

Türkiye’de Yetiştirilen Altı Yerli Koyun Irkında BMPR-IB (Booroola) Geninde FecB Allel Varlığının PCR-RFLP Yöntemiyle Araştırılması ^[1]

Taki KARSLI * Murat Soner BALCIOĞLU * 

[1] *Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2008.02.0121.004 proje numarası ile desteklenmiştir*

* Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, TR- 07070 Antalya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-2333

Özet

Bu çalışmada, Türkiye’de yetiştirilen altı yerli koyun ırkında, çoklu doğumu arttıran Booroola (BMPR-IB) majör geninde FecB allelinin varlığı PCR-RFLP metodu kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda Türkiye’nin değişik bölgelerinde yetiştirilen sürülerden rastgele seçilen Akkaraman (19 örnek), Morkaraman (19 örnek), Dağlıç (18 örnek), İvesi (18 örnek), Tuj (18 örnek) ve Karakaş (19 örnek) koyunlarına ait toplam 111 örnekte FecB alleli tespit edilememiştir.

Anahtar sözcükler: *Booroola geni, Çoklu doğum, FecB alleli, Koyun*

An Investigation of Presence of FecB Allele on BMPR-IB (Booroola) Gene Raised in Turkey in Six Local Sheep Breeds Using PCR-RFLP Method

Summary

The presence of FecB allele on Booroola major gene (BMPR-IB) which has an significant effect on the prolificacy was investigated in six local sheep breeds reared in Turkey, by using PCR-RFLP method. As a result of these analysis, FecB allele couldn’t be determined in totally 111 samples obtained from Akkaraman (19 samples), Morkaraman (19 samples), Dağlıç (18 samples), İvesi (18 samples), Tuj (18 samples) and Karakaş (19 samples), which are the sheeps randomly selected from the flocks which are reared in different regions of Turkey.

Keywords: *Booroola gene, Prolificacy, FecB allele, Sheep*

GİRİŞ

Türkiye’de koyun yetiştiriciliği öncelikle et üretimi için yapılmaktadır. Koyunculuktan sağlanan et verimi, kuzu üretimiyle yakından ilişkilidir. Bu durum koyun yetiştiriciliği ile ilgili faaliyetleri büyük oranda kuzu eti üretimine yöneltmiştir ¹. Bu nedenle yüksek döl verimi ve bir batında doğan yavru sayısı gibi özellikler ön plana çıkmaktadır. Genel olarak çok sayıda gen tarafından kontrol edildiği bilinen ve kantitatif bir özellik olan döl verimi düşük kalıtım derecesine sahip eşikli bir karakterdir. Diğer çiftlik hayvanlarından farklı olarak bazı koyun ırklarında döl verimi üzerine majör gen olarak adlandırılan genlerin de etkileri vardır ².

siyon ile artırılması kalıtım derecesi düşük olduğu için uzun zaman almaktadır ³. Bir batında doğan yavru sayısını etkileyen majör genler doğumdan hemen sonra moleküler teknikler yardımıyla belirlenebilir. Bu genlerin belirlenmesi, döl verimini artırmak için yapılan seleksiyon çalışmalarının süresini kısaltabilir, daha hızlı bir genetik ilerleme elde edilebilir ve melezleme çalışmaları ile bu genler diğer ırklara daha kolay aktarılabilir ⁴.

Majör genler tarafından sağlanan verim artışından en üst düzeyde yararlanabilmek için, öncelikle bu genlerin varlığının ve etki düzeylerinin ortaya konulması, her bir bireyde söz konusu lokustaki genotipin belirlenmesi ve çiftleştirme planlarının buna göre yapılması gerekir ⁵.

Koyunlarda bir batında doğan yavru sayısının selek-



İletişim (Correspondence)



+90 242 3102446



msoner@akdeniz.edu.tr

Koyunlarda döl verimi üzerine etkili ilk majör gen Avustralya Booroola Merinoslarında tespit edilen Booroola (FecB) genidir. Booroola geni için heterozigot hayvanlarda ovulasyon oranının (koyun başına) 1.5 kat, homozigot hayvanlarda ise 3 kat fazla olduğu, ovulasyon oranındaki bu artışın ise bir batında doğan yavru sayısını sırasıyla 1 ve 1.5 kat artırdığı bildirilmiştir ⁶.

