

Kangal Akkaraman Koçlarında Genetik Çeşitlilik ve Ebeveyn Testinin Uygulanabilirliğinin Mikrosatellit Belirteçler Kullanılarak Araştırılması ^[1] ^[2]

Ercan KURAR * & ** 
Mustafa GARİP ****

Zafer BULUT ***
Alper YILMAZ ****

Tamer ÇAĞLAYAN **** & *****
Mehmet NİZAMLIOĞLU ***

[1] Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (2002/059 ve 05401104)

[2] III. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi'nde (2007) sunulmuştur

* Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, TR-42031 Konya - TÜRKİYE

** Selçuk Üniversitesi, İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK), TR-42075 Konya - TÜRKİYE

*** Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, TR-42031 Konya - TÜRKİYE

**** Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, TR-42031 Konya - TÜRKİYE

***** Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootehni Anabilim Dalı, 720044 Bişkek - KIRGIZİSTAN

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6879

Özet

Bu çalışmanın amacı, Kangal Akkaraman Koyunu ıslah projesi kapsamında, popülasyon seviyesinde genetik çeşitliliğin tespiti ve DNA seviyesinde ebeveyn tayininin olasılığının araştırılmasıdır. Pilot bir çalışma olarak, kapalı ve kan yakınlığı değerlerinin yüksek olduğu tahmin edilen iki Kangal Akkaraman Koyunu sürüsünde damızlık olarak kullanılan toplam 13 koçtan kan örnekleri alınmıştır. Toplam 20 mikrosatellit lokusu kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile spesifik genom bölgeleri çoğaltılmıştır. PZR ürünleri kapiller elektroforez ile ayrıştırılarak allel ve genotipleri belirlenmiştir. Toplam 99 farklı allelin gözleendiği bu çalışmada, allel sayıları farklı lokuslar için 1 ile 8 arasında değişmektedir. Gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He) ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerlerinin sırasıyla 0.000 - 0.923, 0.000 - 0.871 ve 0.000 - 0.818 arasında değiştiği gözlenmiştir. Kullanılan 20 lokus ile toplam Dışlama Gücü (DG) değeri 0.999975 olarak bulunmuştur. Enformatif 12 lokusun kullanılması ile oluşturulacak DNA test panelinin toplam DG değerinin 0.999828 olacağı ve bu panelin Kangal Akkaraman koyun sürülerinin ebeveyn tayini çalışmalarında başarıyla kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Genetik çeşitlilik, Ebeveyn tayini, Kangal Akkaraman koyunu, Mikrosatellit

Investigation of Genetic Diversity and Paternity in Kangal White Karaman Rams Using Microsatellite Markers

Summary

The objectives of this study were to estimate genetic diversity and test possibility of conducting paternity testing at the DNA level as part of a breeding project of Kangal White Karaman sheep. As a pilot study, blood samples were collected from 13 rams that were used for breeding purposes in two different flocks in which level of inbreeding is proposed to be high. A total of 20 microsatellite markers were used to amplify genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). The resulting PCR products were separated by capillary electrophoresis and allele genotypes were determined. A total of 99 different alleles were determined ranging from 1 to 8 at each locus. The observed (Ho) and expected heterozygosities (He) values were ranged from 0.000 to 0.923 and from 0.000 to 0.871, respectively. Polymorphism information content (PIC) values were between 0.000 and 0.818. Total power of exclusion (PE) value was calculated as 0.999975 for twenty loci. Our results suggested that a panel, including the most informative twelve loci provides a total PE value of 0.999828, can be useful for parentage testing in Kangal White Karaman sheep.

Keywords: Genetic diversity, Paternity testing, Kangal White Karaman sheep, Microsatellite



İletişim (Correspondence)



+90 332 2233573



ekurar@selcuk.edu.tr

GİRİŞ

Türkiye'de yerli koyunların yapağı, et ve süt verimini artırmak amacıyla kültür ırkları ile farklı melezleme çalışmaları yapılmıştır. Ancak, geliştirilen yeni koyun tipleri yeterince yaygınlaştırılmadığı gibi bazıları da tamamen yok olmuştur. Diğer taraftan, bölgenin şartlarına uyum sağlamış, dayanıklı ve kanaatkar olan bazı yerli koyun genetik kaynakları yeterince ilgi gösterilmediği için yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmışlardır. Bu problemin çözümü amacıyla çeşitli adımlar atılmış olup, 2005 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ilk olarak 11 farklı koyun ırkında halk elinde koyun ıslah projeleri Türkiye'nin değişik bölgelerinde uygulamaya konulmuştur.

