değerlerden farklı bulunmasına rağmen OarFCB128 ve OarVH72 lokusları bakımından elde edilen değerler Pramod ve ark.³⁵ tarafından bildirilen değerlerle uyum içerisindedir. Adı geçen lokusların Hardy-Weinberg dengesinde bulunmaması çalışılan populasyon ve populasyonda yürütülen seleksiyon çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda normal bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna ek olarak OarFCB304, OarFCB128,

OarJMP58 ve OarVH72 lokusları bakımından Hardy-Weinberg dengesinde bulunmamasının nedeni olarak bu lokuslardaki null alel frekanslarının yüksek olması gösterilebilir. Çünkü null alleller, heterozigotlarda bir allelin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmeyip sadece tek bir allelin homozigot gibi pik vermesine ve böylece hatalı okunmasına bağlanmaktadır.

Çalışmada, OarFCB128 için elde edilen PI değeri (1.09) Cerit ve ark.⁴⁰ tarafından Kıvırcık koyunlarda yapılan çalışmada OarFCB128 lokusu için elde edilen değerden (2.333) düşük, çalışmada aynı lokus için elde edilen MP değerinin (0.110) Kıvırcık koyunlarda yapılan çalışmada elde edilen değerden (0.073) yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun gerçekleşmesinde, iki çalışmada farklı ırkların kullanılmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Arruga ve ark.¹⁰ tarafından Rasa Aragonesa koyunlarında yapılan babalık testi çalışmasında MAF50, MAF18, OarFCB20 ve MCM527 isimli mikrosatellit lokuslarının bireysel dışlama olasılıklarının (P_E) sırasıyla 0.35, 0.32, 0.68 ve 0.50 olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise DYMS1, OarFCB304, OarJMP58, OarJMP29, MAF65 ve BM8125 lokusları için P_E değerleri sırasıyla 0.82, 0.60, 0.88, 0.69, 0.63 ve 0.82 olarak bildirilmiştir⁴¹. Kullanılan lokusların bireysel dışlama olasılıkları değerlendirildiğinde en düşük dışlama olasılığı değerinin 0.293 ile MAF65 lokusuna, en yüksek dışlama olasılığı değerinin ise 0.514 ile OarJMP58 lokusuna ait olduğu görülmektedir.

Elde edilen bu değerler konuyla ilgili yapılan bazı çalışmalarda bildirilen değerlerle uyum göstermektedir⁴². Çalışılan MAF65 lokusu bakımından elde edilen P_E değeri (0.293) Ivankovic ve ark.⁴³ tarafından yapılan çalışmada elde edilen P_E değerinden (0.476) düşük bulunmuştur. Marshall ve ark.⁴⁴ tarafından yapılan bir çalışmada, OarFCB193 ve OarFCB304 isimli mikrosatellit lokuslarında elde edilen P_E değerleri sırasıyla 0.423 ve 0.415 olmuştur. Çalışmada elde edilen P_E değerleri incelendiğinde OarFCB193 lokusunun belirtilen çalışmadan daha düşük bir değer aldığı görülmektedir. Ancak OarFCB304 lokusundan elde edilen dışlama olasılığı değeri ise belirtilen çalışmadan yüksek olmuştur.

Çalışmada 10 mikrosatellit lokusunun kombine edilmesi ile elde edilen CP_E değeri küçükbaşlarda yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde edilen değerlerin bazı literatürde belirtilenlerden düşük çıktığı görülmektedir⁴⁵⁻⁵⁰. Bu durum yapılan çalışmalardaki lokus sayıları ile doğrudan ilgilidir. Belirtilen literatürler incelendiğinde bu çalışmalarda 10 mikrosatellit lokusundan daha fazla lokusla çalışıldığı görülmektedir. Bu nedenle babalık testi çalışmalarında fazla sayıda lokus kullanılması, daha isabetli dışlama olasılığı değerlerinin elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca anne, baba ve yavrudan oluşan üçlü gruplar kullanılması bu tip çalışmaların güvenilirliğini artırmaktadır.

Sunulan çalışmadan elde edilen bulgular incelendiğinde, kullanılan 10 mikrosatellit lokusu yüksek PD değerleri (≥ 0.85)

almışlardır. Ancak FAO tarafından önerilen mikrosatellit listesinden seçilen dışlama olasılıkları düşük olan MAF65, OarFCB193 ve BM8125 lokusları yerine Uluslararası Hayvan Genetiği Derneği (ISAG) tarafından önerilen ve dışlama olasılık değerleri yüksek olan lokusların kullanılmasının yapılacak babalık testleri için daha uygun olacağı düşünülmektedir. Buna ek olarak null alel frekansları incelendiğinde (Tablo 4) OarJMP58 ve OarVH72 lokuslarının tolere edilebilir frekansa sahip olduğu OarFCB304 ve OarFCB128 lokuslarının ise sahip oldukları null alel frekansı değeriyle dikkat çekicidir. Bu nedenle özellikle bu iki lokus (OarFCB304 ve OarFCB128), yanlış yorumlamaya yol açacağından ebeveyn testlerinde kullanılmamalıdır.

Çalışılan lokuslar dikkate alındığında özellikle dışlama olasılığı bakımından OarFCB304, OarVH72 ve OarJMP58 isimli mikrosatellit lokuslarının öne çıktığı görülmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar Aydın ve yöresinde yetiştirilen yerli genotipleri için yapılacak moleküler genetik çalışmalara ciddi bir katkı sağlayacağı gibi bu genotipler için pedigrü oluşturma ve tutulan pedigrü kayıtlarının doğruluğunu kontrol etmek için de kullanılabilecektir. İleriki yıllarda bu çalışmayı destekleyici çalışmaların hayata geçirilmesi ile moleküler genetik analiz ve tanımlamalar ile biyoteknolojik bazı uygulamaların doğrudan ıslah programı ile birleştirilmesi mümkün olacaktır.

Bazı gelişmiş ülkelerde özellikle bazı türlerde babalık testleri için mikrosatellit işaretleyiciler tanımlanmasına rağmen bazı türler için mikrosatellitler ile babalık testi oldukça yeni bir sistemdir. Türkiye yerli koyun ırklarında yapılmış sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılabilmektedir. Bu nedenle bu çalışma ileride konuyla ilgili yapılacak çalışmalar için özel bir önem ifade etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Beuzen ND, Stear MJ, Chang KC: Review molecular markers and their use in animal breeding. *Vet J*, 16, 42-52, 2000.
2. Montaldo HH, Meza-Herrera CA: Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Elect J Biotech*, 1, 83-89, 1998.
3. Cunningham EP, Meghan CM: Biological identification systems: genetic markers. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 20, 491-499, 2001.
4. Kaul R, Singh A, Vijn RK, Tantia MS, Behl R: Evaluation of the genetic variability of 13 microsatellite markers in native Indian pigs. *J Genet*, 80, 149-153, 2001.
5. Simm G: Molecular genetic technologies. In, Simm G (Ed): Genetic Improvement of Cattle and Sheep. pp. 372-381, Farming Press United Kingdom, 1998.
6. Bowling AT, Eggleston-Stott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E: Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet*, 28, 247-252, 1997.
7. Buchanan FC, Littlejohn RP, Galloway SM, Crawford AM: Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome. *Mamm Genome*, 4, 258-264, 1993.
8. Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J, Rink A, Longeri ML, Ma RZ, Da Y, Lewin HA, Barendse W, Teale AJ: A Panel of Polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Anim Genet*, 26, 299-306, 1995.
9. Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L:

Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet*, 25, 19-23, 1994.

- 10. Arruga MV, Monteagudo LV, Tejedor MT, Barro R, Ponz R:** Analysis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep. *Res Vet Sci*, 70, 271-273, 2001.
- 11. Baron EE, Martinez ML, Vernequez RS, Coutinho LL:** Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. *Genet Mol Biol*, 25, 389-394, 2002.
- 12. Geldermann H, Pieper U, Weber WE:** Effect of Misidentification on the Estimation of Breeding Value and Heritability in Cattle. *J Anim Sci*, 63, 1759-1768, 1986.
- 13. Koşum N:** Koyunculukta uygulanan babalık testleri ve önemi. *Hayv Üret*, 36, 25-32, 1995.
- 14. Rosa AJM, Schafhouser E, Hassen A, Rouse GH, Wilson DE, Reecy JM:** Use of molecular markers to determine parentage in multiple sire Pastures. Beef Res. Rep. Iowa State University USA, 2003.
- 15. Weller JI, Feldmesser E, Golik M, Tager-Cohen I, Domočovský R, Alus O, Ezra E, Ron M:** Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. *J Dairy Sci*, 87, 2627-2640, 2004.
- 16. Karaca O, Cemal İ, Atay O:** Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP). *Ege Bölgesi 1. Tarım Kongresi. 7-11 Eylül* Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 1998.
- 17. Karaca O, Cemal İ:** Koyun genotiplerimizin ıslahı için örnek bir yapılanma: Adnan Menderes Üniversitesi Grup Koyun Yetiştirme Programı (ADÜ-GKYP). *Hasad Hayv*, 21, 30-35, 2005.
- 18. Karaca O, Cemal İ, Yılmaz O, Yılmaz M:** Karya Koyunu. *Türkiye Ulusal Koyunculuk Kongresi, 12-13 Şubat 2009*, Ege Üniversitesi, İzmir, s. 225-234, 2009.
- 19. FAO:** Food and agriculture organisation of the United Nations secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): Recommended microsatellite markers, <http://dad.fao.org> Accessed: 09.09.2004.
- 20. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW:** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32, 314-331, 1980.
- 21. Nei M:** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590, 1978.
- 22. Nei M:** Molecular evolutionary genetics. In, Nei M (Ed): Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, 1987.
- 23. Nei M, Kumar S:** Molecular evolution and phylogenetics. In, Nei M, Kumar S (Eds): Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, London, 2000.
- 24. Brenner C, Morris J:** Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. *Proceedings for the first International Symposium on Human Identification*. Promega Corporation, Madison, Nov. 1989 pp. 21-53, 1990.
- 25. Jamieson A, Taylor SS:** Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim Genet*, 28, 397-400, 1997.
- 26. Kimberly AH:** Statistical Analysis of STR Data. www.promega.com, 2001. Accessed: 23.09.2009.
- 27. Peakall R, Smouse PE:** GenAIEx, Genetic Analysis in Excel, Version 6. School of Botany and Zoology, Australian National University, http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/genalex_download.php, Accessed: 13.10.2006.
- 28. Marshall TC:** Cervus, 3.0, Cervus is a computer program for assignment of parents to their offspring using genetic markers. Cervus, a Windows package for parentage analysis using likelihood approach. CERVUS was written by Tristan Marshall (1998/2006) <http://www.fieldgenetics.com>, Accessed: 02.07.2008.
- 29. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC:** Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, 16, 1099-1106, 2007.
- 30. Brenner C, Morris CJ:** PowerStatsV12.xls Computer Software. Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. <http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats>, Accessed: 05.05.2007.
- 31. Raymond M, Rousset F:** GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 86, 248-249, 1995.
