



**MORKARAMAN KOYUN IRKINDA
MSTN GENİ POLİMORFİZMİ**

Esranur SAYGILI

**Yüksek Lisans Tezi
Zootečni Ana Bilim Dalı
Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR
2021
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANA BİLİM DALI

MORKARAMAN KOYUN IRKINDA MSTN GENİ POLİMORFİZMİ
(Polymorphism of MSTN gene in Morkaraman sheep)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esranur SAYGILI

Danışman: Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR

Erzurum
Ağustos, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Esratur SAYGILI tarafından hazırlanan “**Morkaraman Koyun Irkında MSTN Geni Polimorfizmi**” başlıklı çalışması 17/08/2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Zootekni** Ana Bilim Dalı, **Biyometri ve Genetik** Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Nurinisa ESENBUĞA (Atatürk Üniversitesi)	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof.Dr. Memiş ÖZDEMİR (Atatürk Üniversitesi)	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç.Dr. M. Kuddusi ERHAN (Ağrı İbrahim Çeçen Üni)	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Prof.Dr. Memiş ÖZDEMİR* danışmanlığında sunulan “**Morkaraman Koyun Irkında MSTN Geni Polimorfizmi**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	20	30
Kuramsal Temeller	24	30
Materyal ve Yöntem	17	35
Bulgular ve Tartışma	0	20
Tezin Geneli	22	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Esranur SAYGILI	Prof.Dr. Memiş ÖZDEMİR
17.8.2021	17.8.2021
İmza:  Aslı Islak İmzalıdır	İmza:  Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında engin bilgi birikimleri ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırlarıyla beni destekleyen, bilime olan tutkularıyla motivasyonumu her daim yüksek tutan değerli hocam **Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR**'e,

Laboratuvar çalışmalarımdayan yanımda olup, yardımlarını esirgemeyen **Dr. Öğr. Üyesi Zeynep SÖNMEZ**'e

Yoğun programlarının arasında vakit ayırarak laboratuvar çalışmalarımaya katkı sağlayan Araştırma Görevlisi **Ülkü DAĞDELEN TÜRKYILMAZ** ve **Kübra EKİNCİ** hocalarıma,

Çalışmalarım boyunca her türlü yardımı sağlayan arkadaşım **Betül TUNCAY**'a,

Çalışmanın ortaya çıkmasında büyük destek sağlayan **BAP yönetim kurulu üyelerine** (*Proje No: FYL-2021-9097*),

Yetişmemde ve hayatımın her karesinde, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, varlığından güç aldığım **AİLEME** çok teşekkür ederim.

Esranur SAYGILI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MORKARAMAN KOYUN IRKINDA MSTN GENİ POLİMORFİZMİ

Esranur SAYGILI

Danışman: Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR

Amaç: Bu çalışmada, Erzurum ve Bingöl’de yetiştirilen Morkaraman Koyun ırkına ait Miyostatin (*MSTN*) gen lokusu *HaeIII* polimorfik yapılarının incelenmesi, genotip ve allel frekanslarının dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada kullanılan 262 baş Morkaraman Koyun ırkından alınan kan örneklerinden izole edilmiş DNA’larda, *PCR-RFLP* yöntemi kullanılarak *MSTN/HaeIII* gen polimorfizmleri tanımlanmıştır. *PCR-RFLP* ürünleri elektroforez ortamında yürütülerek sonuçlar ultraviyole (UV) cihazında bantlar halinde görüntülenmiştir. Araştırmada genotip, allel frekans dağılımları ve popülasyonun Hardy-Weinberg genetik denge testleri yapılmıştır.

Bulgular: Hardy-Weinberg genetik denge testine göre çalışılan popülasyonda genotip frekansları dağılımının dengede olmadığı ($P<0.01$) gözlenmiştir. Popülasyondaki *MSTN* genine ait MM, Mm ve mm genotip frekansları sırasıyla %11.1, %62.6 ve %26.3, M allelinin frekansı 0.42 ve m allelinin frekansı 0.58 olarak tespit edilmiştir. Tüm popülasyonda *MSTN* için hesaplanan gözlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e) değerlerinden oldukça yüksek bulunmuştur. Fis değeri -0.312 olarak bulunurken, Fit değeri -0.303 olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Morkaraman ırkı koyunlardan alınan kan örneklerinden *PCR-RFLP* yöntemi kullanılarak *MSTN* genotipleri tespit edilmiştir. İncelenen koyun ırkı popülasyonunda *MSTN* gen lokusu dağılımının Hardy-Weinberg prensibine göre genetik dengede değildi. *MSTN* gen polimorfizmi bakımından belirlenen genotip ve allel frekansları ırkın genotip çeşitliliğini ortaya koymada yeterli olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Miyostatin, polimorfizm, Morkaraman, *PCR-RFLP*, koyun

Ağustos 2021, 48 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

POLYMORPHISM of MSTN GENE IN MORKARAMAN SHEEP

Esranur SAYGILI

Advisor: Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR

Purpose: This study was aimed to examine the polymorphic structures of the Myostatin (MSTN) gene locus *HaeIII* belonging to the Morkaraman sheep bred in Erzurum and Bingöl, and to determine the distribution of genotype and allele frequencies.

Method: MSTN/*HaeIII* gene polymorphisms were identified in DNA isolated from blood samples from 262 Morkaraman sheep used in the study, using the PCR-RFLP method. PCR-RFLP products were run in electrophoresis medium and the results were visualized as bands in an ultraviolet (UV) device. In the study, genotype, allele frequency distributions and Hardy-Weinberg genetic equilibrium tests of the population were performed.

Findings: According to the Hardy-Weinberg genetic balance test, it was observed that the distribution of genotype frequencies was not in balance ($P < 0.01$) in the population studied. The MM, Mm and mm genotype frequencies of the MSTN gene in the population were determined as 11.1%, 62.6% and 26.3%, respectively, the frequency of the M allele was 0.42 and the frequency of the m allele was 0.58. Observed heterozygosity (H_o) calculated for MSTN in the whole population was significantly higher than expected heterozygosity (H_e) values. While the Fis value was found as -0.312, the Fit value was determined as -0.303.

Results: MSTN genotypes were determined using PCR-RFLP method from blood samples taken from 262 Morkaraman sheep. It was determined that the distribution of the MSTN gene locus in the examined sheep population was not in genetic equilibrium according to the Hardy-Weinberg principle, and the genotype and allele frequencies determined in terms of MSTN gene polymorphism were sufficient to reveal the genotype diversity of the breed.

Keywords: MSTN, polymorphism, Morkaraman, PCR-RFLP, sheep

August 2021, 48 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
Araştırmanın Amacı	4
KURAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR.....	5
Morkaraman Koyun Irkı	7
Koyunlarda Miyostatin (MSTN) Geni	8
DNA İzolasyonu.....	9
PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	10
Restriksiyon Endonükleazlar	11
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)	11
Literatür Özetleri	11
MATERYAL ve YÖNTEM	16
Materyal	16
Yararlanılan alet ve cihazlar.....	16
Yöntem.....	16
Genomik DNA izolasyonu.....	17
PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) işlemi	17
Restriksiyon enzimiyle DNA'ların kesimi	18
Verilerin analizi.....	19
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	22
DNA'nın Kantitatif Tayini	22
PCR sonuçlarının gözlenmesi	22
PCR-RFLP Sonuçları	23
Gen ve Genotip Frekansları ile Genetik Denge Testi Sonuçları	23
Heterozigotluk Oranları ve Fiksasyon İndeksi.....	26

SONUÇ.....	28
KAYNAKÇA	29



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Morkaraman karkas ve kalite ölçü ortalamaları.....	8
Tablo 2. MSTN genine ait primer dizilimi	18
Tablo 3. MSTN gen bölgesi için PCR programı.....	18
Tablo 4. Allellerin ayrımı için kullanılan reaksiyonun bileşenleri	19
Tablo 5. Restriksiyon enzimi, tanıma bölgesi ve beklenen bant uzunluğu.....	19
Tablo 6. Bazı genomik DNA örneklerine ait kantitatif sonuçlar (260-280 ng/µl).....	22
Tablo 7. Morkaraman ırkı MSTN geni Genotip ve Allel Gen Frekansları.....	23
Tablo 8. Hardy-Weinberg genetik denge testi sonuçları.....	25
Tablo 9. Popülasyonların MSTN geni polimorfik yapısı bakımından heterozigotluk oranları ve fiksasyon indeksleri.....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bereketli Hilal	1
Şekil 2. Dünya’da koyun yetiştiriciliğinin ülkelere göre dağılımı	2
Şekil 3. Koyun yetiştiriciliğinde dünya’da ilk 10 arasına giren ülkeler	2
Şekil 4. Türkiye’de son yıllardaki koyun sayısı değişimi	6
Şekil 5. Türkiye’de son yıllardaki büyükbaş ve küçükbaş hayvan sayısı (TÜİK).....	6
Şekil 6. Morkaraman koyun ırkı	7
Şekil 7. MSTN lokusu (NCBI).....	9
Şekil 8. PCR ürünlerinin %1’lik agaroz jelde görünümü (M: markör, MSTN:337 bç)....	22
Şekil 9. MSTN genine ait PCR-RFLP jel görüntüsü.....	23
Şekil 10. Morkaraman koyun ırkı MSTN geni HaeIII polimorfizmine ait genotip frekansları.....	25
Şekil 11. Morkaraman koyun ırkı MSTN geni HaeIII polimorfizmine ait allel gen frekansları.....	25

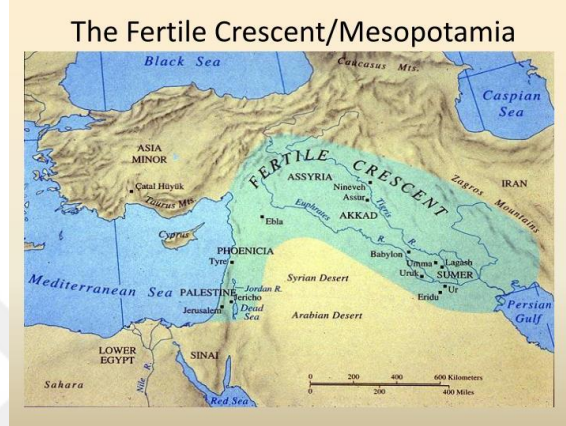
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
AB	: Avrupa Birliği
Bç	: Baz Çifti
BCO2	: Beta-Karoten 2
C	: Sitozin
°C	: Santigrat Derece
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
CRISPR/Cas9	: Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPRs)- ilişkili Cas9 nükleazları
Cys	: Cysteine (Sistein)
dak	: Dakika
ddH₂O	: Double-distilled water
DKDKS	: Doğuran Koyun Başına Doğan Kuzu Sayısı
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinukleosid Trifosfat
dsDNA	: Çift sarmallı Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (Etilendiamin Tetra Asetik Asit)
EtBr	: Ethydium Bromide (Etidyum Bromid)
FagI	: Restriksiyon Enzim
GHUAM	: Atatürk Üniversitesi, Gıda ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi
g	: Gram
G	: Guanin
GDF8	: Büyüme ve Farklılaşma Faktör 8
GÜ	: Gelişmiş Ülkeler
QTL	: Kantitatif özellikli lokus
QTN	: Quantitative Trait Nucleotide (Kantitatif karakter nükleotidi)
He	: Expected Heterozygosity (Beklenen Heterozigotluk)
H-E	: Hardy-Weinberg Equilibrium (Hardy-Weinberg Dengesi)
MspI	: <i>Moraxella</i> türlerinden MspI genini taşıyan bir <i>E. coli</i> suşu
Ho	: Observed Heterozygosity (Gözlenen Heterozigotluk)
Kb	: Kilo baz

KCl	: Potasyum klorür
KDa	: Kilodalton
Kg	: Kilogram
KKBDKS	: Koç Altı Koyun Başına Doğan Kuzu Sayısı
LSM	: En küçük kareler ortalaması
m	: Metre
M	: Molar
MAS	: Marker Asisted Selection (Markör Destekli Seleksiyon)
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mRNA	: Messenger RNA (Mesajcı Ribo Nükleik asit)
MSTN	: Miyostatin
NaCl	: Sodyum Klorür
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
RBC	: Red Blood Cell
RE	: Restriction Endonuclease (Restriksiyon Endonükleaz)
RFLP	: Restriction fragment lenght polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm)
rpm	: Rotor Per Minute (Bir Dakikadaki Rotor Devir Sayısı)
sgRNA	: Gen düzenleme tekniğinde kullanılan tek iplikli rehber RNA
SSCP	: Tek sarmallı konformasyon polimorfizmi
ssDNA	: Tek sarmallı Deoksiribonükleik asit
TBE	: Tris Borik asit EDTA
Tm	: Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)
UV	: Ultra violet (Ultra Viyole)
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
<	: küçüktür
>	: büyüktür

GİRİŞ

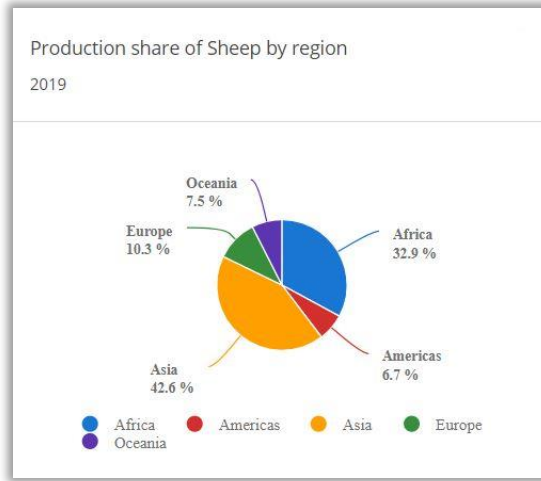
Hayvancılık sektörünün biyolojik, sosyoekonomik ve stratejik düzlemdeki çok boyutlu fonksiyonunu kavrayan uluslar, yerel ve küresel ihtiyaçlar ışığında benzer amaçlar ve kısmen farklılaştırılmış araçlarla sektörlerini rasyonel biçimde yönlendirmektedir. Avrupa Birliği (AB) ve gelişmiş ülkelerin (GÜ) hayvansal ürünler üretim ve tüketim düzeyleri, dış ticaret eğilimleri ve bütçelerinden hayvancılığa ayırdıkları paylar sektörün gelecekte de önemini koruyacağını açıkça göstermektedir (Can, 2018).