Koyunlarda çoklu doğumu etkileyen majör genler bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Koyunlarda ovulasyon oranını artırdığı bilinen başlıca mutasyonların Bone Morphogenetic Protein Receptor-IB (BMPR-IB), Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) ve Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) genleri üzerinde olduğu bildirilmiştir ^{6,7}.

Souza ve ark.⁸ yaptıkları bir araştırmada insandaki BMPR-IB gen bölgesinin baz diziliminin, koyunlarda 6. kromozom üzerinde bulunan Booroola gen bölgesinin dizilimi ile aynı olduğunu, sadece Booroola geninin 746. nükleotidinde adenin ile guanin bazlarının yer değiştirmesine bağlı olarak glutamin amino asiti yerine arginin amino asitinin kodlandığını tespit etmişlerdir. Booroola geninin BMPR-IB geninde meydana gelen bir nokta mutasyonu sonucu oluşması nedeniyle bu gene BMPR-IB geni de denilmektedir ⁷⁻⁹.

Hayvanlarda nokta mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntem Polimeraz Zincir Reaksiyonu -Restriksiyon Uzunluk Parça Polimorfizmi (PCR-RFLP) metodudur. Bir çok hayvan türünde değişik nokta mutasyonları PCR-RFLP yöntemiyle araştırılmıştır ¹⁰⁻¹⁴. Bilinen mutasyonların belirlenmesi amacıyla geliştirilmiş olan PCR-RFLP metodunda, öncelikle varyasyonun olduğu DNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmakta ve elde edilen PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesime bırakılmaktadır. Kesim sonucu oluşan ürünler agaroz ya da poliakrilamid jelde yürütülerek elde edilen bant profiline göre, çoğaltılan DNA bölgesinin mutasyonu taşıyıp taşımadığı belirlenebilir ¹⁵.

Bu çalışmada Akkaraman, Morkaraman, Dağlıç, İvesi, Tuj ırkları ile Akkaraman ırkının varyetesi olan Karakaş koyunlarına ait toplam 111 örneğin Booroola geninde

FecB allelini taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmanın hayvan materyalini oluşturan koyunlara ait örnek sayıları ve kan örneklerinin alındığı merkezler *Tablo 1*'de gösterilmiştir. İncelenen örnekler yetiştirildikleri sürülerden rastgele seçilmiştir.

Kan Örneklerinin Alınması

DNA izolasyonu için kullanılacak kan Vena jugularisten steril tek kullanımlık iğnelerle EDTA'lı tüplere alınmıştır. Alınan kan örnekleri soğuk zincirde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Genetik Laboratuvarına en kısa sürede getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılabilecek kadar -20°C'de korunmuştur.

Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA, Miller ve ark.¹⁶ tarafından bildirilen izolasyon protokolü ile elde edilmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin miktarlarının belirlenmesinde spektrofotometre kullanılmıştır. Elde edilen DNA yoğunluğunun 20-150 ng/μl arasında değiştiği belirlenmiştir. PCR uygulamalarında yaklaşık 50 ng/μl yoğunlukta DNA kullanılmıştır.

PCR-RFLP İşlemi

Daha önce yapılan çalışmalar 17-19 incelenerek aşağıdaki primer seti ve amplifikasyon koşulları belirlenmiştir. PCR reaksiyonları için 190 bç'lik bant amplifiye eden forvard (5' CCA GAG GAC AAT AGC AAA GCA AA 3') ve reverse (5' CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT CAA CAC GGT C 3') baz dizininde bir primer seti kullanılmıştır. PCR ilk denatürasyon 95°C'de 2 dak, denatürasyon 95°C'de 45 sn, bağlanma 62°C'de 45 sn, uzama 72°C'de 45 sn ve son uzama 72°C'de 5 dak olmak üzere 30 döngü olarak uygulanmıştır. PCR reaksiyon karışımı 4 μl 10X buffer (pH:8.5), 4 μl MgCl₂ (25 mM), 7.5 μl dNTPs (2.5 mM), 1U Taq DNA polimeraz (BIORON), forvard primer 0.9 μl (0.2 μM), reverse primer 0.9 μl (0.2 μM) ve yaklaşık 50