Kangal Akkaraman koyunu, Orta Anadolu'nun yaygın (otokton) ırkı olan Akkaraman ırkının en iri tipi olup yoğun olarak Sivas ve Malatya illerinde yetiştirilmektedir. Halk elinde ıslah projesi kapsamında, bu genotipin verim düzeylerinin yetiştirici koşullarında tespiti ve artırılması amaçlanmaktadır. Proje kapsamında; Kangal Akkaraman koyunlarının canlı ağırlık ve vücut ölçüleri¹, yapağı² ve süt verim özellikleri³ ile kuzuların canlı ağırlık artışları⁴ incelenmiştir.

Sığır, koyun ve keçi sürülerinde uygulanan sıfat yöntemleri ve özellikle suni tohumlamanın kullanılması nedeniyle ancak sınırlı sayıda erkek hayvan damızlık olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla, damızlık olarak kullanılan erkek hayvanların seçiminin genetik ilerlemede kritik önemi bulunmaktadır. Bu amaçla kullanılan projeni ve pedigrî analizlerinin temelini, damızlık hayvanların akrabalarına ait verim performanslarının kullanılması oluşturmaktadır. Dolayısıyla, bir sürüde bulunan hayvanlar arasındaki genetik ilişkinin bilmesi ve doğru kimliklendirmenin yapılmasının önemi büyüktür. Yanlış genetik ilişkinin tespit edilmesi kalıtım derecesi, damızlık değeri gibi parametrelerin yanlış hesaplanmasına neden olmaktadır. Örneğin, Geldermann ve ark.⁵ hatalı ebeveyn tayininin kalıtım derecelerinin hesaplanmasındaki etkilerini araştırmış ve %15 oranında hatanın bir karakterin kalıtım derecesinin ($h=0.5$) %8.7, başka bir karakterin ($h=0.2$) kalıtım derecesinin ise %16.9 oranında normalden düşük hesaplanmasına neden olduğu bildirilmiştir.

Numaralandırma, kimlik ve verimle ilgili kayıtların büyük bir özenle tutulduğu ülkelerde dahi hatalı kimlik ve ebeveyn tespit (misidentification) oranı oldukça yüksektir. Örneğin, Almanya (%4-23), Danimarka (%5-15), Sovyetler Birliği (%8-30), İrlanda (%8-10), İngiltere (%1.3) ve İsrail'de (%2.9-5.2) bu değerlerin küçümsenmeyecek oranlarda olduğu tahmin edilmektedir⁵⁻⁸.

Koyunların kimliklendirme çalışmalarında kan grupları ve protein polimorfizmi kullanılmıştır⁹. Ancak, daha etkin ve ekonomik olmaları nedeniyle populasyon genetiği çalışmalarında mikrosatellit DNA belirteçleri¹⁰ yaygın olarak tercih edilmektedir. Mikrosatellitler kullanılarak farklı koyun ırkları ve populasyonlarında ebeveyn tayini ve genetik çeşitli-

ğin araştırılması çalışmaları için paneller oluşturulmuştur¹¹⁻¹⁵.

Bu pilot çalışmanın amacı, kapalı ve kan yakınlığının nispeten yüksek olduğu düşünülen iki Kangal Akkaraman koyunu sürüsünde genetik çeşitliliğin seviyesi ile ebeveyn tayini çalışmalarında kullanılabilecek bir mikrosatellit test panelinin etkinliğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Islah projesi kapsamında halk elinde yetiştirilen iki farklı Kangal Akkaraman sürüsüne ait 13 koçtan kan örneği alınmıştır. DNA izolasyonu standart fenol/kloroform yöntemi¹⁶ kullanılarak yapılmıştır. DNA kalitesi 260/280 nm UV'de kontrol edilmiştir.