Şekil 1. Bereketli Hilal (Anonim, 2014)

İnsanoğlu göçebe yaşam biçiminden yerleşik yaşam biçimine geçerken ihtiyaçları doğrultusunda evcilleştirmeyeyle tanışmıştır. İnsanlık için dönüm noktalarından birisi olan “Evcilleştirme”, Neolitik çağda, yaklaşık olarak 11.000 yıl önce Anadolu’nun bir kısmının da içerisinde bulunduğu Bereketli Hilal (Fertile Crescent) olarak bilinen topraklarda başlamıştır (Zeder, 2008). Çiftlik hayvanlarının evcilleştirmesinde 4 türün adı geçmektedir. Bunlar domuz, sığır, koyun ve keçidir. Evcilleştirme tarihleri birbirlerine yakın olmakla beraber koyun ve keçinin ilk evcilleştirilen türler olduğu tahmin edilmektedir (Zeder, 2008).

FAOSTAT 2019 verilerine göre Dünya’da yetiştirilen tüm koyun sayıları Şekil 2’de belirtilmiştir. Asya kıtasının koyun üretiminin neredeyse yarısını karşıladığı görülmektedir. Şekil 3’de görüldüğü gibi ülkemiz koyun üretiminde ilk 10 ülke arasındadır (Anonymous, 2019).



Şekil 2. Dünya’da koyun yetiştiriciliğinin ülkelere göre dağılımı (Anonymous, 2019)



Şekil 3. Koyun yetiştiriciliğinde Dünya’da ilk 10 arasına giren ülkeler (Anonymous, 2019)

Koyun yetiştiriciliği, Anadolu coğrafyasında önemli bir yere sahiptir. Koyun, Türk insanının beslenmesinden barınmasına hatta ekonomisine kadar yaşantısında geniş yer tutmuş olup, ilk evcilleştirildiği topraklara olan yakınlığı sebebiyle tarihsel süreçte de önemli rol üstlenmiştir (Yılmaz vd., 2014).

Artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacının karşılanmasında hayvancılık sektöründe çok önemli bir yere sahip olan koyun varlığının ve verim potansiyellerinin önemi büyüktür. Ülkemiz koyun yetiştiriciliğinde verim artışını kalite ve kantite olarak sağlamak için başta bakım, besleme, alt yapı gibi pek çok çevre faktörlerinin iyileştirilmesi yanında, hayvan ithali ve melezleme çalışmaları sonucunda değişen koyun genetik yapısının da büyük katkısı olmaktadır (Doğru ve Özdemir, 2002).

Hayvancılıkta verimi esas alan ıslah çalışmalarında üzerinde durulan ilk konu, hayvanın genotipinde mevcut olan verim potansiyelini ortaya koyacak ideal çevre şartlarının sağlanmasıdır. Buna karşın verim artışında genotipi iyileştirme çabaları daha etkili, kârlı ve sürekli olmasına rağmen uygulanması daha güç, spesifik ve zaman alıcı olmaktadır. Hayvanlarda üstün fenotipi oluşturmak, karakteri etkileyen iyi ve verimli genleri tespit edip genotipte istenen genleri bir araya getirerek ve genler arası etkileşimden faydalanmakla mümkündür. Çiftlik hayvanlarından elde edilen verimlere ait karakterler hem çok sayıda genin kontrolü altında hem de çevre faktörleri tarafından büyük ölçüde etkilendiği için bu karakterlerde fenotipik değer çoğu zaman genotipik değeri yansıtamadığından fenotipe dayalı seleksiyon da verimlilikte azalmalar gözlenmektedir. Bu sebepten dolayı fenotip, çoğu zaman genotipin iyi bir göstergesi olamadığından ele alınan karakterin genotipik değerinin tahmin edilmesi oldukça önem arz etmektedir. Günümüzde genotipi iyileştirme çalışmaları, laboratuvar metot ve tekniklerinin gelişmesi, teknolojik şartların ilerlemesiyle melezleme ve seleksiyon gibi klasik ıslah metotlarından daha ileri boyutlara çekilmiştir. Çiftlik hayvanlarından elde edilen ve ekonomik önemi olan çeşitli verimlere (süt, yapağı, yumurta ve et gibi) ait karakterler fazla sayıdaki genin kontrolü altında ve çeşitli çevre faktörlerince büyük ölçüde etkilendiğinden söz konusu kantitatif karakterlerde fenotipik değer çoğu zaman genotipik değeri yansıtmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı ele alınan bu tür karakterlerin genotipik değerinin tahmin edilmesi büyük önem taşımaktadır (Doğru ve Özdemir, 2002).

Son yıllarda moleküler genetik teknik ve analiz alanında elde edilen teknolojik gelişmeler özellikle çiftlik hayvanlarında kantitatif karakterler üzerine etkili genlerin moleküler düzeyde incelenbilmesine olanak sağlamıştır (Akyüz vd., 2017). Moleküler biyoloji teknikleri özel lokuslardaki genetik varyasyonun tanımlanmasına ve QTL (Kantitatif özellikli lokus)'deki varyasyonla verim özellikleri arasındaki ilişkileri incelemeye olanaklar sunmaktadır. Amaç hayvanın genetik değerini daha yüksek bir doğrulukla tahmin etmek ve seleksiyonla elde edilen genetik kazancı artırmaktır. Bunun için MAS (Marker Asisted-Selection; Markör Destekli Seleksiyon) kullanmak zorunlu görünmektedir. Nitekim araştırmalarda fenotiple ilişkili fizyolojik olayları etkileyen genler üzerindeki genetik varyasyonların ilgili fenotipteki kantitatif varyasyonlara etki edebileceği ifade edilmiştir (Tambasco et al., 2003). MAS'ın amacı seçim yanıtını iyileştirmektir (Meuwissen et al., 1996). Bu tür QTL'nin seçim programlarında başarılı bir şekilde uygulanması için, gözlemlenen etkiden sorumlu olan spesifik polimorfizmlerin tanımlanması gereklidir (Ron et al., 2007).

Kantitatif özellikleri kontrol eden genlerdeki farklılıkların nükleotid düzeyinde tespit edilmesinden dolayı QTN (Quantitative Trait Nucleotide) ifadesi yaygın olarak

kullanılmaktadır. Günümüzde hayvanlarda verim özellikleri üzerine etkili QTL (Quantitative Trait Loci) ve QTN'lerin tanımlanması çalışmaları hızlı bir şekilde devam etmektedir (Fernandez et al., 2011). Kantitatif karakter lokus (QTL) çalışmalarının en temel hedeflerinden biri Markör destekli seleksiyon (MAS) ile ıslah programlarında uygulanabilecek genleri bulmaktır (Khatkar et al., 2004). Genom haritalarının ve QTL analizinin sürekli geliştirilmesi, genler ve hatta QTL'yi oluşturan spesifik polimorfik alellerin belirlenmesi sonucunda rekombinasyon problemini ortadan kaldıracaktır (Wakchaure et al., 2015).

MAS kullanmanın avantajı, genlerin üretim üzerindeki etkisinin doğrudan hayvanın genetik yapısı üzerinde ölçülmesi ve fenotipten tahmin edilmemesidir. İki seçim yönteminin, yani geleneksel veya geleneksel seçim yöntemlerinin moleküler genetik yöntemlerle entegrasyonu, seçim yanıtı için yararlıdır. Birden çok tahmini QTL etkisi ve birden çok özellik seçimi, hayvan ıslahında MAS kullanımına ilişkin daha iyi kararlar almaya yardımcı olabilir (Wakchaure et al., 2015).

Çiftlik hayvanlarının kantitatif verim özellikleri üzerine önemli derecede etkili aday genler için genetik markörler MAS programlarında önemli rol oynayabilirler. Bu şekilde aday genlerdeki genetik markörlerle verim özelliklerinin ilişki analizleri özelliklerin genetik kontrolüne imkân sağlayabilir. İlişki çalışmalarında en fazla kullanılanı, verim özellikleri üzerine fonksiyonel olarak önemli etkilere sahip aday genlerdeki genetik polimorfizmlerdir.

Polimorfizm gösteren markörler; markör allel frekanslarındaki farklılıklar ile ele alınan farklılıklarda özelliklerin varyasyonları arasında bir korelasyon aramak veya iyi tanımlı pedigrilerde ilgili özellik ve markör farklılıklarını ilişkilendirmek şeklinde araştırılmaktadır (Hillis and Maritz, 1990).

Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada amaç, Erzurum ve Bingöl'de yetiştirilen Morkaraman koyun ırkına ait Miyostatin (MSTN) gen lokusu *HaeIII* polimorfik yapılarının incelenmesi, genotip ve allel frekanslarının dağılımının belirlenmesidir.

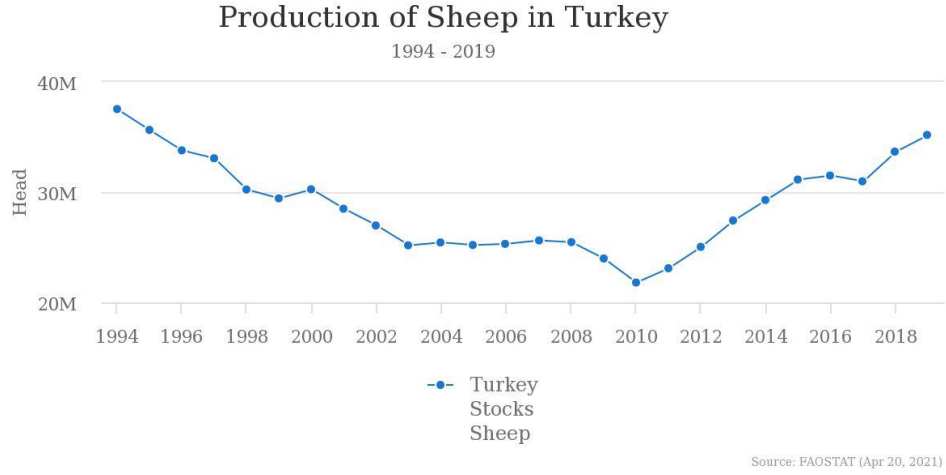
KURAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

Tarım sektörünün bir kolu olan hayvancılık, tarımın diğer alanlarında ve ülkenin ekonomisinde gelişmeyi canlandırıcı etkiye sahip olması bakımından stratejik bir öneme sahiptir. Hayvancılık, beslenme, sanayi hammaddesi sağlama, işsizliği ve kırsal kesimden kente göçü önlemede ve istihdam sağlamada önemli bir role sahiptir. Ayrıca hayvancılık sektörü, ülke ekonomisini geliştiren, birim yatırıma en yüksek katma değer oluşturan ve en düşük maliyetle istihdam imkânı sağlayan bir sektördür (Şahin vd., 2011).

Cumhuriyetin kuruluşundan bu yana gerek araştırma kurumları gerekse Üniversitelerde kültür ırkları üzerinde birçok çalışma yürütülmüş ve yeni koyun genotiplerinin geliştirilmesi bakımından çok olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu gelişmeler yetiştirici koşullarına arzulanan seviyede yansıtılamamıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda koyun popülasyonuna sadece %3 dolayında yabancı genotipler aktarılabilmiş, bunun sonucunda da et, süt ve yapağı verimlerinin geliştirilmesini hedef alan etkin stratejiler yürürlüğe konamamıştır. Böylece ülkemizde koyun yetiştiriciliği ekstansif karakterini korumuş, şartların iyileştirilmesine paralel olarak koyunculukta entansif yetiştiriciliği amaçlayan yeni üretim modellerine yönelme yerine, yetiştirici koyunculuğu bırakarak başka üretim alanlarına kaymıştır (Karaca vd. 1996a; Kaymakçı vd. 2000; Pekel, 2002; Saçlı, 2007).

Koyun yetiştiriciliği, Anadolu kültüründe maddi ve manevi bir öneme sahiptir. Koyun, Türk insanının beslenmesi, giyinip barınması ve benzeri konularda ekonomik bir öge olduğu kadar, manevi alanda da tarihi süreç içerisinde önemli bir rol üstlenmiştir. Göçer koyunculuk otlatma ve kışlatma bakımından büyük koyun sürülerinin çeşitli mevsimlerde bölgeden bölgeye veya bölge içinde göç etmesi şeklidir. Zaman içerisinde boş arazilerin ve otlakların azalması ve göçer koyunculüğün yarattığı kimi sorunlar nedeniyle gittikçe azalan bir kültür ve yetiştirme yöntemidir. Daha çok yaz aylarında yaylalara gitmek ve kış aylarında da kar tutmayan sıcak bölgelerde koyunlara zayıtsız kış geçirmek amacıyla yapılır. Göçer kültürü, hayvancılığa dayalı bir ekonominin belirlediği konargöçer, yarı göçer ve yaylacı toplulukların geleneksel yaşama biçimidir (Dulkadir, 1985).