Tablo 1. Koyun ırklarına ait örnek sayıları ve elde edildikleri yerler

Table 1. Samples of the number of sheep breeds and obtained places

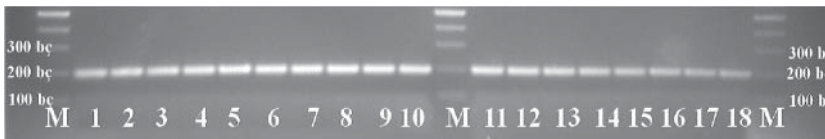
İrklar	Örnek Sayısı	Kan örneklerin alındığı merkezler
Akkaraman	19	Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Hay. Arş. Enst.
Morkaraman	19	Atatürk Ü. Ziraat Fakültesi
Dağlıç	18	Seydişehir, Ketenli Kasabası
İvesi	18	Atatürk Ü. Ziraat Fakültesi
Tuj	18	Atatürk Ü. Ziraat Fakültesi
Karakaş	19	Y.Y.Ü. Ziraat Fakültesi

ng/μl genomik DNA olmak üzere toplam 50 μl hacminde ayarlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri, G/GACC kesim bölgesine sahip *AvaII* restriksiyon enzimi (RE) (BIORON-1000u) ile kesime bırakılmıştır. Yapılan benzer çalışmalar incelenerek 17-19 aşağıdaki kesim programı ve miktarlar optimize edilmiştir. RFLP işlemi 10μl PCR ürünü, 2.5 μl TE buffer, 1.5 μl enzim tampon solüsyonu ve 10U *AvaII* enzimi eklendikten sonra karışım 37°C'de 16 saat bekletilerek yapılmıştır. Kesim ürünleri %3.5'luk agaroz jele (peqGOLD Universal Agarose) 12.5 μl kesim ürünü, 2.5 μl boya (Loading Buffer) olarak yüklenmiş ve 60 V'da 150 dak yürütülüp ethidium bromide ile bantlar görünür hale getirilmiştir. Elektroforez işlemi sonunda görüntülenecek olan bantların büyüklüklerini saptamak için 100 bç aralıklarla bant veren 1.5 kb büyüklüğünde DNA marker (BIORON-Kat.No:306005) kullanılmıştır. RE ile kesim işleminden sonra agaroz jelde, *FecB* alleli bakımından homozigot bireylerde 160 bç'lik tek bant, *FecB* alleli bakımından heterozigot bireylerde 190 ve 160 bç'lik iki bant, bu alleli taşımayan bireylerde ise 190 bç'lik tek bant olması gerekmektedir.

BULGULAR

Tablo 1'de tanımlanan koyun ırklarında 190 bç uzunluğundaki Booroola genini taşıyan bölge PCR'da başarı ile çoğaltılmıştır. Bu gen bölgesi *AvaII* restriksiyon enzimi ile muamele edilmiş ve çalışılan 111 örnekte Booroola geninde *FecB* alleli varlığı belirlenememiştir. İvesi koyun ırkında elde edilen agaroz jel görüntüsü **Şekil 1**'de verilmiştir.



Şekil 1. İvesi PCR ürünlerinin *AvaII* restriksiyon enzimi ile kesilmesi

Fig 1. Digestion of İvesi PCR products by *AvaII* restriction enzyme

TARTIŞMA ve SONUÇ

Elde edilen sonuçlar, Polat'ın 20 388 baş Sakız ve 18 baş Sakız X Kıvırcık melezi olmak üzere toplam 406 baş koyunla yaptığı çalışmayla benzerlik göstermektedir. Davis ve ark.¹² 13 ülkeden 21 koyun ırkı ile yaptıkları çalışmada Hu (12 örnek) ve Han (12 örnek) koyunları hariç diğer 19 koyun ırkında benzer sonuçları elde etmiştir. Guan ve ark.²¹ Çin'de yetiştirilen dokuz koyun ırkında yaptıkları çalışmada sadece Hu (305 örnek) ve Çin Et Merinoslarında (53 örnek) bu genin varlığını belirlemişler, diğer yedi ırkta ise tespit edememişlerdir. Kumar ve ark.¹⁰ Hindistan'a ait Garole (64 örnek), Malpura (62 örnek) ve Garole X Malpura melezi (53 örnek) koyun ırk-

ları ile yaptıkları çalışmada, Garole ve Garole X Malpura melezlerinde bu gen bakımından homozigot ve heterozigot bireyleri tespit etmişler ancak Malpura koyunlarında *FecB* allelinin bulunmadığını belirlemişlerdir. Kasariyan ve ark.²² İran Sangsari koyunlarında yaptıkları araştırmada *FecB* allelini tespit edememiştir. Davis ve ark.¹⁷ tarafından yapılan çalışmada benzer olarak Thoka, Woodlands, Olkaska, Belclare ve Cambridge koyun ırklarında *FecB* alleli tespit edilememiştir.

Bu çalışmada, her koyun ırkından 18-19 örnek olmak üzere toplam 111 örnek kullanılmıştır. Polat 20 ise sadece Sakız koyun ırkı için toplam 406 örnekle çalışmıştır. Davis ve ark.¹² tarafından Hu ve Han koyunlarında yapılan çalışmada, sadece 12 örnekle bu genin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca, Guan ve ark.²¹ Booroola genini Çin et Merinoslarında 50 örnekle, Kumar ve ark.¹⁰ ise Garole X Malpura melezlerinde 53 örnekte tespit etmiştir. Yapılan benzer çalışmalar örnek büyüklükleri açısından incelendiğinde çok büyük farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu tip çalışmalarda ırkın özelliklerini yansıtan saf yetiştirilmiş bireyler kullanılmalı ve elde edilebilecek maksimum örnekle çalışılmalıdır.

Bugüne kadar Türkiye'de çoklu doğuma neden olan majör genlerin sadece Sakız koyunlarında araştırılmasının nedeni, yerli koyun ırklarında çoklu doğum oranlarının Sakız koyun ırkına oranla daha düşük olması olabilir. Ancak, bu durum yerli ırkların majör genleri taşımadığı anlamına gelmemektedir. Davis ve ark.¹² tarafından prolific (bir batında doğan yavru sayısı ortalamaları üç civarında) Finn (21 örnek), Lley (16 örnek) D'Man (15 örnek), Romanov (11 örnek) koyunlarında yapılan araş-

tırmada *FecB* alleli tespit edilemezken, Kumar ve ark.¹⁰ çoklu doğum oranı daha düşük olan Garole (bir batında doğan yavru sayısı ortalaması 1.5-2) koyunlarında bazı bireylerin tek kuzulmasına rağmen homozigot *FecB* taşıyıcısı olduğunu saptamıştır. Bunun sebebinin de embriyo ölümleri, *FecB* geninin ifade edilememesi, besleme faktörlerine bağlı hormonal dengesizlik ve bilinmeyen çevre faktörleri olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada Booroola geninin tespit edilememiş olması, bu ırkların başka bir majör gen taşımayacağı anlamına gelmemektedir. Bu nedenle Türkiye yerli koyun ırkları çoklu doğuma neden olan diğer majör genler bakımından da incelenmelidir. Çünkü majör genler sadece yüksek döl verimi için değil aynı zamanda BMP15-