Mikrosatellit belirteçleri ISAG ve FAO MoDAD tarafından tavsiye edilen listeden¹⁷ seçilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), kapiller elektroforez ve fragman analizi daha önce açıklanmıştır¹⁸. Kısaca, PZR protokolü toplam 15 µl hacimde; 1x Mg⁺⁺ free PCR buffer (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 200 mM dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 1.5 mM MgCl⁺⁺, 0.375 ünite Taq polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 2-15 pM her bir primer çifti (Tablo 1) ve 50 ng DNA template olacak şekilde hazırlanmıştır. İki aşamalı Touchdown PZR¹⁹ profi-

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokusları

Table 1. Microsatellite loci used in the study

No	Lokus	Primer dizisi (5'→3')	
		İleri	Geri
1	BM1824	gagcaagggtgtttccaatc	cattctccaactgcttcttg
2	BM2113	gctgccttaccacaataccc	cttagacaacaggggttg
3	INRA023	gagtagagctacaagataaactc	taactacaggggttagatgaactca
4	ETH10	gttcaggactgcccctgtaaca	cctcagccacttcttcttctc
5	ETH225	gatcacctgccaactttctc	acatgacagccagctgctact
6	SPS115	aaagtgcacaacagcttctccag	aacagagtgcctagtgttgctgtg
7	TGLA53	gcttcagaaatagttgcatca	atctcacatgatattacagcaga
8	TGLA227	cgaattcaaatctgtaatttgct	acagacagaaactcaatgaaagca
9	ETH3	gaacctgcctctctgctattg	actctgctgtggccaagtagg
10	TGLA126	ctaatttagaatgagagagcttct	ttggtctctattctggaatattcc
11	TGLA122	ccctcctcaggtaaatcagc	aatcacatggcaataagtacatac
12	SPS113	cctccacacaggtctctgactt	cctaactggtgagttattgccc
13	DRB1	atgggtcagcagcaaggtgagca	gggactcagctctctatctctttg
14	CRSD247	ggacttgccagaacttgcaat	cactgtggttgattagtcagg
15	MAF70	cacggagtcacaagagtcagacc	gcaggactctacggggcctttgc
16	ILSTS87	agcagacatgatgactcagc	ctgctcttttcttgagag
17	p19	aacaccatcaaacagtaagag	catagtaacagatcttcttaca
18	MCM527	gtccattgcctcaaatcaattc	aaaccactgactactcccaaa
19	BM6444	ctctgggtacaacactgagtc	tagagagtttccctgctcatcc
20	TCRVB6	gagtcctcagcaagcagtc	ccaggaattgagatcacct

linde, 95°C'de 4 dak. denatürasyon sonrası I. aşamada 16 döngü için 94°C'de 30 saniye, 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0.5°C düşürülen ve 30 sn süren annealing ve 72°C'de 30 sn elongation sağlanmıştır. II. aşamada 25 döngü 94°C'de 30 sn, 52°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn uygulanmıştır. Adenilizasyon için 72°C'de 10 dak. tutulmuştur. PZR ürünü (0.5 µl), Hi-Di-formamide (25 µl) ve S-400 DNA size standart ile Beckman Coulter CEQ-8000 Genetik Analiz Sistemine yüklenerek FRAG-3 yöntemi ile kapiller elektroforez işlemi uygulanmış, FragTest programı ile allel genotipleri belirlenmiştir.

İstatistiki analizlerde toplam allel sayısı, gözlenen heterozigotluk (Ho), beklenen heterozigotluk (He), Hardy-Weinberg Dengesine (HWE) uygunluk, polimorfizm bilgi içeriği (PIC) ²⁰ ve dışlama gücü (DG) ²¹ parametreleri her bir lokus için CERVUS v2.0 paket programı ²² kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Genel populasyon parametreleri *Tablo 2*'de özetlenmiştir. Yirmi mikrosatellit lokusu kullanılarak yapılan bu pilot çalışmada ortalama allel sayısı 4.95 olup toplam 99 farklı allel tespit edilmiştir. En fazla allel sayısı (8) TGLA53, MCM527, BM6444 ve TCRVB6 lokuslarında gözlenmiştir. ETH10 ve TGLA227 lokuslarının monomorfik oldukları tespit edilmiştir.