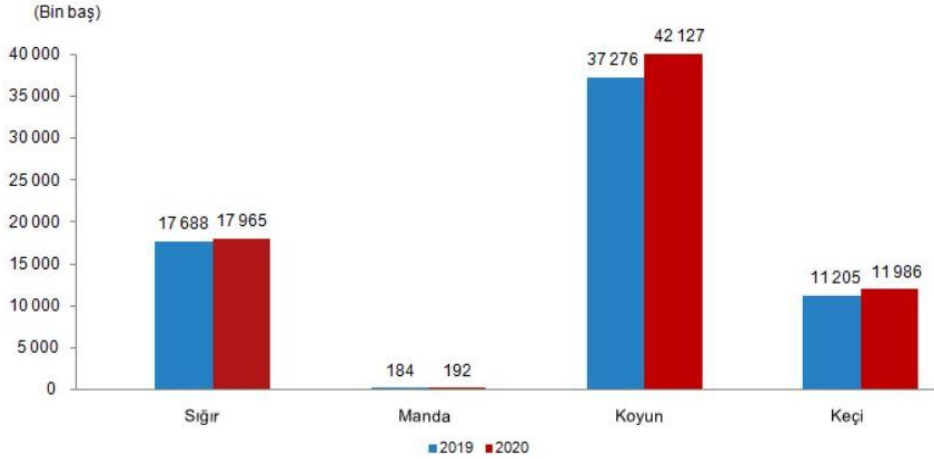
Ülkemizdeki koyun sayısındaki yıllara göre değişim oranı Şekil 4’de gösterilmiştir. 2010 yılından günümüze kadar koyun sayısı artış göstermektedir.



Şekil 4. Türkiye’de son yıllardaki koyun sayısı değişimi (Anonymous, 2019)

TÜİK verilerine göre son iki yılda hayvan sayısındaki değişimler Şekil 5’de gösterilmiştir (Anonim 2020).

Hayvan sayıları, 2019-2020



Şekil 5. Türkiye’de son yıllardaki büyükbaş ve küçükbaş hayvan sayısı (Anonim 2020)

Türkiye’de koyun varlığının sayıca yüksek olmasına ve hayvancılık sektöründe oldukça önemli bir yere sahip olmasına karşın yetiştiricilik şekli ekstansif koşullar altında sürdürülmekte ve koyun varlığımızın büyük bir bölümünü verim düzeyleri düşük, fakat yetersiz bakım-beslenme koşullarına iyi adapte olan yerli ırklardan meydana gelmektedir (Eliçin ve Okuyan, 1975; Eliçin vd., 1989).

Koyun varlığımızın büyük kısmına sahip Doğu Anadolu Bölgesinde; Erzurum, Kars, Ağrı ve Muş yörelerinde Morkaraman ırkı, Bitlis ve Van yörelerinde ise Akkaraman ırkının bir varyetesi olan Karakaş koyunları yaygın olarak yetiştirilmektedir (Karaca vd. 1996b). Yine,

Kars'ta Tuj ırkı, bölgenin güney kesimlerinde de Hamdani ırkı yetiştiriciliği söz konusudur (Geliyi ve İlaslan, 1978).

Morkaraman Koyun Irkı

Türkiye koyun nüfusunun yaklaşık %87'sini (25.4 milyon baş) yağlı kuyruklu ırklar oluşturmaktadır. Türkiye'nin doğu ve kuzeydoğu bölgelerindeki koyun popülasyonu ağırlıklı olarak Morkaraman ırkından oluşmaktadır. Bu koyunların zorlu çevre koşulları altında doğal seleksiyon yoluyla evrimleştiği düşünülmektedir. Doğu Anadolu çiftçileri yüzyıllardır Morkaraman ırkını süt, et ve yün üretmek için kullanmışlardır (Macit, 2002; Esenbuğa et al., 2009).



Şekil 6. Morkaraman koyun ırkı (Anonim, 2021)

Morkaraman Koyununun Morfolojik Özellikleri

Sağlam iri yapılıdır. Kuyruk yatık S şeklindedir. Kızıldan mora kadar değişmekle birlikte göz, ağız ve burun etrafı daha açık renklidir. Erkeklerin çoğu dişilerin bir kısmı boynuzludur.

Vücut özellikleri

Morkaraman koyunlarına ilişkin vücut ölçülerinden cidago yüksekliği 65-76 cm, göğüs derinliği 34-36 cm, göğüs çevresi 91-107 cm, vücut uzunluğu 67-72 cm, sırt yüksekliği 68 cm ve sağrı yüksekliği 63-76 cm olarak birçok araştırmacı tarafından (Uluslan ve Aksoy, 1996) bildirilmiştir.

Morkaraman Koyununun Fizyolojik Özellikleri Verim Özellikleri

Birçok araştırmacı tarafından yapılan araştırmalarda (Tanrıverdi, 1976; Vanlı, 1976; Geliyi ve İlaslan, 1978; Özsoy 1980; Akçapınar vd., 1982; Akçapınar ve Aydın, 1984; Özsoy ve Vanlı, 1985; Akbulut, 1986; Baş vd., 1986; Yalçın, 1987; Özcan 1989; Aytuğ vd., 1990;

Uluslan ve Aksoy, 1996; Macit ve Aksoy 1996; Esenbuğa vd., 1998; Dayıoğlu vd., 1998; Küçük vd., 2000; Esenbuğa ve Dayıoğlu, 2002; Ateş vd., 2003; Bilgin vd., 2004; Emsen vd., 2008) Morkaraman koyun ve koçlarında ortalama ergin canlı ağırlığı 45-60 kg ve 60-70 kg, doğum ağırlığı 3-4 kg, kuzulama oranı % 90, doğuran koyun başına doğan kuzu sayısı (DKDKS) 1.13-1.28, koç altı koyun başına doğan kuzu sayısı (KKBDKS) 0.92-1.07, ikiz doğum oranı % 2, yaşama gücü % 80-90, kısırılık oranı % 4-8, laktasyon dönemi süt verimi 65-80 kg, laktasyon süresi 130-150 gün, kirli yapağı verimi 1.2-2.0 kg, lüle uzunluğu 10-12 cm, incelik 30-34 mikron ve sortiman 50-36'S olarak bildirilmiştir.

Morkaraman ırkına ilişkin karkas ölçüleri ve bazı kalite ölçütlerine ilişkin veriler (Yaprak, 1997), Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Morkaraman koyun ırkına ait karkas ve kalite ölçü ortalamaları

Karkas Ölçüleri	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	Bazı Kalite Ölçüleri	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Karkas uzunluğu	66.0±1.44	Karkas konformasyonu	3.65±0.17
Sırt-bel uzunluğu	38.1±0.98	But konformasyonu	4.02±0.14
But içi uzunluğu	27.3±0.20	Mozaiikleşme	2.00±0.09
But genişliği	26.1±0.79	Göz kası alanı	12.65±0.34
But derinliği	18.8±0.58	Kabuk yağı kalınlığı	3.60±0.28
Göğüs çevresi	76.8±0.86		
Göğüs derinliği	17.9±0.40		

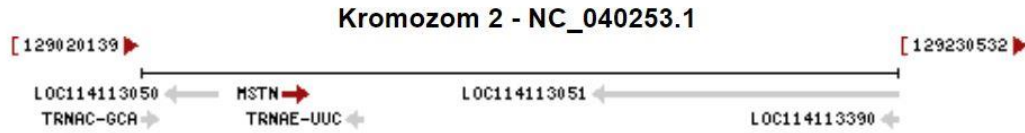
Yerli koyun ırklarımızda verim düşüklüğü, yüzyıllardır uygulanmış olan geleneksel yetiştirme, bakım ve besleme koşullarının sonucunda oluşmuş genetik yapıdan kaynaklanıyor ise de Türkiye'de halen uygulanmakta olan bu yetiştirme şekli ve yönetim biçimi de mevcut genetik potansiyelden yeterince faydalanılmasına engel olmaktadır (Eliçin ve Okuyan, 1975; Eliçin vd., 1989).

Koyunlarda Miyostatin (MSTN) Geni

Hayvanların performans özellikleri, üretimin karlılığını etkilediği için çok önemlidir. Pek çok ülkedeki koyun yetiştirme programları, diğerlerinin yanı sıra et özelliklerine odaklanmaktadır. Bu nedenle, böyle bir performansın genetik temelini anlamak önemlidir. Hayvanların et performansını etkileyen genlerden biri de miyostatin (MSTN) genidir (Allais et al., 2010).

Hücre bölünmesinde önemli yeri olan sitokinler bulunmaktadır. Bunlardan biri de Transforming Growth Factor- β (TGF- β)'dır. Farklı fonksiyonları olan bu sitokin, hücre bölünmesini pozitif veya negatif yönde etkilemektedir. TGF- β , hücrelerden inaktif kompleks formda salgılandıktan sonra kendi reseptörleriyle birleşerek reseptör proteinlerini aktif hale getirmektedir. Reseptör proteinleri ortamda bulunan büyüme faktörlerini (smad-2 veya smad-3) aktifleştirmektedir. Sonrasında, smad-4 ile birleşerek hedeflenen bölgede görev almaktadır (Kawabata and Miyazono, 1999). TGF- β 'ların birçok alt tipi bulunmaktadır. Bunlardan biri de GDF (Growth and Differentiation Factor)'dır. GDF, büyüme ve farklılaşma olaylarında düzenleyici etki yapmaktadır. GDF'nin alt tiplerinden biri olan GDF-8, miyostatin geni olarak da ifade edilmektedir. Miyostatin geni çift kaslılığa neden olmaktadır. Özellikle iskelet kaslarında sentezlenen miyostatin, bu kasların büyüme ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Miyostatin geninin iskelet kaslarında büyümeyi etkilediği ilk defa farelerde tespit edilmiştir ve böylelikle miyostatin geninin TGF- β ailesinin bir üyesi olduğu belirlenmiştir (McPherron et al., 1997).

Koyun (*Ovis aries*) MSTN yapısal geni, kromozom 2'de bulunur ve diğer tüm omurgalıların homolog genlerine benzer şekilde üç ekson ve iki intron halinde düzenlenir (Rodgers and Garikipati, 2008).



Şekil 7. MSTN lokusu (NCBI)

MSTN geni, büyüme ve farklılaşma faktör 8 (GDF8) olarak da bilinir ve kas liflerinin oluşumunu önleyerek kas büyümesini engelleme de rol oynamaktadır. MSTN geninde meydana gelen mutasyonların çeşitli memeli türlerinde yaygın çift kas ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Üç farklı yazılım kullanan Song et al., (2016), koyun MSTN çekirdek promotörünün, TATA kutusunu (156–165 bç'den oluşur) ve CAAT kutusunu (başlangıç kodonundan 202–207 pozisyonda) tanımlayabildikleri, başlangıç kodonunun 150 ile 220 bç yukarısındaki bölgeyle sınırlı olduğu sonucuna varmışlardır.

DNA İzolasyonu

Son yıllarda hücre, kıl ve kan gibi birçok farklı materyal kullanılarak genomik DNA elde edilmektedir. DNA elde etmek amacıyla bu materyalleri kullanarak birçok farklı ticari kit

geleştirilmiştir. Teknik olarak yöntem, önce, hücrelerin yoğun tuz solüsyonu muamalesi ile hücre zarlarının parçalanarak içindeki DNA, RNA ve proteinlerin serbest bırakılması, ardından proteinlerin, diğer safsızlıklar ve RNA'ların uzaklaştırılarak DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesine dayanır.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA üzerinde ilgilendiğimiz özgül bir bölgenin, invitro koşullarda çok sayıda kopyasını elde ettiğimiz bir yöntemdir. Bu yöntemin dayandığı üç ana basamak bulunmaktadır (Mullis, 1990). Bunlar;

Ayrılma (Denaturation): Kalıp DNA'yı 1-5 dk arasında süre ile 92-95 °C ye maruz bırakarak çift sarmal yapısını bozup, tek zincir haline getirilir. Bu sayede bir sonraki basamağa hazırlanır. Bazı durumlarda PCR işleminde çift zincirli DNA'yı ayırmak için bir ön ayırma işlemi olan pre-denaturation için süre 5-10 dk arasında değişen daha uzun süre sıcaklığa maruz bırakılan işlem uygulanabilmektedir ((Mullis, 1990; Watson et al., 1992).

Yapışma (Annealing): Bu basamak 55-72 °C de 30-60 sn süre ile gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında ayrılan tek zincirlere, sentezlenen olügonükleotid primerler tanıdıkları bölgelere yapışırlar (Innis and Gelfand, 1990). Bu basamakta sıcaklığı ayarlarken sitozin ve guanin bazlarının toplamının dört katı ile adenin ve timin bazlarının iki katlarının toplamı primerin bağlanma sıcaklığını vermektedir. Bazı literatürde Primerlerin Tm sıcaklıklarının 5 °C altındaki sıcaklıkların uygun olacağını söylemektedir (Innis and Gelfand, 1990). Primerleri sentezletirken dikkat etmemiz gereken en önemli faktör birbirlerinin tamamlayıcıları olmamaları yani dimer oluşturmamaları gerekmektedir (Mullis, 1990).

Uzama (Extension): Bu basamakta bağlanan primerler, 72 °C' de 1-5 dk sürede, Taq polimeraz enzimi ile serbest halde bulunan dNTP bazlarını ekleyerek ilgilendiğimiz bölgenin tamamlanmasını sağlamaktadır. Bu işlemin genel olarak 72°C'de yapılmasının sebebi PCR karışımına eklediğimiz DNA'nın uzamasını sağlayan Taq DNA polimeraz'ın bu sıcaklıkta en iyi çalışmasıdır (Erlich et al., 1991). Bu üç temel basamak bir PCR'da genellikle 35 kez tekrarlanır ve sonucunda milyonlarca kopya oluşturur. Bütün döngüler tamamlandıktan sonra bütün parçaların uzadığından emin olmak için son uzama (Final Extension) denilen bir basamak gerçekleştirilir (Mullis, 1990).