- 32. Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX:** POPGENE the user-friendly shareware for population genetic analysis (1997). University of Alberta, Canada <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>, Accessed: 05.05.2007.
- 33. Grigaliunaite I, Tapio M, Viinalas H, Grislis Z, Kantanen J, Miceikiene I:** Microsatellite variation in the Baltic sheep breeds. *Vet Med Zoot*, 21, 66-73, 2003.
- 34. Handley LJJ, Byrne K, Santucci F, Townsend S, Taylor M, Bruford MW, Hewitt GM:** Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity*, 99, 620-631, 2007.
- 35. Pramod S, Kumarasamy P, Chandra ARM, Sridevi P, Rahumathulla PS:** Molecular characterization of vembur sheep (*Ovis aries*) of South India based on microsatellites. *Indian J Sci Technol*, 2, 55-58, 2009.
- 36. Soysal Mİ, Koban E, Özkan E, Altunok V, Bulut Z, Nizamlioglu M, Togan İ:** Evolutionary relationship among three native and two crossbred sheep breeds of Turkey: Preliminary results. *Revue Med Vet*, 156 (5): 289-293, 2005.
- 37. Tapio I, Tapio M, Grislis Z, Holm LE, Jeppsson S, Kantanen J, Miceikiene I, Olsaker I, Viinalas H, Eythorsdottir E:** Unfolding of population structure in Baltic sheep breeds using microsatellite analysis. *Heredity*, 94, 448-456, 2005.
- 38. Tascon DC, LittleJohn RP, Almeida PAR, Crawford AM:** Genetic variation within Merino Sheep breed: Analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim Genet*, 31, 243-251, 2000.
- 39. Yıldırım FAB, Çakır Ş:** Analysis of genetic polymorphism with microsatellite method in Turkey local sheep breeds. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (1): 75-79, 2012.
- 40. Cerit H, Altinel A, Avanus K, Elmaz O, Karayel E, Temelli R, Kirişçi E:** Polymorphism evaluation of various genomic loci in Kıvrıkcık Sheep breed of Turkey. *The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology, 9-13 Kasım* Bangkok, Thailand, pp. 151-152, 2003.
- 41. Quanbari S, Eskandari Nasab MP, Osfoori R, Hagh Nazari A:** Power of microsatellite markers for analysis of genetic variation and parentage verification in sheep. *Pak J Biol Sci*, 10, 1632-1638, 2007.
- 42. Roberts CS, Thomas G:** Use of microsatellite markers to include or exclude individuals as Barbados Blackbelly sheep, <http://advertpush.com/agri/images/stories/information>, Accessed: 18.08.2009.
- 43. Ivankovic A, Dovc P, Kavar T, Caput P, Mioc B, Pavic V, Stuhec V, Leto J:** Genetic characterisation of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data. *Small Ruminant Res*, 57, 167-174, 2005.
- 44. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM:** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7, 639-655, 1998.
- 45. Araujo AMD, Guimaraes SEF, Pereira CS, Lopes PS, Rodrigues MT, Machado TMM:** Paternity in Brazilian goats through the use of DNA microsatellites. *R Bras Zootec*, 39, 1011-1014, 2010.
- 46. Bolormaa S, Ruvinsky A, Walkden-Brown S, Van der Werf J:** DNA-based parentage verification in two Australian goat herds. *Small Ruminant Res*, 80, 95-100, 2008.
- 47. Ganai NA, Yadav BR:** Parentage determination in three breeds of Indian goat using heterologous microsatellite markers. In, Makkar HPS and Viljoen GJ (Eds): Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Springer, Netherlands, pp. 613-620, 2005.
- 48. Jimenez-Gamero I, Dorado G, Munoz-Serrano A, Analla M, Alonso-Moraga A:** DNA microsatellites to ascertain pedigree-recorded information in a selecting nucleus of Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Res*, 65, 266-273, 2006.
- 49. Luikart G, Biju-Duval MP, Ertuğrul O, Zagdsuren Y, Maudet C, Taberlet P:** Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Anim Genet*, 30, 431-438, 1999.
- 50. Zhao ZS, Wang GL, Guo JG, Li DQ:** Polymorphism distributions of 9 microsatellite loci in Chinese Merino sheep. *Yi Chuan*, 28, 939-944, 2006.