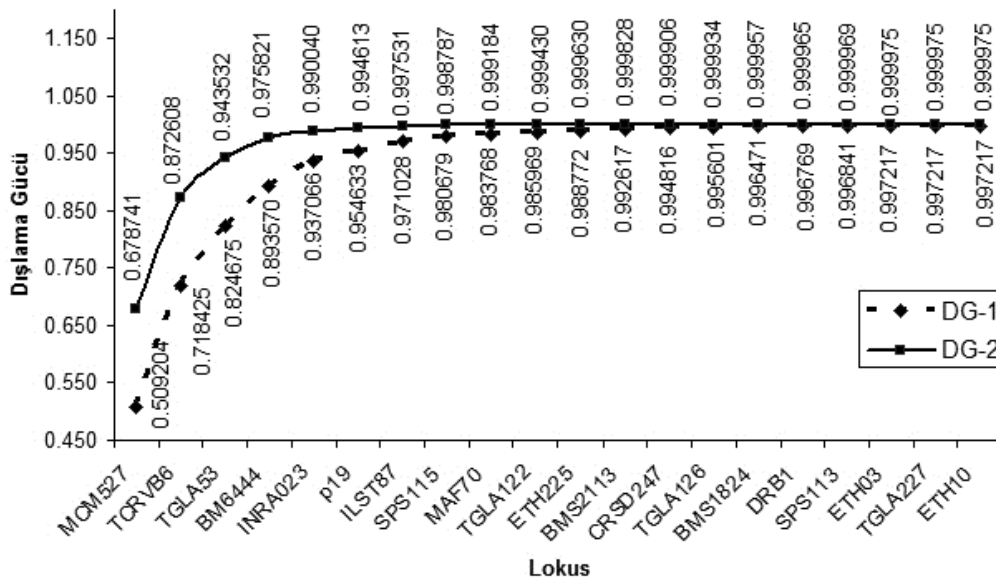
ETH10 ve TGLA227 lokuslarında tek allel gözlemlendiği için Ho, He ve PIC değerleri hesaplanamamıştır. En yüksek Ho (0.923), He (0.879) ve PIC (0.818) değerleri sırasıyla TGLA53, ILST87 ve MCM527 lokuslarında gözlenmiştir. Hardy-Weinberg Dengesi'nden (HWE) olası sapmaların test edilmesi için χ^2 istatistiğinden yararlanılmıştır. İncelenen lokusların genel olarak HWE'de oldukları ancak özellikle ETH225 ve BM6444

Tablo 2. Genel populasyon parametreleri

Table 2. General population parameters

Lokus	Na	Ho	He	PIC	DG-1	DG-2	HWE
ETH10	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
TGLA227	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
ETH03	2	0.231	0.508	0.369	0.119	0.185	ns
SPS113	3	0.231	0.218	0.198	0.022	0.106	ns
DRB1	3	0.077	0.428	0.353	0.085	0.192	**
BMS1824	4	0.692	0.637	0.552	0.198	0.352	ns
TGLA126	4	0.333	0.562	0.481	0.151	0.295	*
CRSD247	4	0.667	0.867	0.671	0.298	0.470	ns
BMS2113	5	0.833	0.779	0.707	0.342	0.521	ns
ETH225	5	0.231	0.631	0.545	0.200	0.351	***
TGLA122	5	0.385	0.514	0.468	0.136	0.301	ns
MAF70	5	0.231	0.557	0.503	0.160	0.328	**
SPS115	6	0.308	0.769	0.697	0.333	0.509	*
ILSTS87	6	0.692	0.879	0.720	0.361	0.542	ns
p19	6	0.833	0.710	0.643	0.279	0.459	ns
INRA023	7	0.692	0.815	0.755	0.409	0.588	ns
TGLA53	8	0.923	0.788	0.726	0.377	0.557	ns
MCM527	8	0.615	0.871	0.818	0.509	0.679	*
BM6444	8	0.545	0.805	0.738	0.393	0.572	***
TCRVB6	8	0.692	0.825	0.765	0.426	0.603	ns
Ortalama	4.95	0.461	0.608	0.535	0.240	0.381	-
Toplam	99	-	-	-	0.997217	0.999975	-

ns= $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$



Şekil 1. Lokusların enformatif değerlerine göre MCM527 belirteçinden başlayarak sisteme sırasıyla bir lokus eklenmesi ile hesaplanan dışlama gücü değerleri

Fig 1. Calculated powers of exclusion obtained by stepwise inclusion of informative loci in the system beginning from MCM527 marker

lokuslarının önemli oranda ($P < 0.001$) HWE'den saptıkları gözlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, sığır²³ ve keçi²⁴ çalışmalarına ait mikrosatellit belirteçleri Kangal Akkaraman koyununda kullanılmıştır. Tüm belirteçler ISAG ve FAO MoDAD tarafından tavsiye edilen listede¹⁷ bulunmaktadır. TGLA227, ILST87 ve p19 hariç, bu çalışmada kullanılan tüm lokuslar diğer çalışmalarda^{11-13,17,25} kullanılmış veya ArkDB koyun veri tabanında (<http://www.thearkdb.org/>) varlığı hakkında bilgi bulunmaktadır. Karşılaştırmalı genom çalışmaları, filogenetik olarak birbirine yakın olan türlerin DNA belirteçlerinin ortak olarak kullanılabilmesini ortaya koymuştur. Sığır mikrosatellitlerinin %70'nin koyunda PZR ile yükseltgenebildiği ve ~%60'nın enformatif olduğu bilinmektedir^{26,27}. Bu çalışmada kullanılan tüm sığır ve keçi mikrosatellit lokusları (%100) koyun DNA'sı kullanılarak başarıyla yükseltgenmiş ve beklenen allel pikleri gözlenmiştir. Kangal Akkaraman Koyunu sürülerinde iki lokus'un (%10) monomorfik olduğu gözlenmiştir (Tablo 2). ETH10 lokusu bu çalışmada monomorfik olmasına rağmen diğer koyun kimliklendirme çalışmalarında^{15,28} kullanılmıştır. TGLA227 lokusu hakkında ArkDB Koyun Veri tabanında bilgi bulunmamaktadır. Gözlenen yüksek polimorfizm değerleri (Na, Ho ve He), ILST87 ve p19 lokuslarının koyun genomunda polimorfik olduğunu ve genetik çalışmalarda kullanılabilmesini göstermektedir. Monomorfik lokusların varlığı ve bazı lokuslarda gözlenen nispeten düşük polimorfizm değerleri sınırlı sayıda örneğin kullanılmasından, örnekleme yapılan sürülerin özelliğinden veya null allellerin varlığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Ebeveyn testlerinde, bir populasyonda bulunan rastgele bir bireyin potansiyel ebeveyn olasılığının dışlanması ve testlerin güvenilirliğinin tespitinde istatistiksel olarak dışlama gücü (DG) kullanılmaktadır²⁰. Koyunun ekonomik değeri ile kıyaslandığı zaman, ebeveyn tayini analizlerinin maliyeti yüksektir. Genotipleme analizlerinin maliyet ve iş gücünün azaltılmasında farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. İlki, mümkün olan en az sayıda belirteç/multipleks ile en yüksek DG değerlerinin elde edilmesidir. Diğeri ise, sürüde yalnızca koç ve kuzuların genotiplendirilmesi ancak anaların kullanılmasıdır (DG-1). Bu durum ancak yeterli sayıda ve enformatif değeri yüksek belirteç ile oluşturulan bir panel kullanımı ile mümkündür. Genetik olarak kapalı sürülerde, populasyona özgü panellerin geliştirilmesi, genotiplemenin daha ekonomik ve pratik yapılmasına olanak sağlayacaktır. Sunulan bu pilot çalışma, Kangal Akkaraman koyunu sürülerinde 12 lokusun kullanılması ile etkin dışlama gücünün (DG-1 ve DG-2) sağlanabileceğini göstermektedir. Multipleks optimizasyon ile ekonomik panel sistemlerinin oluşturulması mümkündür¹⁸.

Bu çalışmada sınırlı sayıda örnek kullanılmış olup, bu değer kabul edilebilir populasyon genomiği çalışmalarının

($n > 30$) altında kalmaktadır. Serbest sıfat yönteminin yaygın olarak kullanılması ve koçların sürü üzerine etkilerinin daha fazla olacağı düşüncesiyle yalnızca koçlardan örnekleme yapılmıştır. Ancak, kapalı bir sürüde, genel populasyon parametrelerinin özellikle 12 belirteci içeren sistemde orta-yüksek olduğu gözlenmiştir. Botstein ve ark.²¹ $PIC > 0.500$ değerinin yeterli oranda enformatif olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada kullanılan belirteçlerin genel olarak bu kritere uyduğu ve sınırlı da olsa populasyonu temsil edebileceği gözlenmiştir. Bu durum, benzer çalışmalarda da gözlenmiştir^{14,29}. Örneğin, Pakistan'ın Afshari koyunlarında 18 mikrosatellit kullanılarak yapılan bir çalışmada, Qanbari ve ark.²⁹ 100 koyun kullanılmış, MCMA26 lokusu monomorfik olarak tespit edilmiştir. Toplam 102 farklı allel tespit edilmiş olup, Na ile ortalama Ho, He, PIC ve DG-2 değerleri sırasıyla 6, 0.740, 0.720, 0.670 ve 0.680 bulunmuştur. Toplam DG-2 değeri ise 0,0998 olarak hesaplanmıştır. Glowatzki-Mullis ve ark.¹⁵ 17 mikrosatellit içeren bir panel ile Cameroon Koyununda toplam DG değerini 0.986 olarak bildirmişlerdir. İran'ın Ghazel koyunlarında ise 7 mikrosatellit lokusu ile DG değeri 0.870, Na, Ho ve PIC değerleri sırasıyla 3.71, 0.430 ve 0.500 olarak tespit edilmiştir¹⁴.

Bu pilot çalışmanın sonuçları, incelenen Kangal Akkaraman koyunu sürülerinde 12 mikrosatellit lokusu kullanılarak yalnızca koç ve kuzuların genotiplendirilmesi ile başarılı ebeveyn tayini çalışmalarının yapılabileceğini göstermektedir. Populasyona özel multipleks panel sistemlerinin geliştirilmesi ile etkin ve ekonomik ebeveyn analizlerinin yapılabileceği kanaatine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Yazarlar örnekleme çalışmalarına katkılarından dolayı Prof.Dr. Behiç COŞKUN'a teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. Yılmaz A, Tepeli C, Tekin ME, Akmaz A, Garip M, Polat ES, Coşkun B, Çağlayan T: Determination of live weights and body measurements of Kangal Type Akkaraman sheep in producers conditions. *J Food Agr Environ*, 9, 366-370, 2011.
2. Garip M, Coşkun B, Polat ES, Yılmaz A, Tekin ME, Çağlayan T, Kılıç N: Kangal Akkaraman koyunlarında yapıları özellikleri. *Eurasian J Vet Sci*, 26, 93-99, 2010.
3. Yılmaz A, Coşkun B, Garip M, Polat ES, Kılıç N: Kangal Akkaraman koyunlarında süt verim potansiyelinin incelenmesi. *Uzunyayla Dergisi*, 2, 12-17, 2010.
4. Garip M, Coşkun B, Polat ES, Yılmaz A, Kılıç N, Tekin ME: Halk elinde yetiştirilen Kangal Akkaraman kuzularının büyüme özellikleri. *Uzunyayla Dergisi*, 2, 20-23, 2010.
5. 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.
6. Beechiner JG, Kelly EP: Errors of identification amongst cattle presented as progeny of some bulls used in the artificial insemination service in Ireland. *Ir Vet J*, 41, 348-353, 1987.
7. Ron M, Blanc Y, Band M, Ezra E, Weller JI: Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *J Dairy Sci*, 79, 676-681, 1996.

- 8. Israel C, Weller JI:** Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *J Dairy Sci*, 83, 181-187, 2000.
- 9. Wang S, Foote WC:** Protein polymorphism in sheep pedigree testing. *Theriogenology*, 34, 1079-1085, 1990.
- 10. Weber JL, May PE:** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 44, 388-396, 1989.
- 11. Arranz JJ, Bayón Y, Primitivo FS:** Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Rumin Res*, 39, 3-10, 2001.
- 12. Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo S:** Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim Genet*, 29, 435-440, 1998.
- 13. Diez-Tascón C, Littlejohn RP, Almeida PA, Crawford AM:** Genetic variation within the Merino sheep breed: Analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim Genet*, 31, 243-251, 2000.
- 14. Saberivand A, Javanmard A, Safdari M:** Parentage verification and identity test of Ghezel sheep using microsatellite markers. *Afr J Biotechnol*, 10, 5815-5819, 2011.
- 15. Glowatzki-Mullis ML, Muntwyler J, Gaillard C:** Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Anim Genet*, 38, 86-88, 2007.
- 16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold-Spring Harbor, New York, USA, 1989.
- 17. Hoffmann I, Marsan PA, Barker JSF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H:** New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: Recommendations of a joint ISAG/FAO working group. *29th ISAG (International Society of Animal Genetics) Congress, 11-16 September, Tokyo, 2004.*
- 18. Özsensoy Y, Kurar E, Doğan M, Bulut Z, Altunok V, Işık A, Çamlıdağ A, Nizamlıoğlu M:** Türkiye'de bulunan bazı yerli sığır ırklarının STR markörler ile genetik karakterizasyonu. *BIDAB*, 3, 163-171, 2010.
- 19. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS:** Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acid Res*, 19, 4008, 1991.
- 20. Jamieson A:** The genetics of transferrin in cattle. *Heredity*, 20, 419-441, 1965.
- 21. 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.
- 22. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM:** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7, 639-655, 1998.
- 23. Kurar E, Bulut Z, Nizamlıoğlu M:** Usefulness of a microsatellite test panel for cattle parentage testing in Turkey. *XIIth Congress of the International Society of Animal Clinical Biochemistry 22-26 May, İstanbul, 2006.*
- 24. Bulut Z, Kurar E, Ozsensoy Y, Altunok V, Nizamlıoğlu M:** Genetic diversity among goat populations in Turkey. *XXXI. Conference of the International Society for Animal Genetics, 20-24 July, Amsterdam, Netherland, 2008.*
- 25. Bozkaya F, Kuss AW, Geldermann H:** DNA variants of the MHC show location-specific convergence between sheep, goat and cattle. *Small Rumin Res*, 70, 174-182, 2007.
- 26. de Gortari MJ, Freking BA, Cuthbertson RP, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Leymaster KA, Dodds KG, Crawford AM, Beattie CW:** A second-generation linkage map of the sheep genome. *Mamm Genome* 9, 204-209, 1998.
- 27. Maddox JF, Davies KP, Crawford AM, Hulme DJ, Vaiman D, Cribiu EP, Freking BA, Beh KJ, Cockett NE, Kang N, Riffkin CD, Drinkwater R, Moore SS, Dodds KG, Lumsden JM, van Stijn TC, Phua SH, Adelson DL, Burkin HR, Broom JE, Buitkamp J, Cambridge L, Cushwa WT, Gerard E, Galloway SM, Harrison B, Hawken RJ, Hiendleder S, HM. Henry HM, Medrano JF, Paterson KA, Schibler L, Stone RT, Hest B:** An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genom Res*, 11, 1275-1289, 2001.
- 28. Lasagna E, Bianchi M, Ceccobelli C, Landi V, Martínez AM, Vega Pla JL, Panella F, Bermejo JVD, Sarti FM:** Genetic relationships and population structure in three Italian Merino-derived sheep breeds. *Small Rumin Res*, 96, 111-119, 2011.
- 29. Qanbari S, Eskandari Nasab MP, Osfoori R, Hagh Nazari A:** Power of microsatellite markers for analysis of genetic variation and parentage verification in sheep. *Pakistan J Biol Sci*, 10, 1632-1638, 2007.