Restriksiyon Endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazlar, çift iplikli kısa DNA dizilerini özgül bölgelerden tanıyan ve bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden keserek, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan DNA dizisinin çıkarılmasında etkin rol alan enzimlerdir (Bulut ve Doymaz 2001; Eroğlu 2008). Günümüzde 230'dan fazla DNA dizilimini tanıyıp kesen 3000'den fazla Restriction Endonükleaz enzimlerinin varlığından söz edilmektedir (Murray, 2000).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

RFLP, ilk olarak, spesifik nükleotid dizileri olan yerlerde DNA'yı kesen bakteriyel kısıtlama enzimlerinin kullanımına dayanan DNA yapısının farklılıklarını görselleştirmek için 1980 yılında geliştirilmiştir (Mburu and Hanotte, 2005). Bu yöntem ilk kez insan genom çalışmalarında Botstein et al., (1980) tarafından 1980'lerde DNA belirteci olarak kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılmış hedef DNA bölgesi üzerinde, restriksiyon endonükleaz adı verilen DNA'yı belirli bölgelerden tanıyıp çift iplikliğini kesen enzimlerle, belirli sıcaklıkta belli sürelerde inkübasyona bırakılarak kesilmesi esasına dayanmaktadır (Van Mansfeld and Bos, 1992). Restriksiyon enzimlerince kesim sonucunda farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşabilir ve bu parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılırlar. Aynı enzim farklı bireylerde genetik yapıları birbirinden farklı olmasından dolayı değişik miktar ve uzunlukta parçalar oluşturmaktadır (Güz ve Kılınçer, 2012). Bu şekilde RFLP yöntemi PCR-RFLP yöntemi olarak adlandırılmakta ve PCR-RFLP'lerin tanımlanması için, farklı boyutlardaki DNA fragmanlarını ayırmak amacıyla jel elektroforezinin kullanılmasını gerektirmektedir. Yöntem, Restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası rutin ve hızlı bir şekilde genotiplemeye imkan sağlamaktadır (Agarwal et al., 2008; Piola et al., 1999). PCR-RFLP tekniği güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar veren bir teknik olmakla birlikte uygulaması kolay ve ekonomik olarak diğer moleküler yöntemlere karşı avantajlara sahip olarak görülmekte ve bu yüzden polimorfizm çalışmalarında daha fazla kullanılmaktadır (Özdemir ve Doğru, 2008).

Literatür Özetleri

Soufy et al., (2009), İran'daki Sanjabi koyunları üzerinde yaptıkları çalışmada, ekson 3'de miyostatin polimorfizminde 3 genotipi de gözlemleyerek, MM, Mm ve mm genotip frekanslarını sırasıyla %2.00, %1.33 ve %96.70 olarak ve allel gen frekanslarını M alleli için %3.00 ve m alleli için %97.0 olarak bildirmişlerdir.

Sjakste et al., (2011), 5'UTR'yi ve intron I'in bir kısmını kapsayan miyostatin (MSTN) gen bölgesi, koyun MSTN gen polimorfizmi hakkındaki verileri genişletmek ve yerel ırkın korunması için yararlı bilgiler sağlamak için iki Letonya Darkhead koyun sürüsünden DNA dizi analizi sonuçlarını elde ettikleri çalışmalarında, 5'UTR'de 2 ve intron I'de 4 farklı polimorfik lokus ortaya çıkarmışlardır.

Azari et al., (2012), 110 Dalagh koyunundan kalpain geni için tek zincirli konformasyon polimorfizmi (SSCP) yöntemi ve kalpastatin ve miyostatin genleri için RFLP yöntemi ile yaptıkları çalışmada, kalpastatin ve kalpain genleri polimorfik, miyostatin geni ise monomorfik olduğunu bildirmişlerdir.

Dehnavi et al., (2012), PCR-RFLP ve PCR-SSCP yöntemleri kullanılarak 200 baş Zel koyun ırkında MSTN polimorfizmini belirledikleri çalışmalarında, Ekson 3 bölgesi RFLP yöntemi ile *HaeIII* enzimi tarafından kesilirken, intron 1 ve 2 bölgeleri SSCP yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada RFLP yöntemi ile elde edilen tüm örnekler mm genotip gösterdiği ve monomorfik bulunduğu, SSCP yönteminde intron 1'de monomorfikken, intron 2'de polimorfik (AA, AB ve BB) olduğu, A ve B için allelik frekansların sırasıyla %75.5 ve %24.5 olduğu bildirilmiştir.

Jamshidi et al., (2014), 120 baş Mehreban koyun ırkında PCR RFLP yöntemi ile miyostatin gen ekspresyonunu potansiyel olarak değiştiren kodlama bölgesindeki mutasyonların analizini inceledikleri çalışmada, Mm ve mm genotiplerin sıklığı sırasıyla 0.53 ve 0.47 olarak bildirilmiştir. M ve m allel genlerinin frekansları sırasıyla 0.26 ve 0.74 olarak tahmin edilmiştir.

Akbari et al., (2015), yaptıkları araştırmada, kuzey Khorasan bölgesinde yetiştirilen 58 baş Kordi koyununda PCR-RFLP yöntemi ile Miyostatin geninin genotiplendirme çalışmalarında *HaeIII* restriksiyon enzimini kullanmışlardır. MSTN 3. ekzonundaki olası üç genotipten sadece iki Mm ve mm genotipinin frekanslarının sırasıyla 0.15 ve 0.85 olduğu gözlenirken, M ve m alelleri için allelik frekansı sırasıyla 0.08 ve 0.92 olarak tahmin edildiğini bildirmişlerdir.

Crispo et al., (2015), CRISPR/Cas9 sisteminin, kas gelişimini ve vücut büyümesini teşvik etmek amacıyla koyunlarda MSTN'i düzenlemek ve geni susturulmuş (KO:Knock-Out) hayvanlar oluşturmak için etkinliğini belirlemişlerdir. CRISPR/Cas9 mikro enjekte edilmiş zigotların (n=216) embriyo gelişimi, tampon enjekte edilen embriyolar (n=183) ve mikro enjekte edilmeyen embriyolar (n=173) ile karşılaştırıldığında, her iki mikro enjekte edilen grup için bölünme oranı daha düşük ($P<0.05$) ve enjekte edilen ortamdaki CRISPR/Cas9 içeriğinden

etkilenmediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak CRISPR/Cas9 sisteminin KO koyun genini oluşturmak için çok etkili bir araç olduğunu belirtmişlerdir.

Bozhilova-Sakova et al., (2016), Bulgaristan ırkı Karakaçan koyununda 22 koyun ve 3 koç olmak üzere 25 baş hayvanda PCR-RFLP yöntemi kullanılarak et özellikleri ile ilişkili miyostatin (MSTN) geninin allelik varyantlarını araştırmak ve belirlemek amacıyla yapılan araştırmada, toplam koyun popülasyonunda polimorfizme rastlanmadığını, MSTN lokusunun monomorfik bulunduğunu ve sadece mm genotipi tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Dimitrova et al., (2016), Kuzeydoğu Bulgar Merinos koyun ırkına ait 32 koçta PCR-RFLP yöntemi ile miyostatin geninin genotiplerini belirledikleri çalışmalarında, MM, Mm ve mm genotip frekanslarını sırasıyla %2.00, %1.33 ve %96.70 ve allel gen frekanslarını M alleli için %3.00 ve allel m için %97.00 olarak bildirmişlerdir.

Lazar et al., (2016), 105 baş Siyah Başlı Teleorman koyun ırkına ait kuzularda PCR RFLP yöntemi ile MSTN polimorfizmini belirlemek için yaptıkları çalışmada, mm ve Mm olmak üzere iki genotip tanımlamışlardır. Homozigot mm genotipi %16.67 iken Mm genotipi %83.33 ve M allel frekansını %42, m allel frekansını %58 olarak bildirmişlerdir.

Sahu et al., (2016), Madras Red (n=127), Mecheri (n=101) and Nilagiri (n=103) koyun ırklarında MSTN genine ait 5'UTR, intron 1 ve ekzon 1 bölgelerinde *MspI* ve *HaeIII* enzimleriyle PCR-RFLP yöntemi uygulayarak yaptıkları çalışmada, ilgili bölgelerin tüm ırklarda monomorfik yapıda bulunduğunu ve evrimsel olarak ırkların oldukça korunmuş olduklarını bildirmişlerdir.

Wang et al., (2016), Cas9 mRNA ve üç geni (MSTN, ASIP ve BCO2) RNA kılavuzları ile birlikte tek hücreli embriyolara enjekte ederek koyunlarda hassas gen hedeflemeyi başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Bu üç gendeki hedefleme verimlilikleri, üretilen kuzularda % 27-33 aralığındaydı ve üç geni aynı anda hedeflemenin % 5.6'sı, zigotların mikro enjeksiyonunun geni değiştirilmiş koyunlar oluşturmak için etkili bir yaklaşım olduğunu göstermişlerdir. MSTN geninin bozulmasının, genişlemiş miyofiberler ile karakterize edilen istenen kas hipertrofisine yol açtığını gözlemlemişlerdir. Böylelikle gen modifikasyonlarının hem genetik hem de morfolojik seviyelerde meydana geldiğini destekleyen ilk ayrıntılı kanıt sağlamışlardır. Bulgular, CRISPR/Cas9 yönteminin, ekonomik olarak önemli özelliklerden sorumlu olan birden fazla geni eşzamanlı olarak hedefleyerek çiftlik hayvanlarının iyileştirilmesi için güçlü bir araç olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Dimitrova et al., (2017), Bulgar Karnobat Merinos koyun ırkı üzerinde yaptıkları çalışmalarında, koyunlarda et verimliliği ile ilişkili CAST, MSTN ve CLPG genlerinin

polimorfik varyantlarını elde etmek amacıyla sırasıyla 622 bp, 337 bp ve 426 bp uzunluğunda PCR ürünleri elde etmişler, CAST geni için *MspI*, MSTN geni için *HaeIII* ve CLPG geni için *FaqI* restriksiyon endonükleazları kullanmışlardır. Çalışmada MSTN ve CLPG genleri monomorfik bulunurken, CAST geninin, allel M için 0.94 ve allel N için 0.06 allel frekansları ile polimorfik olduğu ve gözlenen genotip frekansları: MM genotipi için 0.89 ve genotip MN için 0.11 olduğu bulunmuştur, NN genotipinin gözlenmediği bildirilmiştir.

Kolenda et al., (2019), yaptıkları çalışmada Kamieniec ve Pomeranian koyun ırklarında c.*1232 pozisyonunda ve koyun MSTN geninin ilk intronundaki polimorfizmleri tespit etmek ve tespit edilen genotipler ile seçilmiş büyüme özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçlamışlardır. 56. günde vücut ağırlığı ve günlük kazançlar açısından MSTNA/MSTN-B, MSTN-B/MSTN-B ve MSTN-A/MSTN-A genotipleri arasında sadece Kamieniec grubunda, MSTN-A için homozigot hayvanlarda önemli farklılıklar bulunmuştur. Pomeranya koyunlarında MSTN genotiplerinin büyüme özellikleri üzerindeki istatistiksel etkisi doğrulanmamıştır. Sonuçlar, MSTN genotiplerinin ve allellerinin yaygınlığının ve etkisinin koyun ırkına göre değiştiğini göstermektedir. Çalışmada, bazı cinsler için MSTN geninin, büyüme özellikleri için bir genetik işaretleyici olabileceği sonucuna varmışlardır.

Sahu et al., (2019), Hindistan da yetiştirilen 103 baş Nilagiri koyun ırkındaki MSTN'nin 3.ekzon'da polimorfizmini ve bunun büyüme ile ilişkisinin saptanması için yapmış oldukları çalışmada, restriksiyon kesimi, dizileme ile teyit edilen ekson 3'te G5622C lokusunda tek bir nükleotid polimorfizmi ortaya çıkarmışlardır. Çalışmada MM genotipi 71, Mm genotipi 32, mm genotipi 0 frekansına sahipken, allel gen frekanslarını; M 0.689 ve m 0.311 olarak bildirmişlerdir. Yapılan ilişki analizi, MSTN geninin ekson 3'ün g.5622G>C lokusunda MM ve Mm genotipleri arasında ortalama doğum, sütten kesim, 6, 9 ve 12 aylık ağırlık ortalamaları açısından anlamlı bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur.

Grochowska et al., (2019), tarafından yapılan çalışmada ilk intron ve C1232G MSTN genindeki polimorfizmleri tanımlamak ve Renkli Polonyalı Merinos koyunlarında tespit ettikleri polimorfik genotipler ile karkas, et kalitesi ve biyometrik özellikler arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. Çalışmada beş allel gen (MSTN-A, MSTN-B, MSTN-C, MSTN-E ve MSTN-E1) tespit ederken, göğüs derinliği (canlı kuzu), kaburga üzerindeki yağ derinliği, sızıntı su kaybı, sübjektif et aroması ve rengi açısından önemli genotipik farklılıklar olduğunu, ağırlık, soğuk karkas randımanı, bacak derinliği (karkas), göz kası genişliği ve alanı, kas içi yağ içeriği, su tutma kapasitesi ve sübjektif et gevrekliği, lezzet ve renk, göğüs derinliği (canlı kuzu), kesim öncesi ağırlık, sıcak karkas ağırlığı için önemli allelik farklılıklar olduğunu bulmuşlardır. Sonuçlar, MSTN gen polimorfizmlerinin koyunlarda karkas kalitesi, et kalitesi ve biyometrik

özelliklerin markör yardımcı seleksiyon için önemli bir markörü olarak düşünülebileceğini önermişlerdir.