GDF9 genleri gibi bazı majör genler kısırılığa neden oldukları için koyun yetiştiriciliğinde önemlidirler. Türkiye yerli koyun ırkları tüm majör genler bakımından incelenmelidir. Majör genler tespit edilmesi durumunda, döl verimi için yapılan ıslah çalışmalarında kullanılabilir. Tespit edilememesi durumunda ise majör genleri taşıyan mevcut ırklar ya da bu ırklardan sperma ithal edilerek majör genlerin yerli ırklara aktarılması düşünülebilir. Bu sayede Türkiye'de kasaplık kuzu üretimi yapan işletmelerin büyütülmesi ve yaygınlaştırılması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. **Laçın E, Aksoy AR:** Kars bölgesinde yetiştirilen Morkaraman ve Tuj kuzularının büyüme özelliklerinin karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 9 (1): 33-37, 2003.
2. **Karaca O, Cemal İ, Atay O:** Hayvancılıkta kimi majör genlerin aktarımı ve kullanımı olanakları. *Ulusal Hayvancılık Kongresi*, İzmir, 728-732, 18-20 Eylül, 1996.
3. **Morris CA:** Theoretical and realised responses to selection for reproductive rate. *Proc of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Edinburgh, 16, 309-318, July, 23-27, 1990.
4. **Montgomery GW, Mcnatty KP, Davis GH:** Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocr Rev*, 13 (2): 309-328, 1992.
5. **Cemal İ:** Çiftlik hayvanlarında majör genler, bunların belirlenmesi, transferi ve endüstriyel kullanımı. *Yüksek Lisans tezi*. Yüzüncü Yıl Üniv Fen Bil Enst, Van, 1996.
6. **Davis GH:** Fecundity genes in sheep. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 247-253, 2004.
7. **Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden M, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O'connel AR, Mcnatty KP, Montgomery GW:** Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*, 64, 1225-1235, 2001.
8. **Souza CJH, Macdougall C, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT:** The booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type IB (BMPR-IB) gene. *J Endocrinol*, 169 (2): 1-6, 2001.
9. **Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lenneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Calebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teysier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen JM:** Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 5104-5109, 2001.
10. **Kumar S, Kolte AP, Mishra AK, Arora AL, Singh VK:** Identification of the FecB mutation in Garole Malpura sheep and its effect on litter size. *Small Rumin Res*, 64, 305-310, 2006.
11. **Hanrahan JP, Gregan MS, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powel R, Galloway SM:** Mutation in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*, 70, 900-909, 2004.
12. **Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway SM, Lumsden JM, Hanrahan JP, Mullen M, Mao XZ, Wang GL, Zhao ZS, Zeng YQ, Robinson JJ, Mayrogenis AP, Papachristoforou C, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett NE, Eythorsdottir E, Arranz JJ, Noter DR:** Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX^l) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim Reprod Sci*, 92, 87-96, 2006.
13. **Akyüz B, Ertuğrul O, Ağaoglu ÖK:** Detection of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) allele in Holstein cows reared in Kayseri vicinity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (2): 519-521, 2010.
14. **Tajangokeh HD, Shahneh AZ, Zamiri MJ, Daliri M, Kohram H, Javaremi AN:** Study of BMP-15 gene polymorphism in Iranian goats. *Afr J Biotechnol*, 8 (13): 2929-2932, 2009.
15. **Birben E:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PCR-RFLP) DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi. *Astım Allerji İmmünoloji*, 5 (1): 53-55, 2007.
16. **Miller S, Dykes D, Plesky HA:** Simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. *Nucleic Acids Res*, 16, 1215, 1988.
17. **Davis GH., Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar C, Gray DG, Inounu I, Tiesnamurti B, Martyniuk E, Eythorsdottir E, Mulsant P, Lecerf F, Hanrahan JP, Bradford GH, Wilson T:** DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol Reprod*, 66, 1869-1874, 2002.
18. **Kolte AP, Mishra AK, Kumar S, Arora AL, Singh VK:** A study on effect carrying FecB gene on body weight in Garole and GaroleXMalpura sheep. *Asian-Aust J Anim Sci*, 18 (10): 1379-1382, 2005.
19. **Chu MX, Liu ZH, Jiao CL, He YQ, Fang L, Ye, SC, Chen GH, Wang JY:** Mutation in BMPR-IB and BMP-15 genes are associated with litter size in small tailed Han sheep (*Ovis aries*). *J Anim Sci*, 85, 598-603, 2007.
20. **Polat YO:** Sakız koyun ırkında BMPR-IB geninde çoklu doğuma neden olabilecek FecB alleli varlığının PCR-RFLP yöntemi ile araştırılması. *Doktora tezi*. Uludağ Üniv Sağlık Bil Enst, Bursa, 2006.
21. **Guan F, Liu, SR, Shi GQ, Yang LG:** Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. *Anim Reprod Sci*, 99, 44-52, 2007.
22. **Kasariyan MM, Hafezeyan H, Sayahzadeh H, Jamshidi R, Asghari SR, Irajeyan GH, Buesagh H:** Genetic polymorphism FecB and BMP15 genes and its association with litter size in Sangsari sheep breed of Iran. *J Anim Vet Adv*, 8 (5): 1025-1031, 2009.