Bayraktar (2020), Irakta yetiştirilen 80 baş İvesi koçları üzerinde MSTN polimorfizmini belirlemek için yapmış olduğu çalışmada, MM ve mm genotiplerini belirlerken Mm genotipi gözlemleyemediğini bildirmiştir. Çalışmada, MM genotipi 0.15 ve mm genotipi 0.85 frekansında görülürken, M allel gen frekansı 0.07, m allel gen frekansı 0.93 olarak hesaplanmıştır.

Haren et al., (2020), Endonezya da Batur koyunlarında miyostatin (MSTN) genotipi ile büyüme ve karkas özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladıkları çalışmalarında, gözledikleri G>A polimorfizmine ait genotipik ve allel frekanslarını 0.552 GG, 0.379 GC ve 0.069 CC, allel gen frekanslarını 0.741 G ve 0.259 C olarak bildirmişlerdir. GC genotipi taşıyan kuzuların kesim öncesi ağırlığı, sıcak karkas ağırlığı, soğuk karkas ağırlığı, karkas uzunluğu ve toplam verimi (bel, omuz, bacak verimi ve but) GG genotipi taşıyanlara göre biraz daha fazla olarak görülürken, MSTN genotipinin karkas özellikleri üzerinde anlamlı bir etkisi bulunamamıştır ($P>0.05$).

Jyoti et al., (2020), yaptıkları çalışmada Malpura koyunlarındaki Miyostatin (MSTN) geninin tam dizisini karakterize etmek ve popülasyondaki genetik değişkenliğini incelemeyi amaçladıkları çalışmada, toplam 16 nükleotid değişimi tanımlanmışlardır. Bu 16 değişimden hiçbirisi eksonik bölgede gözlenmezken, 2'sinin promoterde, 3'ünün 5'UTR'de, 6'sının intron-1'de, 1'inin intron-2'de ve 4'ünün 3'UTR'de olduğu gözlenmiştir. Intron-1'de ikame c.373 ve 1189 A/G ve 3'UTR'de c.*202A/G ilk kez bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca, koyunlarda çift kaslanma için varsayılan mutasyonun (c.*1232A), Malpura popülasyonunda (c.*12132G) mevcut olmadığı bildirilmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırmanın hayvan materyalini Atatürk Üniversitesi, Gıda ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi (GHUAM), Koyunculuk Şubesi'nde yetiştirilen kayıtlı 135 baş, Erzurum iline bağlı özel işletmelerden 66 baş ve Bingöl iline bağlı özel işletmelerden 61 baş olmak üzere toplam 262 baş Morkaraman koyun ırkı oluşturmuştur. Çalışmanın çeşitli laboratuvar aşamaları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmada Buzdolabı (Arçelik), Hassas Terazı (Shimadzu), Vorteks (Yellow Line) Elektroforez sistemi (Biogen, Apelex, France, SN 280800), çeşitli amaçlar için kullanılan türlü cam malzemeler, Mikrodalga Jel Görüntüleme Sistemi (Bio Rad), Otomatik Termocycle Sistem (Bioner), Nanodrop (Thermo scientific), Santrifüj (Kubota), Spektrofotometre (Shimadzu), Saf Su Cihazı (Ateks), Fırın (Blueline), Otoklav gibi aletler ve cihazlar kullanılmıştır.

Yöntem

Hayvanlardan kan alımı

Atatürk Üniversitesi, Gıda ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Koyunculuk Şubesi'nde ve Erzurum ve Bingöl iline bağlı özel işletmelerde yetiştirilen 262 baş Morkaraman koyuna ait kan örnekleri, 10 ml'lik K3 EDTA(Etilen DiaminTetra-Asetik Asit)'lı vakumlu tüplere alınmış ve bu tüpler +4 °C buz kalıplarının bulunduğu numune taşıma çantaları ile işletmelerden Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarına taşınmıştır. Kan numunelerinin hangi hayvana ait olduğunu belirtmek için alınan her bir kan numunesine ait tüpler etiketlenmiştir.

Kullanılan çözeltiler

1. RBC (red blood cell)
2. Cell lysis
3. Protein precipitation
4. Etanol
5. İzopropanol
6. Dehidrasyon solusyonu
7. 1 X TBE Elektroforez / Jel Tampon Çözeltisi (10XTBE, Deiyonize bdH₂O)

8. 10 X TBE Elektroferez / Jel Stok Tampon Çözeltisi (Tris Borik Asit 0,5 M EDTA (pH 8,0) Deiyonize bdH₂O)

Genomik DNA izolasyonu

Morkaramanlardan elde edilen kan örneklerinden DNA İzolasyonu Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

1. Tüplere numara verilerek her numune için 2'şer ml'lik tüpler hazırlandı.
2. 900 µl RBC (red blood cell) solüsyonu eklenen tüplerin üzerine 300 µl kan eklenerek karışması için alt-üst edildi.
3. Oda ısısında 10-15 dakika bekletildi.
4. 1 dakika 15.000 g de santrifüj edilip süpernatant bir pipet ile tüp dibinde 5-10 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Süpernatantın homojenizasyonunu sağlamak için vortekslendi.
5. Homojenat üzerine 300 µl Cell lysis ve 100 µl Protein Precipitation ilave edilip vortekslendi ve daha sonra 2 dakika 15.000 rpm de santrifüj edildi.
6. 2. yeni bir tüp hazırlanarak üzerlerine 300 µl izopropanol eklendi. 1. tüpteki süpernatant 2. tüpe eklenerek alt üst edilip izopropanol ile karışması sağlandı.
7. DNA olan tüpler 13.000 g de 2 dakika santrifüj yapılarak süpernatant atıldı.
8. Attıktan sonra üzerine 300 µl %70'lik etanol eklendi.
9. Ardından 13.000 g de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atıldı.
10. 5-10 dakika tüplerin ağzı açık bir şekilde açık havada kuruması için bekletildi.
11. DNA miktarına göre 100-150 µl dehidrasyon solusyonu eklendi.
12. Etüvde 65 °C de 5 dakika bekletildi.
13. DNA'nın çözünmesi sağlandıktan sonra -20 °C de spektrofotometrik ölçüm anına kadar muhafaza edildi. Spektrofotometrik ölçüm sonucu istenilen düzeyde çıkmayan örnekler için genomik DNA izolasyon işlemleri tekrarlandı.

PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) işlemi

Genomik DNA'dan istenilen gen bölgesinin milyonlarca kopyasının çoğaltılması olarak görülen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) işleminde kullanılan primerler Tablo 2'de ve ilgili PCR programı Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 2. MSTN genine ait primer dizilimi

F: 5'-CCG GAG AGA CTT TGG GCT TGA-3'	(Smith et al., 1997)
R: 5'-TCA TGA GCA CCC ACA GCG GTC-3'	

Tablo 3. MSTN gen bölgesi için PCR programı

Sıcaklık	Süre	Döngü	Basamak
94 °C	5 dk	33 Döngü	Başlangıç
94 °C	45 sn		Ayrılma
59 °C	45 sn		Bağlanma
72 °C	45 sn		Uzama
72 °C	5 dk		Son uzama

PCR işlemi için 0,2ml'lik tüplere her bir genomik DNA örneklerinden her bir tüpe ayrı ayrı 3–5 μ l alınmış ve üzerine 3.75 μ l 10x Buffer, 1 μ l Primer R, 1 μ l Primer F, 1 μ l MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs, 2.4 μ l Tag P ve 12.5 μ l dH₂O mix karışımdan 20 μ l eklenmiştir ve tüpler flashing santrifüjleme ile santrifüj edilmiştir. Sonrasında tüpler dikkatlice PCR cihazına yerleştirilmiş ve Tablo 3'de belirtilen PCR programı PCR'a girilerek PCR işlemi uygulanmıştır.

PCR ürünlerinin gözlenmesi

PCR işlemi sonrasında amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için %1'lik agaroz jelde her bir PCR ürünü yürütülmüştür. Bu amaçla 80 ml'lik 1XTBE Tamponu içerisinde 0.80 gr agaroz, 3500 Watt 'da çalışan mikrodalga fırınında 4 dakika kadar bekletilmiştir. Daha sonra içerisine 3 μ l EtBr (%1'lik) damlatılarak karışması sağlanmıştır ve hazırlanan taraklı jel kabinine jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür. Döküldükten sonra 30 dakika polimerize olmaya bırakılmıştır. Tarakları çıkartılarak jel kuyucuklara 8 μ l aldıktan sonra parafin kâğıt üzerinde bulunan yükleme tamponu ile karıştırdıktan sonra otomatik pipet aracılığı ile yükleme yapılarak 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi ve 80 Watt 'da 20 dakika yürümeye bırakılmıştır. Daha sonra jeldeki bantları UV ışığı ile görüntülendi. Amplifikasyonu gerçekleşmiş olanlar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Restriksiyon enzimiyle DNA'ların kesimi

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA moleküllerinin 4-8 baz çifti (bç) arasındaki özgün bölgeleri tanıyarak kesen enzimlerle fragmanlara ayrılması ve elde edilen DNA parçalarının jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi işlemi RFLP (Restriksiyon Fragment

Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) olarak adlandırılmaktadır. Amplifikasyonu gerçekleştiren her bir MSTN PCR ürününden 10 µl alınıp 0.2 ml'lik steril ependorf tüplere konularak, üzerine 5 µl *HaeIII* RE enzimi, 5 µl Buffer R ve 2.4 µl Buffer Tango ilave edilmiştir, sonra üzerini kapatacak şekilde yaklaşık 5-10 µl kadar mineral oil ekledikten sonra 8-10 sn. kadar 1300 rpm'de flashing santrifüj yapılmıştır. Daha sonra inkübatöre yerleştirilerek 37 °C'de 7-12 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında % 2'lik agaroz jelde yürüterek UV'de görüntüsü alınmıştır.

Örneklerin yüklenmesi ve yürütme işlemi

HaeIII enzimi ile DNA'ların kesim işlemleri tamamlandıktan sonra, sonucunu gözlemlemek için; etüvden çıkarılan restriksiyon kesimi uygulanmış örneklerin her birine 3µl yükleme tamponu ilave edildi ve otomatik pipet yardımıyla tüm ürün tüpden alındıktan sonra parafin üzerinde gezdirildi ve daha önceden hazırlanan %2'lik agaroz jele ayrı ayrı yüklenerek 1XTBE tamponuyla doldurulmuş olan elektroforez tankına jel yerleştirildi. Daha sonra 45 volt 'da 90 dak süreyle elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforez işlemi sonrasında jel alınarak UV ışığı altında genotipleme amacıyla incelenmiştir.

Tablo 4. Allellerin ayrımı için kullanılan reaksiyonun bileşenleri

Bileşenler	Tek örnek için
PCR Ürünü	10 (µl)
10X Buffer	5 (µl)
Buffer Tango	3 (µl)
<i>HaeIII</i> enzimi (10U/µl)	6 U

Tablo 5. Restriksiyon enzimi, tanıma bölgesi ve beklenen bant uzunluğu

RE	PCR ürünü (bç)	Tanıma Bölgesi	Genotip ve Bant Büyüklüğü (bç)
			MM:254/83
<i>HaeIII</i>	337	5'-GG ⁺ CC-3'	Mm: 254/131/123/83 mm: 131/123/83

Verilerin analizi

Hardy-Weinberg Prensibi, evrim mekanizmalarının yokluğunda popülasyonun ulaşacağı genetik dengeyi ortaya koymaktadır. Yani Hardy-Weinberg Dengesi, bir popülasyonda göç, mutasyon ve seleksiyonun olmadığı, popülasyonun yeterli büyüklükte ve eşleşmelerin rastgele meydana geldiği koşulların sağlandığı takdirde gen ve genotip frekanslarının nesilden nesile sabit kalacağı anlamı taşımaktadır.

Bu denge test edilirken ilk başta genotip frekansları hesaplandıktan sonra genotip frekanslarından allel frekansları hesaplanır. Hesaplanan allel frekanslar kullanılarak genotip frekanslar tahmin edilir. Hardy-Weinberg denge eşitliği için genotiplerin beklenen değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$E(AA)=p^2n$$

$$E(AB) = 2pqn$$

$$E(BB) = q^2 n$$

Eşitlikte,

p: M allelinin frekansı

q: m allelinin frekansı

n: popülasyondaki birey sayısı

Genetikte gözlenen sapmaları değerlendirmek önemlidir. Başlangıçta beklenen değerler ile ölçülen değerler arasında gerçek bir fark olmadığı kabul edilerek H_0 hipotezi kurulur. İstatistiksel analizler ile bu hipotez test edilerek H_0 hipotezi ya reddedilir ya da kabul edilir. Eğer bu hipotez reddedilmişse beklenen orandan sapma sadece şansa bağlanmaz. Dolayısıyla istatistiksel analizler, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Bu teste, uyumun mükemmelliği (Goodness of fit) adı verilir. Sıfır hipotezinin mükemmellik uyumuna karar vermek ve gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için geliştirilen en basit istatistiksel testlerden biri olan Ki-kare (χ^2) analizi çalışmada kullanıldı. Ki-kare analizi eşitliği;

$$\chi^2 = \sum \frac{(G_i - B_i)^2}{B_i}$$

Eşitlikteki,

G_i : i kategori için gözlenen değeri,

B_i : i kategori için beklenen değeri,

Wright (1965)'ın F-istatistiği kullanılarak üç türlü kendilenme (fiksasyon indeksi) tahmin edilmiştir. Bunlar sırası ile F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} değerleri olup, aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır.

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} = 1 - \frac{H_I}{H_S}, \quad F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T} = 1 - \frac{H_I}{H_T}, \quad F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

F_{IS} eşitliğinde popülasyon içi fiksasyon indeksi (F_{IS}) tahmin edilir. Yani, popülasyon içerisindeki gerçek heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg genetik dengesindeki sapmanın

oranını vermektedir ve -1, +1 arasında değer alır. (- değer; heterozigot fazlalığını, + değer; heterozigot azlığını belirtir)

F_{IT} toplam tür içindeki HW dengesindeki sapmanın ölçüsü olarak değerlendirilir. F_{ST} de ırklar ya da popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın ölçütüdür. F_{ST} , 0 ile 1 arasında bir değer alır. F_{IT} ile popülasyonların tamamındaki toplam fiksasyon indeksi (F_{IT}) tahmin edilmektedir. Yani, tüm popülasyonun toplam gözlenen heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg prensibine göre olması gereken miktardan sapma olup olmadığını belirtir.

F_{ST} ile popülasyonlar arasındaki allel frekans farklılığından dolayı meydana gelen fiksasyon indeksindeki azalma tahmin edilmektedir. Aynı zamanda popülasyonlar arasındaki farklılığı da belirtmektedir.

İncelenen Morkaraman koyun ırkına ait MSTN lokusu allel gen ve genotip frekansları, genotip frekanslarına ait H-W genetik denge testi, popülasyona ait gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk düzeyleri, popülasyonlar içi (F_{IS}) ve popülasyonlar arası (F_{ST}) genetik farklılık değerlerinin istatistiksel analizi için, GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) paket programından yararlanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

DNA'nın Kantitatif Tayini

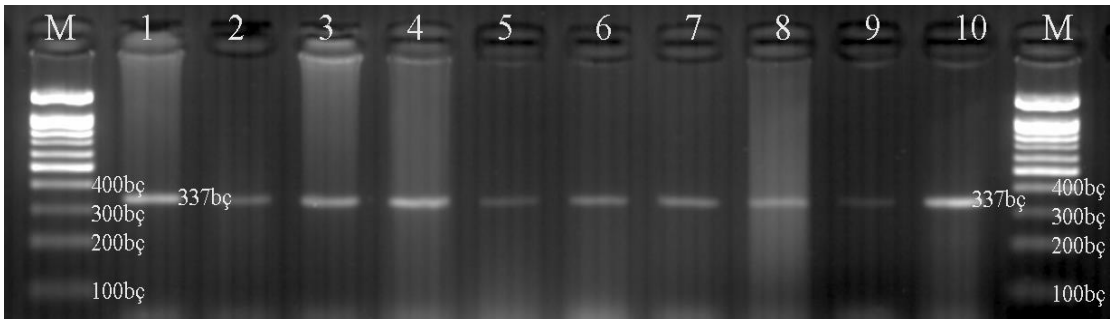
Ekstraksiyonu yapılmış olan DNA'ların yoğunlukları ve saflıkları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies İnç.) spektrofotometrede okuma yapılarak belirlenmiştir (Tablo 6)

Tablo 6. Bazı genomik DNA örneklerine ait kantitatif sonuçlar (260-280 ng/μl)

Tarih	Örnek No	Değer (ng/μl)
12.07.2021	1	1,649
12.07.2021	2	1,553
12.07.2021	3	1,782
12.07.2021	4	1,778
12.07.2021	5	1,677
12.07.2021	6	1,583
12.07.2021	7	1,696
12.07.2021	8	1,730
12.07.2021	9	1,619
12.07.2021	10	1,946

PCR sonuçlarının gözlenmesi

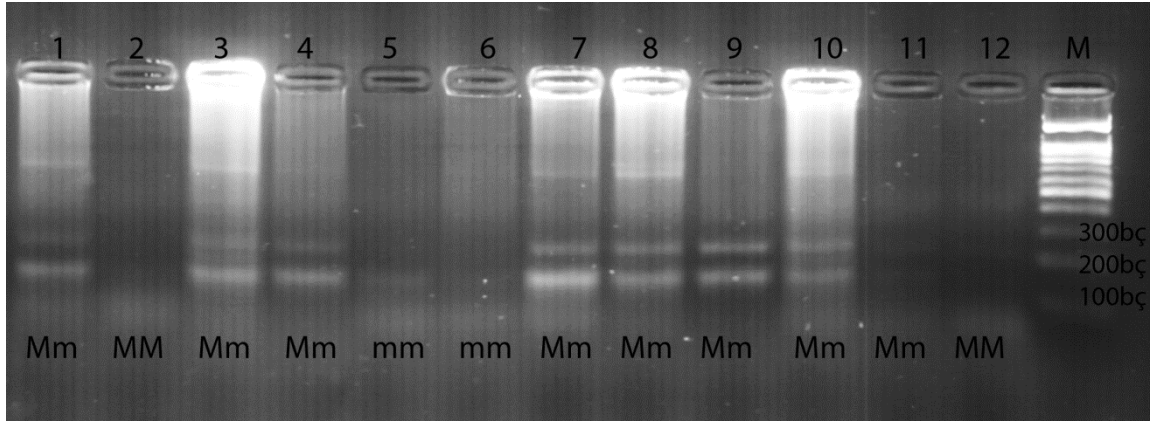
Morkaraman koyun kanlarından elde edilen DNA örneklerinin her birine PCR yapılarak %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve DNA bantları elde edilmiştir. Şekil 8'de PCR ürünlerine ait UV ışığı altındaki agaroz jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 8. PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görünümü (M:markör, 1.-10.MSTN:337 bç)

PCR-RFLP Sonuçları

Morkaraman ırkı koyunlardan elde edilen DNA örnekleri PCR cihazında çoğaltılmış ve *HaeIII* Restriksiyon Endonükleaz enzimiyle kesilmesiyle *MSTN* geni polimorfik bölgeleri tespit edilmiştir. Teorik olarak; MM:337/83 bp, mm:131/123/83 bp ve Mm:254/131/123/83 bp uzunluğunda bantlar vermektedir. Şekil 9’de UV ışığı altında PCR-RFLP sonucuna ait örnek bir agaroz jel görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 9. *MSTN* genine ait PCR-RFLP Jel görüntüsü: MM;254/83 bp, Mm;254/131/123/83 bp, mm;131/123/83 bp

Gen ve Genotip Frekansları ile Genetik Denge Testi Sonuçları

Araştırmada *MSTN* geni polimorfik bölgesi üzerinde *HaeIII* enzimi kesim bölgesine ait 3 farklı genotip MM, Mm ve mm tanımlanmıştır. Tespit edilen genotipler ve allel gen frekansları Tablo 7’de, Hardy-Weinberg Genetik Denge Testi ve X^2 bağımsızlık testi sonuçları Tablo 8’de sunulmuştur.

Tablo 7. Morkaraman ırkı *MSTN* geni Genotip ve Allel Gen Frekansları

Genotip	GHUAM		Erzurum özel işl.		Bingöl özel işl.		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
MM	12	8.9	10	15.2	7	11.5	29	11.1
Mm	79	58.5	42	63.6	43	70.5	164	62.6
mm	44	32.6	14	21.2	11	18.0	69	26.3
Allel Gen	M	m	M	m	M	m	M	m
Frekansı (%)	38	62	47	53	47	53	42	58

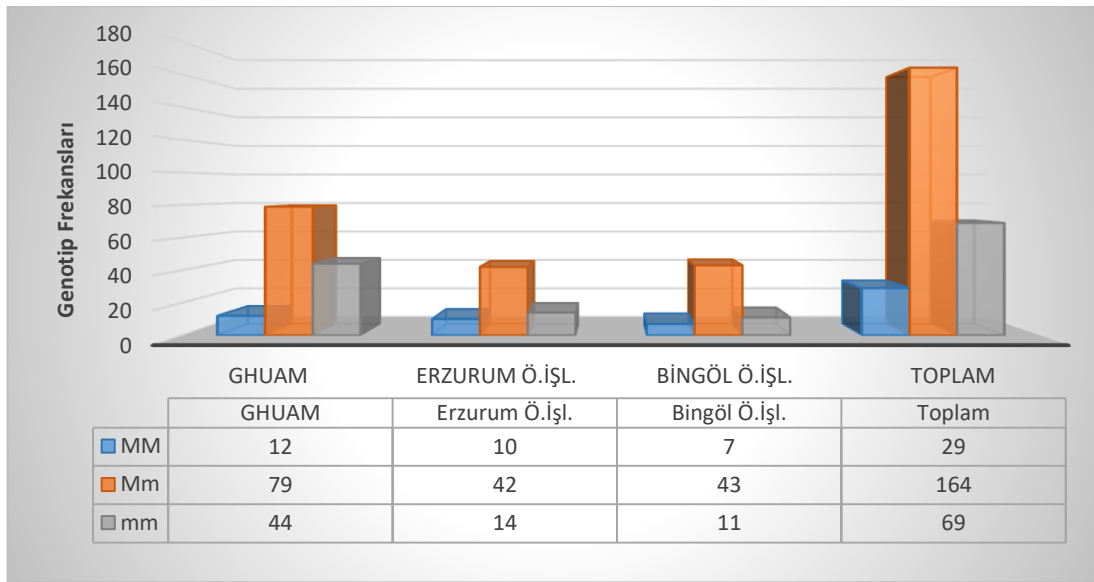
Popülasyon allel frekansları bakımından incelendiğinde Morkaraman koyun ırkında M allelinin 0.42 ve m allelinin 0.58 frekansında olduğu belirlenmiştir (Tablo 7). Irkta m allelinin yüksek frekansta görüldüğü gözlemlenirken, genel olarak 29 MM genotipi, 164 Mm genotipi ve 69 mm genotipine sahip hayvan belirlenmiştir. Alt sürülerde allel frekans üstünlüğünün ve genotip farklılığının değişmediği gözlemlenirken, MM, Mm ve mm genotipleri sırasıyla,

GHUAM koyunculuk işletmesinde %8.9, %58.5 ve %32.6, Erzurum özel işletmelerinde %15.2, %63.6 ve %22.1, ve Bingöl özel işletmelerinde %11.5, %70.5 ve %18.0 olarak elde edilmiştir (Tablo 7). Allel gen frekansları ve genotip frekansları değerlendirildiğinde MSTN geni bakımından sürülerde ayrı ayrı ve sürü genelinde heterozigot bireylerin fazla görüldüğü ve biyolojik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

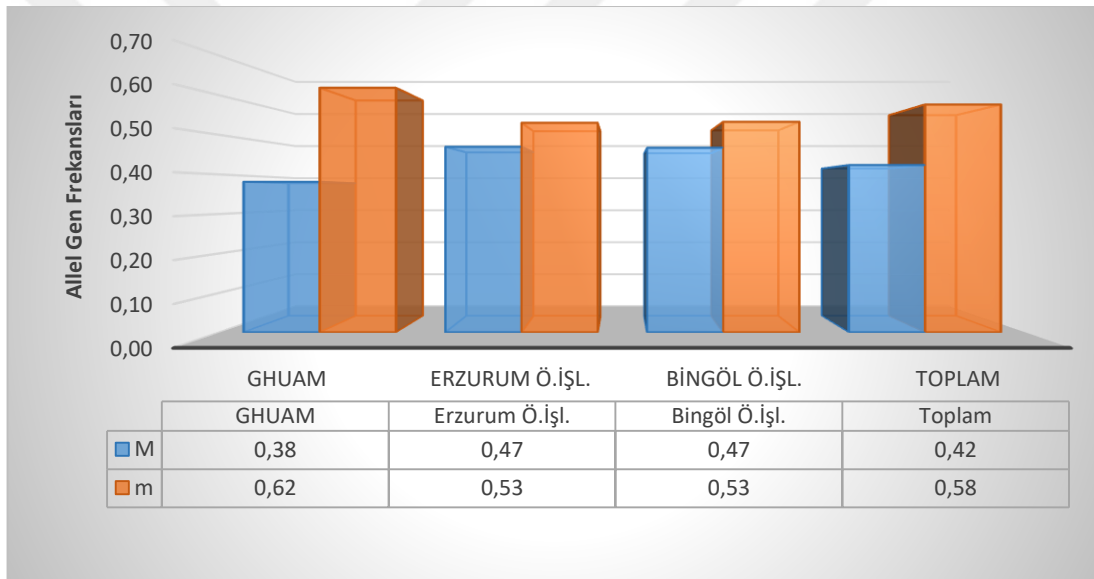
MSTN geni ile ilgili daha önce farklı koyun ırkları üzerinde, Dalagh koyun ırkının (Azari et al., 2012), Zel koyun ırkının (Dehnavi et al., 2012) ve Karakaçan koyun ırkının (Bozhila-Sakova et al., 2016) monomorfik bulunduğu; Mehreban koyun ırkının (Jamshidi et al., 2014), Kordi koyun ırkının (Akbari et al., 2015), Siyah Başlı Teleorman koyun ırkının (Lazar et al., 2016), Nilagiri koyun ırkının (Sahu et al., 2019) ve İvesi koyun ırkının (Bayraktar, 2020) sadece iki genotip ile polimorfik bulunduğu; Sanjabi koyun ırkının (Soufy et al., 2009), Bulgar Merinos koyun ırkının (Dimitrova et al., 2016) ve Batur koyun ırkının (Haren et al., 2020) üç genotip ile polimorfik bulunduğu bildirilmiştir. MSTN geni polimorfizmi belirten çalışmalarda, mm genotipinin MM genotipinden daha yüksek frekansta olduğu bildirilirken, yaptığımız çalışma ile uyumlu oldukları görülmüştür.

Çalışmalarda, M genine nazaran m geninin daha yüksek frekanslarda görüldüğü (Soufy et al., 2009; Jamshidi et al., 2014; Akbari et al., 2015; Dimitrova et al., 2016; Lazar et al., 2016; Bayraktar, 2020; Haren et al., 2020) ve çalışmamızdaki allel gen frekansları ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmaların sadece birinde (Sahu et al., 2019) M allel gen frekansının m allel gen frekansına nazaran daha yüksek bulunduğu ve çalışmanın yaptığımız çalışma ve diğer çalışmalardan farklılık gösterdiği görülmüştür.

Morkaraman koyun ırkı MSTN geni *HaeIII* polimorfizmine ait genotip frekansları Şekil 10'da, allel gen frekansları Şekil 11'de görülmektedir.



Şekil 10. Morkaraman koyun ırkı MSTN geni *HaeIII* polimorfizmine ait genotip frekansları



Şekil 11. Morkaraman koyun ırkı MSTN geni *HaeIII* polimorfizmine ait allel gen Frekansları

Morkaraman koyun ırkı MSTN geni *HaeIII* polimorfizmine ait Hardy-Weinberg genetik denge test sonuçları Tablo 8’de sunulmuştur.

Tablo 8. Hardy-Weinberg genetik denge testi sonuçları

İşletme	n	Gözlenen			Beklenen			X ² testi	P
		MM	Mm	mm	MM	Mm	mm		
GHUAM	135	12	79	44	19.6	63.7	51.6	7.78	**
Erzurum Özel	66	10	42	14	14.6	32.9	18.6	5.08	*
Bingöl Özel	61	7	43	11	13.3	30.4	17.3	10.55	**
Toplam	262	29	164	69	47.0	127.9	87.0	20.80	**

*:P<0.05, **:P<0.01

262 baş Morkaraman koyuna ait genotip frekansları dağılımının Hardy-Weinberg genetik denge testine göre dengede ($P < 0.01$) olmadığı saptanmıştır (Tablo 5). Morkaraman popülasyonuna ait alt sürülerde de durum değişmemiştir. Bu durum muhtemelen sürülerde ıslah yapılıyor olmasından ya da yapılan örnekleme hatasından kaynaklanmış olabilir.

Heterozigotluk Oranları ve Fiksasyon İndeksi

Popülasyonların heterozigotluk oranı ve fiksasyon indeksi değerleri, gözlenen ve beklenen heterozigotluklara göre hesaplanarak Tablo 9’da gösterildi.

Tablo 9. Popülasyonların MSTN geni polimorfik yapısı bakımından heterozigotluk oranları ve fiksasyon indeksleri

Populasyon	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}	F _{IT}
GHUAM	0.585	0.472	-0.240		
Erzurum Özel	0.636	0.498	-0.277	0.007	-0.303
Bingöl Özel	0.705	0.498	-0.416		
Genel	0.632	0.480	-0.312		

Morkaraman koyun sürüleri ayrı ayrı ve genel olarak incelendiğinde, ortalama gözlenen heterozigotluk değerlerinin beklenen heterozigotluk değerlerinden oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Popülasyon genelinde MSTN polimorfik bölgesi için gözlenen heterozigotluk değeri (Ho) 0.632, beklenen heterozigotluk değeri (He) 0.480 olarak hesaplanırken, sürüler bazında en düşük gözlenen heterozigotluk değeri GHUAM (0.585)’da tespit edilirken, bunu Erzurum (0.636) ve Bingöl Özel işletmeleri (0.705) izlemiştir (Tablo 9).

MSTN polimorfik gen bölgesi için popülasyon içerisindeki gözlenen heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg dengesindeki sapmanın oranını veren Popülasyon içi fiksasyon indeksi (F_{IS}) değeri; GHUAM popülasyonunda -0.242, Erzurum özel işletmeler popülasyonunda -0.277, Bingöl özel işletmeler popülasyonunda -0.416 ve tüm popülasyonda -0.312 olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre popülasyon içi ve popülasyon genelinde heterozigotluk düzeylerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Sürüler genelinde, toplam gözlenen heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg prensibine göre olması gereken miktardan sapma olup olmadığını ölçen F_{IT} değeri -0.303 olarak hesaplandı. Bu değerlere göre MSTN gen bölgesinde bulunan heterozigotluk oranı değerinin sıfıra yakın ve negatif olması nedeniyle yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın bir ölçütü olan F_{ST} değeri popülasyon genelinde 0.007, olarak bulunmuş ve bu değerlere göre MSTN gen bölgesi bakımından incelenen Morkaraman koyun popülasyonları arasında genetik farklılaşmanın önemli olmadığı ($P>0.05$) tespit edilmiştir.



SONUÇ

Atatürk Üniversitesi, Gıda ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Koyunculuk Şubesi'nde yetiştirilen 135 baş, Erzurum Özel işletmelerinden 66 baş ve Bingöl özel işletmelerinden 61 baş olmak üzere toplam 262 baş Morkaraman koyun ırkına ait kan örnekleri üzerinde, *PCR-RFLP* yöntemi kullanılarak, *MSTN* geni *HaeIII* polimorfizmine ait üç genotip (MM, Mm ve mm) tespit edilmiştir.

Popülasyondaki *MSTN* genine ait MM, Mm ve mm genotip frekansları sırasıyla %11.1, % 62.6 ve % 26.3, M allelinin frekansı 0.42 ve m allelinin frekansı 0.58 olarak tespit edilmiştir. Tüm popülasyonda *MSTN* geni için hesaplanan gözlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e) değerlerinden oldukça yüksek bulunmuştur. Fis değeri -0.312 olarak bulunurken, Fit değeri -0.303 olarak tespit edilmiştir. *MSTN* gen polimorfizmi açısından belirlenen genotip ve allel frekansları ırkın genotip çeşitliliğini ortaya çıkarmada yeterli olarak görülmüştür.

Bu tür çalışmalar yapılarak belirlenen polimorfizmin hayvanlara ait bazı performans özellikleriyle ilişkilendirmek suretiyle hayvan ıslahında kullanılabilirliğinin ortaya konması gerekmekte, çalışma sonuçlarının koyun yetiştiriciliğinde kullanılması ile ülke hayvancılığının geliştirilmesine yeni olanaklar sunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H., (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27: 617-631.
- Akbari, S., Dashab G., Alipanah M., Rokouei M., & Saghi D. (2015). Study on the polymorphism in myostatin gene and its association with growth traits in Kordi sheep of Northern Khorasan, *Modern Genetics Journal* 10: 129-133.
- Akbulut, Ö., (1986). İvesi x Morkaraman Melezlerinin Önemli Verim Özellikleri Üzerinde Araştırmalar (Yüksek lisans tezi). Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Erzurum.
- Akçapınar, H., & Kadak R., (1982). Bazı Faktörlerin Akkaraman ve Morkaramanlarda Gebelik Süresi ve Doğum Ağırlığı Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 29 (2- 4):392-400.
- Akçapınar, H., & Aydın, İ., (1984). Morkaraman Kuzularının Erzurum'da Özel Bir İşletmede Yarı Entansif Şartlarda Büyüme ve Yaşama Gücü. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 31(1):128-136.
- Akyüz, B., Arslan, K., & İlgar, E.G., (2017). Türkiye'de yetiştirilen Anadolu mandalarında butirofilin (BTN1A1) gen polimorfizminin HaeIII restriksiyon enzimi ile araştırılması. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* 14(1): 11-16.
- Allais, S., Leveziel, H., Payet-Duprat, N., Hocquette, J.F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C., Journaux, L., Bonnot, A., & Renand, G., (2010). The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J. Anim. Sci.* 88, 446–454. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2385>.
- Anonim, (2014). <https://www.slideserve.com/kyle-dennis/the-fertile-crescent-mesopotamia>
- Anonim, (2020). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-Aralik-2020-37207>
- Anonim, (2021). <https://www.celikors.com/2021/05/koyun-irklari-morkaraman.html>
- Anonymous, (2019). FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>
- Ateş, C.T., Arslan, M., & Yılmaz, O., (2003). Morkaraman ve Dorset Down x Morkaraman F1 Kuzuların Doğum Ağırlığı ve Yaşama Gücü ile Doğuran Koyun Başına Doğan Kuzu Sayısı ve Gebelik Süresine Bazı Faktörlerin Etkisi. *Turk J. Vet. Animal Sci.*, 27: 1311-1318.
- Aytuğ, C.N., Yalçın, B.C., Alaçam, E., Türker, H., Özkoç, Ü., & Gökçen, H. (1990). Koyun Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. *Tüm Vet. Hay. Hizmetleri Yay: 2* İstanbul. 302.
- Azari, M.A., Dehnavi, E., Yousefi, S. & Shahmohamadi, L., (2012). Polymorphism of calpastatin, calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran. *Slovak J. Anim Sci*, 12,1-6, 2012. DOI: 10.1155/2012/472307.
- Baş, S., Özsoy M.K., & Vanlı, Y., (1986). Koç Katımı Öncesi Farklı Sürelerde Yemlemenin Koyunlarda Döl Verimine, Kuzularda Büyüme ve Yaşama Gücüne Etkileri. *Doğa Tr. Vet. ve Hay. Dergisi*, 10 (3): 221-234
- Bayraktar, M., (2020). Determination of MSTN gene polymorphism in the Iraqi Awassi sheep. *International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)*, 7(10):1918-1920.

- Bilgin, Ö.C., Esenbuğa, N., Macit, M., & Karaoğlu, M., (2004). Genetic and Environmental Aspects of the growth curve characteristics in Morkaraman and Awassi sheep. *Appl. Anim. Res.*, 26: 7-12.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., & Davis, R.W., (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Bozhilova-Sakova, M., Dimitrova, I., Teneva, A. & Petrov, N., (2016). PCR-RFLP analysis of MSTN gene in Karakachan sheep breed. *Bulg. J. Agric. Sci.* 22 (Suppl. 1): 115–117
- Bulut Y & Doymaz MZ., (2001). Uygulamalı moleküler Biyoloji. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve mikrobiyolojideki önemi, Nobel Tıp Kitapevi, Ankara s. 109-122
- Can, M., (2018). Türkiye Hayvancılık Politikalarının AB ile Etkileşimi ve Olası Sonuçları, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 13(2): 242-250
- Crispo, M., Katır, A.P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., & et al., (2015). Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes 2015 25 Ağu; 10(8): e0136690. doi:10.1371/journal.pone.0136690. eCollection 2015.
- Dayıoğlu, H., Esenbuğa, N., Yaprak, M., Kopuzlu, S., Karaoğlu, M., & Macit, M., (1998). Morkaraman ve Tuj resiprokal melezlemesinde sürü verimliliği üzerine mukayeseli araştırmalar. Doğu Anadolu Tarım Kongresi, 14-18 Eylül 1998. (Bildiri Kitabı) Erzurum. 912-921.
- Dehnavi, E., Ahani M., Saeed, A., Mohammad H., Nassiry, R., Mohajer, M., Ahmadi, A.K., Shahmohamadi, L., & Yousefi. S., (2012). Polymorphism of Myostatin Gene in Intron 1 and 2 and Exon 3, and Their Associations with Yearling Weight, Using *PCR-RFLP* and *PCR-SSCP* Techniques in Zel Sheep, *Biotechnol Res Int.* Doi:10.1155/2012/472307.
- Dimitrova, I., Bozhilova-Sakova M., & Iliev, M., (2017). Study of some genes associated with meat productivity in Karnobat Merino sheep breed using PCR-RFLP. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 10(8) ver. III (August 2017), 61-65.
- Dimitrova, I., Bozhilova-Sakova, M., Stancheva, N. & Tzonev, T., (2016). Molecular Analysis of Ovine Myostatin Gene (MSTN) in Northeast Bulgarian Merino Sheep Breed Using PCR-RFLP Method. *Bulg. J. Agric. Sci.* 22(2):315-317.
- Doğru, Ü. & Özdemir, M., (2002). Sığırlarda Süt Protein Polimorfizmi'nin Anlam ve Önemi. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 33(4): 457-464,
- Dulkadir, H., (1985). Sarıkeçililer. Beşinci Milletler Arası Türkoloji Kongresi İstanbul, 23-28 Eylül 1985 İstanbul. (http://turkoloji.cu.edu.tr/CUKUROVA/sempozyum/semp_2/dulkadir.pdf)
- Eliçin, A., & Okuyan, R., (1975). Entansif Besiye Alınan 7-8 Aylık Anadolu Merinosu ve Akkaraman Kuzuların Karkas Özelliklerine Farklı Enerji Düzeylerinin Etkileri Üzerinde Araştırmalar. *Ankara Üniv. Zir. Fak. Yıllığı*, 25 (3): 548- 562.
- Eliçin, A., Geliyi, C., Ertuğrul, M., Cengiz, F., İlaslan M., & Aşkın, Y., (1989). Tuj Kuzularının Değişik Miktarlarda Kesif Yem ile Desteklenen Merada Besi Gücü ve Karkas Özellikleri. *Ankara Üniv. Zir. Fak. Yıllığı*, 40 (1-2): 335-345.
- Emsen, E., Diaz C.A.G., Yaprak, M., Köyceğiz, F., Kutluca, M., & Emsen, H., (2008). Kuzu Büyüme Performansı ve Yaşama Gücü Üzerine Irklararası Embriyo Transferinin Etkisi. *Reprod. Dom. Anim.* Doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01200.x.

- Erlich, H.A., Gelfand, D., & Sninsky, J.J., (1991). Recent advances in the polymerase chain-reaction. *Science*, 252:1643-1651.
- Eroğlu F., (2008). Kutanoz leiyşmanyozlu hastalarda etken türlerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Esenbuğa, N., & Dayıoğlu, H., (2002). İvesi ve Morkaraman Koyunlarının Döl Verim Özelliklerine Kimi Çevre Faktörlerinin Etkileri. *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, 26: 139-143.
- Esenbuğa, N., Dayıoğlu H., Karaoğlu M., Kopuzlu S., & Macit M., (1998). Morkaraman, İvesi Kuzuların Erken Damızlıkta Kullanılmasının Sürü Verimliliği Bakımından Değerlendirilmesi (2. Koçaltı koyun başına döl verim özellikleri). Doğu Anadolu Tarım Kongresi, 14-18 Eylül 1998. (Bildiri Kitabı) Erzurum. 894-903.
- Esenbuğa, N., Macit, M., Karaoglu, M., Aksakal, V., Aksu, M.I., Yoruk, M.A. & Gul, M., (2009). Effect of breed on fattening performance, slaughter and meat quality characteristics of Awassi and Morkaraman lambs. *Livest. Sci.* 123, 255-260
- Fernandez, G.M., Gutierrez-Gil, B., Sanchez, J. P., Moran, J. A., Garcia-Gamez, E., & Alvarez, L., (2011). The role of bovine causal genes underlying dairy traits in Spanish Churra sheep. *Animal Genetics*, 42: 415–420.
- Geliyi, C., & İlaslan, M., (1978). Kars İli Karacaören Köyünde Yetiştirilen Morkaramanların Döl, Süt ve Yapağı Verimleri. Kars Deneme ve Üretim İstasyonu Müdürlüğü Yayın No: 4, Kars.
- Grochowska, E., Borys, B., Lisiak, D., & Mroczkowski, S., (2019). Genotypic and allelic effects of the myostatin gene (MSTN) on carcass, meat quality, and biometric traits in Colored Polish Merino sheep. *Meat Science*, 151:4-17. doi: 10.1016/j.meatsci.2018.12.010.
- Güz, N., & Kılınçer, N., (2012). Böcek sistematğinde moleküler markörlerin kullanımı. *Türk. Entomol. Bül.*, 2 (2): 125-145.
- Haren, H.I.H., Purwantini D., Sumaryadi M.Y., & Prayitno. (2020). Short Communication: polymorphism at third exon of the myostatin gene and its association with growth and carcass traits in Batur sheep. *Biodiversitas*, 21 (5): 2074-2078, Doi: 10.13057/Biodiv/D210534
- Hillis, D.M., & Moritz, C., (1990). An overview of applications of molecular systematics. In: Hillis DM, Moritz C, eds. *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 502–515
- Innis, M.A., & Gelfand, D.H., (1990). Optimization of PCRs. In: *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications* (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. Eds.), J. Academic Press. pp. 3-12, San Diego, CA.
- Jamshidi, S., Karani S. and Goudarzi, M., (2014). Study polyporphism myostatin gene in Mehraban's sheep using PCR-RFLP method. *Sci,Int (Lahore)*, 26(3): 1129-1135.
- Jyoti, Akram N., Kumar, R., Sharma, R.C., Kashyap, S.K., & Gowane, G.R., (2020). Molecular characterization of myostatin gene in Malpura sheep of Rajasthan.- *Genetika*, Vol 52, No.2, 465-476
- Karaca, O., Altın, T., & Okut, H., (1996b). Köylü İşletmelerde Karakaş Koyunları Canlı Ağırlık Değişimlerine İlişkin Kimi Parametre Tahminleri. *Y.Y. Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6 (3): 59-72.

- Karaca, O., Aşkın, Y., Cemal, İ., & Çivi, A., (1996a). Doğu Anadolu Göreneksel Koyun Yetiştirme sistemlerinin Çağdaş Islah programları bakımından potansiyelleri. Hayvancılık'96 Ulusal Kongresi, 18-20 Eylül 1996, Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir.
- Kawabata, M., & Miyazono, K., (1999). Signal transduction of the TGF- β superfamily by smad proteins. The Journal of Biochemistry, Volume 125, Issue 1, Pages 9-16, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022273>
- Kaymakçı, M., Eliçin, A., Tuncel, E., Pekel, E., Karaca, O., Işın, F., Taşkın, T., Aşkın, Y., Emsen, H., Özder, M., Selçuk, E., & Sönmez, R., (2000). Türkiye'de küçükbaş hayvan yetiştiriciliği. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, 17-21 Ocak 2000, Ankara.
- Khatkar, M. S., Thomson, P. C., Tammen, I. and Raadsma, H. W. (2004). Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. Genet. Sel. Evol., 36:163-190
- Kolenda M., Grochowska E., Milewskib S., Mroczkowskia S., (2019). The association between the polymorphism in the myostatin gene and growth traits in Kamieniec and Pomeranian sheep breeds. Small Ruminant Research , 177 : 29-35
- Küçük, M., Öztürk Y., & Bayram D., (2000). Yarı Entansif Şartlarda Hamdani, Karagül, ve Morkaraman Koyunlarının Süt Verimi Özelliklerinin Karşılaştırılması. Y.Y.Ü. Veteriner Fak. Derg., 11 (1): 44-48.
- Lazar, C., Gras, A.M., Rotar, M.C., Pistol, G.C., Pelmus, R.S., & Ghita, E., (2016). Identification of Myostatin gene polymorphism using PCR-RFLP for improving carcass meat evaluation of Teleorman Black Head lambs. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies 49: 63-68.
- Macit, M., & Aksoy, A., (1996). Atatürk Üniversitesi Tarım İşletmesinde Yetiştirilen İvesi ve Morkaraman Koyunlarının Yarı Entansif Şartlarda Bazı Önemli Verim Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması. TÜBİTAK, Tr. J. of Vet. and Anim. Sci., 20:465-470.
- Macit, M., (2002). Growth and carcass characteristics of male lambs of the Morkaraman breed. Small Rumin. Res. 43, 191-194.
- Mburu, D. & Hanotte, O., (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI Biodiversity project A manual prepared for the IAEA/ILRI training course on molecular characterisation of small ruminant genetic resources of Asia, October- December 2005, ILRI, Nairobi, Kenya.
- McPherron, A. C., Lawler A.M., & Lee, S.J., (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF beta super family member. Nature, 387: 83-90.
- Meuwissen, T.H.E., & Goddard, M.E., (1996). The use of marker haplotype in animal breeding schemes. Genetic selection Evolution 21: 467-477.
- Mullis, K.B., (1990). The unusual origin of the polymerase chain-reaction. Scientific American, 262:56-61.
- Murray, N.E., (2000). Type I restriction systems: Sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64:412-434.
- Özcan, L., (1989). Küçükbaş Hayvan Yetiştirme-II. Çukurova Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları No:108, 288-289. Adana.
- Özdemir, M., & Doğru, Ü., (2008). Sığırların Verim Özellikleri Üzerine Etkili Önemli Moleküler Markörler. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 39 (1), 127-135, ISSN : 1300-9036

- Özsoy, M.K., & Vanlı, Y., (1985). Merinos, Morkaraman, İvesi Irkları İle Bunların İki İrk ve Üç İrk Melezlerinin Koyun Verim Özellikleri Bakımından Değerlendirilmesi. TÜBİTAK VHAG: 626. Erzurum.
- Özsoy, M.K., (1980). Merinos ve Morkaraman Irklarıyla Bunların Melezlerinin Döl Verimi, Kuzu Yaşama Gücü, Büyüme Özellikleri ve İlk İrkin Yapağı Verimi Bakımından Karşılaştırılması. 1982 TÜBİTAK VII. Bilim Kongresi, VHAG Tebliğleri 29 Eylül - 3 Ekim 1980 İstanbul, TÜBİTAK Yayınları: 555, VHAG Serisi: 19: 391-400.
- Peakall, R., & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28:2537-9.
- Pekel, E., (2002). Türkiye hayvancılığında ıslah hedefleri ve stratejileri. Erişim: [http://www.cu.edu.tr/fakulteler/zf/zb/bilgi/trislahhe def.asp]
- Piola, F., Rohr, R., & Heizmann, P., (1999). Rapid detection of genetic variation within and among in vitro propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. *Plant Science*, 141: 159-163.
- Rodgers, B.D., & Garikipati, D.K., (2008). Clinical, agricultural and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocr Rev* 29, 513–534.
- Ron, M, & Weller, J.I., (2007). From QTL to QTN identification in livestock-winning by points rather than knock out: a review. *Animal Genetics*, 38, 429–439.doi:10.1111/j.1365-2052.2007.01640.x
- Saçlı, Y., (2007). AB'ye Uyum Sürecinde Hayvancılık Sektörünün Dönüşüm İhtiyacı. DPT Uzmanlık Tezleri. Yayın No: DPT 2707.
- Sahu, A.R., Jeichitra, V., Rajendran, R., & Raja, A., (2016). Genetic Polymorphism of Myostatin (*MSTN*) Gene in Sheep Breeds. *Journal of Animal Research*, 6 (1): 81-84.
- Sahu, A.R., Jeichitra, V., Rajendran, R., & Raja, A., (2019). Novel report on mutation in exon 3 of myostatin (*MSTN*) gene in Nilagiri sheep: an endangered breed of South India, 2019 Sep;51(7):1817-1822. doi: 10.1007/s11250-019-01873-7. Epub 2019 Apr 3.
- Sjakste, T., Paramonova, N., Grislis, Z., Trapina, I., & Kairisa, D., (2011). Analysis of the single-nucleotide polymorphism in the 5' UTR and part of intron I of the sheep *MSTN* gene. *DNA and Cell Biology*, 30(7), 433–444 DOI: 10.1089/Dna.2010.1153
- Smith, T.P., Lopez-Corrales, N.L., & Kappes, S.M., (1997). Myostatin maps to the interval containing the bovine *mh* locus. *Mamm. Genome*. 8:742-744.
- Song, X.C., Xu, C., Yue, Z.G., Wang, L., Wang, G.W., & Yang, F.H., (2016). Bioinformatic analysis based on the complete coding region of the *MSTN* gene within and among different species. *Genet Mol Res*. 2016;15. https://doi.org/10.4238/gmr.15025031.
- Soufy, B., Mohammad Abadi, M. R., Shojaeian, K., Baghizadeh, A., Ferasaty, S., Askari N. & Dayani, O., (2009). Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Reserches Tabriz Univ.*, 19(1): 81-89
- Şahin, A., Ulutaş, Z., Yıldırım, A., Şirin, E., & Aksoy, Y., (2011). Türkiye Hayvancılığı. GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 2011, 28(2), 159-169.
- Tambasco, D.D., Paz, C.C.P., Pereira, AP., Alencar, MM., Freitas, A.R., Coutinho, L.L., Packer, I.U., & Regitano, L.C.A., (2003). Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses. *J. Anim. Breed. Genet.* 120 (2003), 51–56
- Tanrıverdi, F., (1976). Atatürk Üniversitesi Morkaraman Koyunlarında Vücut Ölçüleri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Dergisi Cilt: 7, Sayı: 2. Güneş Matbaacılık T. A. Ş., İstanbul.

- Uluslan H.O.K., & Aksoy A.R., (1996). Kafkas Üniv. Veteriner Fakültesi Çiftliğinde Yetiştirilen Tuj ve Morkaraman Koyunlarının Verim Performansları. II. Büyüme ve Beden Ölçüleri. Kafkas Üniv Vet. Fak. Dergisi, 2(2): 139–146.
- Van Mansfeld, A.D. & Bos, J.L., (1992). PCR-based approaches for detection of mutated ras genes. PCR Methods Appl, 1:211-216.
- Vanlı, Y., (1976). Atatürk Üniversitesi Sürüsünde Yapağı ve Süt Verimi Özelliklerinin Fenotipik ve Genetik Parametre Tahminleri. Atatürk Üni. Zir. Fak. Dergisi, 7 (2): 93–117.
- Wakchaure R., Ganguly, S., Praveen P.K., Kumar A., Sharma S. & Mahajan T. (2015). Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review, Journal of Drug Metabolism and Toxicology. 6 (5), 1000e127. doi:10.4172/2157-7609.1000e127
- Wang, X., Niu Y., Zhou J., Yu, H., Kou Q., Lei, A., Zhao, X., Yan, H., Cai B., Shen O., & et al., (2016). Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. Sci. Rep. 6:32271. doi: 10.1038/srep32271.s
- Watson, J.D., Gilman, M., Witkowskii J., & Zoller, M., (1992). The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA. pp. 79-98, New York
- Yalçın, B.C., (1987). Türkiye Koyun Irkları ve Koyunculuğun Islahı Konusundaki Çalışmalar. Koyun Yetiştirme ve Hatalıkları Sempozyumu, 11-12 Mayıs 1987, Konya.
- Yaprak M., (1997). Kesimden Altı Hafta Önce Farklı Rasyonlarla Entansif Besiye Alınan Morkaraman ve Tuj Kuzularının Besi Performansı, Kesim, Karkas ve Duyusal Özellikleri (Yayınlanmamış Doktora Tezi). Atatürk Üniv. Fen. Bil. Ens., Zootekni Anabilim Dalı. Erzurum.
- Yılmaz, O., Karaca, O., İnce, D., Cemal, İ., Yaralı, E., Varol, M. & Sevim, S., (2014). Batı Anadolu göçer koyunculuğu ve ıslah planlamalarındaki rolü, Tekirdağ Ziraat Fak. Derg., 11: 89-97.
- Zeder, M.A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean basin: Origins, diffusion, and impact. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(33), pp.11597–11604.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Esranur SAYGILI
Lise:	Erzurum Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Biyometri ve Genetik Bilim Dalı (2021)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta

