

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANTALYA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN SİYAH ALACA SÜT
SIĞIRLARINDA CVM (KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON)
KALITSAL HASTALIĞININ ALLELE ÖZGÜ PCR (ALLELE-SPECIFIC; AS-
PCR) YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Murat Gökçe EREN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOOTEKNİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**ANTALYA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN SİYAH ALACA SÜT
SIĞIRLARINDA CVM (KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON)
KALITSAL HASTALIĞININ ALLELE ÖZGÜ PCR (ALLELE-SPECIFIC; AS-
PCR) YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Murat Gökçe EREN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOOTEKNİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTALYA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN SİYAH ALACA SÜT
SIĞIRLARINDA CVM (KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON)
KALITSAL HASTALIĞININ ALLELE ÖZGÜ PCR (ALLELE-SPECIFIC; AS-
PCR) YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

Murat Gökçe EREN

ZOOTEKNİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2014.02.0121.016 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ŞUBAT 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN SİYAH ALACA SÜT
SIĞIRLARINDA CVM (KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON)
KALITSAL HASTALIĞININ ALLELE ÖZGÜ PCR (ALLELE-SPECIFIC; AS-
PCR) YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Murat Gökçe EREN
ZOOTEKNİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 06/02/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU
Dr. Öğr. Üyesi Taki KARSLI
Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Nuri ÖZSOY

ÖZET

ANTALYA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN SİYAH ALACA SÜT SIĞIRLARINDA CVM (KOMPLEKS VERTEBRAL MALFORMASYON) KALITSAL HASTALIĞININ ALLELE ÖZGÜ PCR (ALLELE-SPECIFIC; AS- PCR) YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Murat Gökçe EREN

Yüksek Lisans Tezi, Zootečni Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Şubat 2019; 25 sayfa

Bu çalışmanın amacı, Antalya ilinde yetiştirilen Siyah Alaca süt sığırlarında CVM (Kompleks Vertebral Malformasyon) kalıtsal hastalığının Allele Özgü PCR (Allele-Specific; AS-PCR) yöntemi kullanılarak belirlenmesidir. Bu amaçla Antalya Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğine üye işletmelerden ve aynı şekilde birliğe üye Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Sığırcılık ünitesinde bulunan hayvanlar dan elde edilen toplam 200 örnekte CVM hastalığının varlığı araştırılmıştır. Sığırlardan alınan kanlardan DNA'lar izole edilmiş ve 3. kromozom üzerinde bulunan SLC35A3 geninin 395 bp uzunluğundaki parçası F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAG-3' (Normal allele), F 5'-CACAATTTGTAGGTCTCATGGCAT-3' (CVM-mutant allele), R 5'-GTTATACTA CAGGAGTCACCTCT-3' (her iki primer için ortak reverse primer) primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR işlemi sonucunda ürünün varlığı ve yokluğuna göre taşıyıcı bireyler belirlenmiştir. Sonuç olarak incelenen 200 örnekten 7 tanesinin CVM taşıyıcısı olduğu anlaşılmış ve Antalya ilinde yetiştirilen Siyah Alaca sığırlarda CVM hastalığının varlığı gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: AS-PCR, CVM, Siyah Alaca, SLC35A3 geni

JÜRİ: Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Taki KARSLI

Dr. Öğr. Üyesi Abdullah ÖZSOY

ABSTRACT

IDENTIFICATION of COMPLEX VERTEBRAL MALFORMATION INHARITED DISEASE IN HOLSTEIN COWS REARED in ANTALYA by USİNG ALLELE-SPEİFİC PCR (AS-PCR)

Murat Gökçe EREN

M.Sc. Thesis in Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

February 2019; 25 pages

The aim of this study was to investigate the presence of complex vertebral malformation (CVM) in Holstein cows reared in Antalya by using allele-specific PCR (AS-PCR). For this purpose, 200 Holstein cows reared by member breeders of Antalya Cattle Breeders Association and reared in Akdeniz University Faculty of Agriculture Department of Animal Science, also member of the same association, were used to detect presence of CVM disease. DNAs taken from cattle were isolated and F 5' CACAATTT GTAGGTCTCATGGCAG -3' (Normal allele), F 5' CACAATTTGTAGGTCTCATGG CAT -3' (CVM-mutant allele), R 5' GTTATACTACAGGAGTCACCTCT -3' (reverse primer for both primers) primers were used to amplify 3954 bp region located on 3. chromosome of SLC35A3. CVM-carrier individuals were detected according to presence or absence of PCR products.

KEYWORDS: AS-PCR, CVM, Holstein, SLC35A3 gene

COMMITTEE: Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Taki KARSLI

Assoc. Prof. Dr. Abdullah ÖZSOY

ÖNSÖZ

Tüm yetiştiricilik dallarında olduğu gibi sığırcılık işletmelerinde de temel amaç karlı bir üretim yapmaktır. Hayvancılık işletmelerinde verim seviyesi ne olursa olsun sağlıklı damızlık hayvanların bulunması, karlı bir üretim yapmanın en önde gelen koşullarından birisidir. Aksi durumlarda zaten düşük karlılık sınırında çalışma durumunda olan sığırcılık işletmelerinde ekonomik olarak çok büyük kayıplar söz konusu olabilmektedir. Genetik hastalıkların en azından boğa adayları ve damızlık boğalar için kesinlikle taranması gereklidir. Ayrıca, proje uygulamaya geçirildiğinde bu konuda çalışan araştırmacıların eğitilmesi yanında, bölüm laboratuvarının bu konuda başvuru bir merkez olması bölgemiz için önemli bir kazanç olacaktır.

Bana bu konuda çalışma olanağı sunan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Soner BALCIOĞLU'na, hiçbir zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Taki KARSLI'ya, laboratuvar desteğini gördüğüm Arş. Gör. Eymen DEMİR'e, Sayın Öğr. Gör. Dr. Emine ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca değerli katkılarından ötürü eşim Pınar EREN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

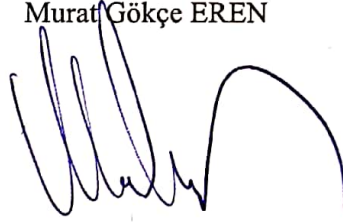
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Sığırın Zoolojik Sistemdeki Yeri	3
2.2. Araştırmada Kullanılan Siyah Alaca Irkı ve Bazı Özellikleri.....	3
2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	4
2.4. AS-PCR (Allele Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Metodu.....	5
2.5. Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM)	6
2.5.1. CVM hastalığı ile ilgili yapılmış çalışmalar	7
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Metot	11
3.2.1. Kan örneklerinin alınması.....	11
3.2.2. Genomik DNA izolasyonu.....	11
3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması	12
3.2.4. PCR için primerlerin belirlenmesi	13
3.2.5. PCR tekniği (Polimerase Chain Reaction)	13
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi	14
3.2.7. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler	15
4. BULGULAR	17
5. TARTIŞMA	21
6. SONUÇLAR	22
7. KAYNAKLAR	23
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Antalya Bölgesinde Yetiştirilen Siyah Alaca Süt Sığırlarında CVM (Kompleks Vertebral Malformasyon) Kalıtsal Hastalığının Allele Özgü PCR (Allele-Specific; AS-PCR) Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

06/02/2019

Murat Gökçe EREN



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat Derece
dk	: Dakika
rpm	: Dakika Başına Devir Sayısı
kb	: Kilo baz
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
V	: Volt
µl	: Mikrolitre

Kısaltmalar

AS-PCR	: Allel Spesifik PCR
BLAD	: Sığır Lökosit Bağlama Eksikliği
CVM	: Kompleks Vertebral Malformasyon
DUMPS	: Üridin Monofosfat Sentezi Eksikliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Holstein / Siyah Alaca	4
Şekil 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşamaları	5
Şekil 2.3. AS-PCR çalışma prensibi	6
Şekil 2.4. CVM hastalığını taşıyan buzağı	7
Şekil 2.5. İki günlük CVM homozigot resesif genotipli buzağı	7
Şekil 3.1. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	17
Şekil 3.2. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	18
Şekil 3.3. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	18
Şekil 3.4. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	19
Şekil 3.5. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	19
Şekil 3.6. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	20
Şekil 3.7. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Evcil sığırın sistematikteki yeri	3
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu	13
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi.....	15



1. GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusu 2019 itibariyle 7.5 milyar sınırını geçtiği düşünülmekte ve bu rakamın 2030 yılında 9,6 milyar, 2050 yılında ise 12 milyar olacağı öngörülmüştür. Nüfusla birlikte tarımsal ürünlere olan gereksinim de artmakta buna karşın çarpık kentleşme, tarımsal arazilerin ve üretim alanlarının azalmasına sebep olmaktadır. Talep artışının sağlanması için tarımsal ürünlerde ıslah çalışmaları hız kazanmıştır. Islah çalışmaları sayesinde birim alandan ve birim hayvandan daha fazla ürün alınması sağlanmıştır. Islah çalışmaları her geçen gün artarak devam etmektedir. Tarımsal ürünler içerisinde şüphesiz ki hayvansal ürünlerin büyük önemi vardır. Bu hayvansal ürünlerin büyük bir kısmı sığırlardan elde edilmektedir.

Türkiye hayvancılık faaliyetleri arasında sığircılık önemli yer tutmaktadır. Sığırlar, insanlar tarafından doğrudan değerlendirilme imkanı olmayan kaba yemleri hayvansal proteine dönüştürebilme yeteneğine sahiptirler. Diğer çiftlik hayvanlarıyla kıyaslandığında birim başına süt verimi en yüksek tür olup et üretim kapasitesi oldukça tatminkardır. Farklı koşullara uyum sağlayabilecek çok sayıda ırk ve tipi vardır. Genetik ıslah ve üremenin denetimine yönelik uygulamalara yüksek düzeyde reaksiyon göstermektedir.

Türkiye’de 2018 yılı TÜİK verilerine göre 17.166.194 adet sığır bulunmaktadır. 2002 yılından bu yana ülkemizdeki sığır sayısında yaklaşık 8 milyon artış gözlenmiştir (Anonim 1). Hayvan sayısındaki artışa rağmen 2002 yılına nazaran hayvan başına günlük süt üretimi artmıştır. Bu verilerden yola çıkarak yapılan ıslah çalışmalarının ne denli önemli olduğunu görebiliriz.

Sığır varlığımızın %48,5’i kültür ırkı, %41.8’i kültür ırkı melezi ve %9.2’si de yerli ırklardan oluşmaktadır (Anonim 1). Kültür ırkı sığırları ve melezleri içerisinde en çok yetiştirilen hayvan Holstein (Siyah alaca) ırkıdır. Dünya ve Türkiye’de en çok yetiştirilen sığır ırkı olan Holstein, renklerinden dolayı Siyah Alaca veya Kırmızı Alaca olarak da adlandırılır. Kuzey Denizi kıyılarından (Avrupa) köken alan Holstein ırkı sığırlar et ve süt verimi yönünde ıslah edilmiş kombine verim yönlü hayvanlardır. Yapılan ıslah çalışmaları sonunda iyi bakım ve besleme koşullarında Holstein ırkı sığırların laktasyonda süt verimi ortalaması 7000-11000 kg arasındadır. Sütündeki protein oranı %3,3 yağ oranı %4, ergin canlı ağırlıkları ise 700-800 kg civarındadır (Kumlu 1999).

Hayvancılık işletmelerinde gerçekleşen ekonomik kayıpların büyük çoğunluğu sağlık sorunlarından kaynaklanmaktadır. Çiftlik hayvanlarında görülen sağlık sorunlarının bir kısmı doğrudan genetik yapıyla ilişkilidir. Kalıtsal hastalıklar çiftlik hayvanlarında fiziksel veya fonksiyonel kusurlara sebep olarak, verim ve sağlık üzerine olumsuz etkilere sahip olmaktadır. Moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar bu hastalıkların yayılmadan önüne geçilmesini büyük ölçüde sağlamaktadır. CVM gibi kalıtsal hastalıklar resesif etkiye sahip olması nedeniyle, kalıtsal hastalıkların

populasyondaki varlığı heterozigot bireylerle sağlanmaktadır. Günümüzde birçok kalıtsal hastalığın moleküler doğası bilinmektedir. Böylece taşıyıcı (heterozigot) bireylerin doğum öncesinde veya doğum sonrasında tespit edilmesi mümkün olmaktadır (Citek vd. 2006; 2007). Moleküler yöntemlerle belirlenen taşıyıcı bireyler damızlık dışı bırakılarak çiftlik hayvanlarının genetik sağlığı kontrol edilebilmektedir.

CVM (Kompleks Vertebral Malformasyon) Siyah Alaca sığır ırkında otozomal resesif kalıtılan (Berglund vd. 2004), doğum öncesi ya da sonrası ölümlere neden olan bir hastalıktır (Agerholm vd. 2004). Bu hastalık ilk kez 1999 yılında Danimarka'da Agerholm vd. (2001) tarafından raporlanmıştır. Daha sonraki yıllarda Amerika (Duncan vd. 2001), İngiltere (Revell 2001), Hollanda (Wouda vd. 2000), Japonya (Nagahata vd. 2002), İsveç (Berglund vd. 2004) ve Türkiye'de (Meydan vd. 2010) raporlanmıştır. Türkiye'de yapılan çalışmada CVM genini taşıyıcıların frekansı %3.4 olarak bildirilmiştir (Meydan vd. 2010).

Kompleks vertabral malformasyon (CVM), hastalığının moleküler temeli, tek nükleotid değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonudur. Tek nükleotid değişimi sonucu oluşan mutasyonların moleküler tanısında en çok kullanılan yöntem PCR-RFLP metodudur. Eğer mutasyonu taşıyan gen bölgesini çoğaltacak primerler ve mutasyon bölgesini tanıyan restriksiyon enzimi biliniyorsa bu yöntem kolaylıkla uygulanır. Ancak Kompleks vertabral malformasyon (CVM), mutasyona ait restriksiyon enzimi olmadığından PCR-RFLP tekniği kullanılamaz. Bunun belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. AS-PCR bu yöntemlerden birisidir.

Bu çalışmanın amacı Türkiye 'deki sığır varlığının önemli bir kısmını oluşturan Siyah Alaca ırkının yörenizdeki hayvanlarında bu hastalığı taşıyıp taşımadığını öğrenmek ve hastalığın bulunması durumunda gerekli önlemlerin alınmasına yardımcı olmaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Sığırın Zoolojik Sistemdeki Yeri

Evcil sığırın sistematikteki yeri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Evcil sığırın sistematikteki yeri

Alem	Hayvanlar
Şube	Sırtı İplikliler
Alt Şube	Omurgalılar
Sınıf	Memeliler
Alt Sınıf	Plasentalılar
Takım	Tırnaklılar
Alt Takım	Çift Tırnaklılar
Grup	Ruminantlar
Familya	Boş Boynuzlular
Cins	Bos
Alt Cins	Taurina
Tür	Bos Taurus

2.2. Araştırmada Kullanılan Siyah Alacaırkı ve Bazı Özellikleri

Dünyada en fazla yayılma alanına sahip kültür ırkı olan Siyah Alacaların anavatanı Hollanda’nın Frizya bölgesidir. Hollanda, Almanya ve Danimarka’nın Kuzey Denizi kıyılarındaki ovalık kesimlerde yetiştirilen sığırlardan köken alan Siyah Alaca (Holstein, Holstein Friesian) Dünya’nın en yaygın sığır ırkıdır. Siyah Alaca ırkının Türkiye’de yetiştirilmesine 1958 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nden Bursa Karacabey Harası’na getirilen inek ve boğalarla başlanmıştır. Bu ırk sığırlar Türkiye’de daha çok Ege, Marmara ve Akdeniz Bölgeleri’nde yetiştirilmektedir. Yapılan ıslah çalışmaları sonunda iyi bakım ve besleme koşullarında Holstein ırkı sığırların laktasyonda süt verimi ortalaması 7000-11000 kg arasında olabilmektedir. Sütündeki protein oranı %3,3 yağ oranı %4, ergin canlı ağırlıkları ise 700-800 kg civarındadır (Kumlu 1999).



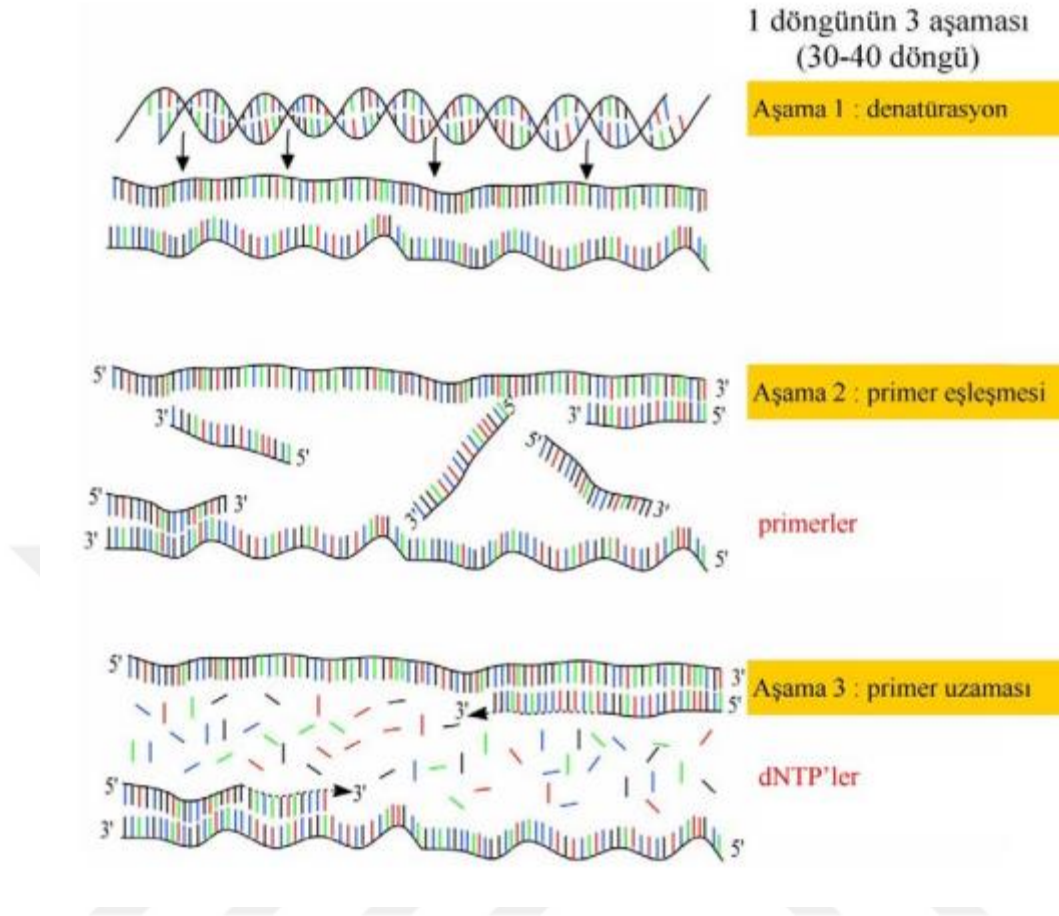
Şekil 2.1. Holstein / Siyah Alaca (Anonymous 1)

2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR ilk defa 1985 yılında Celera genomics çalışanı Carry Mullis tarafından uygulanmış ve günümüze kadar birçok defa geliştirilerek kullanılmaya devam edilmiştir. Mullis bu çalışmasıyla 1993 yılında kimya dalında Nobel ödülü kazanmıştır. PCR; laboratuvar ortamında sipesifik DNA dizilerinin primer olarak bilinen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemine denilmektedir. DNA dizi analizinde, DNA haritalamasında, genetik hastalıkların teşhisinde kullanılan PCR yöntemi, moleküler genetik alanındaki en önemli buluşlardan birisidir.

PCR tekrarlanan 3 basamak şeklinde gerçekleşir. Bu basamaklar;

1. Amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (94°C),
2. Primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıktaki annealing-birleşme reaksiyonu,
3. Taq DNA polimeraz enziminin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C'de primerlerin uzaması-tamamlayıcı zincir sentezi olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları (Andy Vierstraete 1999)

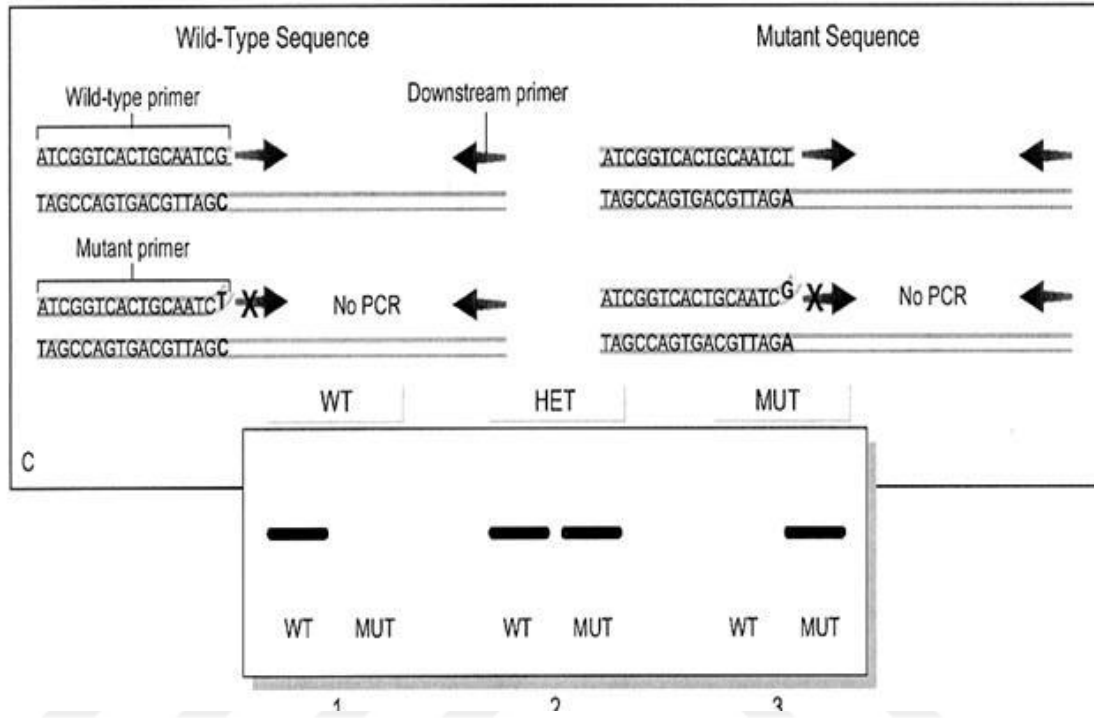
Temel prensibi bu olmakla birlikte günümüzde tek nükleotid değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonların neden olduğu kalıtsal kusurların belirlenmesinde en yaygın olarak PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemi kullanılır. Nokta mutasyonları için AS-PCR (Allel spesifik-PCR), PCR-PIRA (PCR-Primer-introduced Restriction Analysis) ya da PCR-SSCP (PCR-Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi) yöntemleri kullanılabilir.

2.4. AS-PCR (Allele Özgü Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Metodu

Mevcut çalışmada kullanılan AS-PCR , nokta mutasyonlarının saptanması için geliştirilen bir yöntem olup, tasarlanan PCR primerlerinden birinin 3' nükleotidinin mutasyona özgün olması esasına dayanır. Değişen nükleotide uygun olarak tasarlanan primerlerin 3' ucundaki nükleotid birinde mutant diğerinde ise yabani tip allele özgüdür. Allel spesifik amplifikasyon yönteminde 3 adet primer tasarlanır. Bu primerlerden biri ortak amplifikasyon primeri iken diğeri 3' nükleotidi mutasyon noktasına özgün mutant ya da yabani tip primerdir. Bir örneğin ilgilenilen mutasyon için analizi iki ayrı PCR yapılmasını gerektirir. (1.ortak primer + yabani tip primer; 2. Ortak primer + mutant primer). 3' uçtaki nükleotid mutant ya da yabani tipteki baz diziliminden hangisine

uyumluysa onun amplifikasyonu gerçekleşecek ve böylece nokta mutasyonlarının tespiti mümkün olacaktır (Takeda 1993).

Allele Specific PCR' ın çalışma prensibi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.3. AS-PCR çalışma prensibi

2.5. Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM)

Kompleks Vertebral Malformasyon (CVM) ilk kez Danimarka'da bildirilmiş. (Agerholm 2001) Homozigot bireylerde ölü doğumlara ve aborta (yavru atımı) neden olur. Erken doğan buzağılarda genellikle gelişmemiş bacaklar, eksik kaburga, boyun kısalığı, düşük vücut ağırlığı ve omurlarda yapışma gibi anomaliler görülür (Agerholm 2004, Thomsen 2006; Duncan 2001). Homozigot buzağılarda meydana gelen anomaliler aşağıdaki resimlerde gösterilmiştir.



Şekil 2.4. CVM hastalığını taşıyan buzağı (Agerholm 2009)



Şekil 2.5. İki günlük CVM homozigot resesif genotipli buzağı (Gentile 2006)

2.5.1. CVM hastalığı ile ilgili yapılmış çalışmalar

Aşağıda farklı yöntemlerin kullanılarak CVM hastalığı ile ilgili yapılmış bazı araştırmalar hakkında özet bilgiler verilmiştir.

Ülkemizde bu konuda yapılmış ilk çalışma Meydan (2010) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Ankara yöresindeki 225 ve Şanlıurfa yöresindeki 125 Siyah Alaca ırkı sığırdan alınan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada CVM'nin yanısıra

BLAD ve DUMBS gibi kalıtsal hastalıklar da araştırılmıştır. Çalışmada 12 adet CVM taşıyıcısı tespit edilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada CVM kalıtsal hastalığı PCR-RFLP yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini kayseri yöresinde yetiştirilen dişi Siyah Alaca sığırları oluşturmıştır. Ancak bu çalışmada CVM taşıyıcısı bir hayvana rastlanmamıştır.

Bu hastalık dünyada ilk olarak Agerholm vd. tarafından 1999 yılında bildirilmiştir. 18 abort buzağı üzerinde yapılan bu çalışmada omurga kısalığı tüm deneklerde karakteristik bir özellik olarak belirtilmiştir. Hastalığın yayılma nedeni ise suni tohumlamada kullanılan elit damızlık boğaların CVM taşıyıcısı olmaları gösterilmiştir.

Nagahata vd. (2002) ölü doğmuş bir buzağı üzerinden yaptığı çalışmada ölü doğan buzağının mutant ve annesinin CVM taşıyıcısı olduğu saptanmıştır. Suni tohumlamada kullanılan boğanın pedigirdisi incelendiğinde onunda CVM taşıyıcısı olduğu anlaşılmıştır. Mutant buzağının birçok röntgen görüntüsünü içeren çalışmada buzağının karakteristik vertebra sorunlarının olduğu görülmektedir.

Berglund vd. (2004) tarafından İsveç Siyah Alacaları üzerinde yapılan çalışma deneklerin doğum yıllarına göre yapılan bir araştırmayı kapsamaktadır. Toplam 228 denek üzerinde yapılan çalışmada 53 adet CVM taşıyıcısı hayvan bulunmuştur. Hayvanların doğum yıllarına göre incelendiğinde 1995 yılında doğanlarda 0 taşıyıcı, 1996 yılında doğanlarda 3 taşıyıcı, 1997 yılında doğanlarda 18, 1998 yılında doğanlarda 23 ve 1999 yılında doğanlarda 9 adet taşıyıcı hayvan belirlenmiştir.

Agerholm vd. (2004) tarafından yapılan bir diğer çalışmada 640 denek hayvan kullanılmıştır ve buzağılama tarihlerine göre iki gruba ayrılmıştır. A grubunda 286 dişi Siyah Alaca CVM taşıyıcısı olan BURMA isimli boğanın yavrularıdır. Bu dişi siyah alacalar yine CVM taşıyıcısı olan KOL Nixon isimli damızlık boğa tarafından tohumlanmıştır. 24 adet buzağı abort olarak kayıtlara geçmiştir. Kalan 262 dişi siyah alacanın buzağılarından 15 tanesi CVM hastalığından etkilenmiş olarak doğmuştur. B grubunda ise 382 dişi siyah alaca içerisinde 19 adet abort buzağı olmuştur. Kalan buzağılamalar sonucunda 11 buzağı CVM hastalığından etkilenmiş olarak doğmuştur.

Polonya’ da yapılan bir çalışmada Rusk ve Kaminski (2007) 2001-2005 yılları arasında suni tohumlamada kullanılan 202 Polonya Siyah Alacaları ve 1996-2003 yılları arasında doğan normal tohumlamalarda kullanılmış olması muhtemel olan 403 adet boğa üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada toplamda 150 adet taşıyıcı birey saptanmıştır.

2007 yılında Ghanem vd. tarafından yapılan çalışma materyal ve yöntem bakımından bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. AS-PCR yönteminin

kullanıldığı çalışmada 200 denek kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 26 adet taşıyıcı birey saptanmıştır.

Rezaee vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada ise 144 denek hayvan kullanılmıştır. İran Siyah Alacaları üzerinde yapılan bu çalışmada taşıyıcı bireylere rastlanmamıştır.

Mahdipour vd. (2010) Hindistan'da yetiştirilen Karan Fries (KF) boğalarında CVM kalıtsal hastalığını araştırmışlardır. Çalışmada 52 boğanın 12 tanesinde CVM mutant allelinin olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar mutant bireylerin sürüden çıkarılabileceği ve döllerinin bu hastalık bakımından araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Wang vd. (2011) Çin'de yetiştirilen Siyah Alaca sığırlarında CVM hastalığını araştırmışlardır. Çalışmada 217 inek ve 125 boğa ile çalışılmış ve 5 inek ile 5 boğanın CVM taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar Siyah Alaca sığırlarında CVM taşıyıcılarının belirlenmesinde CRS-PCR yönteminin güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Alaie vd. (2012) İran'da yetiştirilen 100 Siyah Alaca ve 100 Guilan sığırında CVM hastalığını araştırdıkları çalışmada hiç taşıyıcı bireye rastlanmamıştır. Araştırmacılar bu durumun söz konusu hastalığın aleyhine yapılan seleksiyon programlarından kaynaklanacağı gibi mutant genin popülasyonda artmasına engel olan koruma programları veya mutant genin popülasyondaki düşük frekansından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2012) Siyah Alaca sığırlarında CVM ve BLAD kalıtsal hastalıklarının belirlenmesinde hızlı ve güvenilir bir yöntem olan RT-PCR yönteminin kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmada Çin'de yetiştirilen 587 Siyah Alaca ırkına ait sığırın 56 tanesinin CVM, 8 tanesinin ise BLAD taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar yapılan pedigrî analizine göre taşıyıcı bireylerin ortak ataya sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Kotikalapudi vd. (2013) PCR-PIRA ve RFLP yöntemini kullanarak 60 Siyah Alaca boğasında CVM hastalığını değerlendirmişlerdir. Çalışmada bir bireyde SLC35A3 geninin 4. Ekzon bölgesinde 559 pozisyonunda (G-T) polimorfizm belirlenmiştir. Araştırmacılar 554 ve 555 nükleotit pozisyonunda daha önce bilinmeyen iki homozigot mutasyonun da varlığını tespit etmişlerdir.

Adamov vd. (2014) Makedonya'da yetiştirilen Siyah Alaca sığırlarında BLAD ve CVM varlığını araştırmışlardır. 86 inek ve 6 boğanın incelendiği çalışmada 1 ineğin CVM taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar Makedonya'da frekansı az olmasına rağmen CVM taşıyıcısının olduğunu ve boğaların yapay tohumlamada kullanılmadan önce test edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Hemati vd. (2015) İran’da yetiştiriciliği yapılan 50 Siyah Alaca sığır sürüsünde BLAD ve CVM kalıtsal hastalığını araştırmışlardır. Çalışmada 33 sürüde her iki kalıtsal hastalık bakımından taşıyıcı birey belirlenmemiştir. Hastalığın belirlendiği 17 sürüden rastgele seçilen 120 bireyde BLAD taşıyıcısı belirlenmezken 2 bireyin CVM taşıyıcı olduğu belirlenmiştir.

Tuckhachev vd. (2017) Kuzey Kafkasya’da yetiştirilen Ayrshire sığır ırkında CVM ve BLAD kalıtsal hastalığını araştırmışlardır. Çalışmada 440 birey ile çalışılmış ve söz konusu hastalıkları taşıyan bireylerin olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumun Kuzey Kafkasya’da sığır yetiştiriciliğinde baba hattı olarak kullanılan Hannulan Yaskiyri, Rihiiviidan, Urbo Errant ve O. R. Lightning sığır ırklarının mutant alleli taşımamalarından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Avanus ve Altınel (2017) Türkiye’nin Edirne (n:58), İstanbul (n:54), Kırklareli (n:91) ve Tekirdağ (n: 108) illerinde yetiştirilen Siyah Alaca sığırlarını kullanarak AS-PCR, CRS-PCR ve PCR-PIRA yöntemlerinin CVM kalıtsal hastalığını belirlemedeki üstünlüklerini araştırmışlardır. Çalışmada DNA sekans sonuçlarına göre 311 bireyden 10 tanesinin CVM taşıyıcısı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar AS-PCR yönteminin en hızlı olmasına rağmen doğruluğunun düşük olduğunu, mutant bireylerin belirlenmesinde en iyi yöntemin ise PCR-PIRA olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmanın hayvan materyali Antalya Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğine üye yetiştirici elinde bulunan Siyah Alaca ırkı sığırlardan ve aynı şekilde birliğe üye Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Sığırcılık ünitesinde bulunan hayvanlardan elde edilmiştir. Kan örnekleri en az 200 adet sığırdan, deney hayvanları kullanım sertifikalı kişiler tarafından alınmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

Kan örnekleri hayvanların boyun toplardamarından (*Vena jugularis*) doğrudan sodyum sitratlı, vakumlu kan alma tüplerine alınmıştır ve soğuk zincirde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Genetik laboratuvarına en hızlı sürede ulaştırılmıştır. Kan örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Bu çalışmada genomik DNA molekülünün izolasyonunda Miller vd. (1988) tarafından bildirilen DNA izolasyon protokolü laboratuvar ortamında optimize edilmiş ve aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. Kan örnekleri oda sıcaklığında (25 °C) çözülene kadar bekletildikten sonraher bir kan örneğinden 500 µl alınarak 1,5 ml’lik ependorf tüp içine konulmuştur.
2. Örneklerin üzerine 1.000 µl Eritrosit Lisis Tampon Çözeltilisi ilave edildikten sonra vorteksle iyice karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 3000 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
3. Ependorf tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım dikkatli bir şekilde uzaklaştırılıp dipte kalan hücresel kısım rengi beyaz olana kadar Eritrosit Lisis Tampon Çözeltilisi ile en fazla 4 defa muamele edilmiştir.
4. Hücresel kısmın üzerine 1.000 µl Fizyolojik Tampon Çözeltilisi eklenmiş ve kısa bir süre karıştırıldıktan sonra örnekler 3.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş ve sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.

5. Dipte kalan hücresel kısım üzerine 600 µl Lisis TE Tampon Çözeltilisi eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.
6. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl SDS solusyonu ve 5 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 65 °C’de 1,5 saat su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılmıştır.
7. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 200 µl 6M NaCl Çözeltilisi eklenmiş ve 10 dk vorteksle iyice karıştırılmış ve örnekler 10.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine koyulmuştur ve tekrar 10.000 rpm de 5 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda üstte kalan sıvı kısım tekrar yeni bir ependorf tüp içine alınmıştır.
9. Örnekler üzerine yaklaşık 1.000 µl %99,9’luk saf etil alkol ilave edilmiş ve ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 4-5 kez hafifçe karıştırılmıştır.
10. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 10.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Ve etil alkol uzaklaştırılmıştır.
11. Dibe çökmüş DNA iplikçiklerinin üzerine 1.000 µl %70’lik etil alkol ilave edilerek 10.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiş ve tüpün üst kısmında kalan alkol tekrar uzaklaştırılmıştır. Bu kısımda alkolün tamamen buharlaşmasını sağlamak için çeker ocak kullanılmıştır.
12. Kuru örnekler üzerine 100 µl TE Tampon Çözeltilisi ilave edilmiş olup, DNA iplikçiklerinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 °C’de bekletilmiştir
13. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin kırılıp kırılmadığı kontrolleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek yapılmıştır.

3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması

İzole edilen DNA örneklerinin miktarlarının belirlenmesinde spektrofotometre kullanılmıştır. Elde edilen DNA miktarları 20-100 ng/µl arasında belirlenmiştir. PCR uygulaması için DNA miktarları 50 ng/µl miktarına ayarlanmıştır.

3.2.4. PCR için primerlerin belirlenmesi

Bu çalışmada CVM kalıtsal hastalığının belirlenmesi için daha önce Ghanem (2008) tarafından kullanılmış primerler seçilmiştir. Primerler aşağıdaki gibidir.

Normal Allel (5'-CAC-AAT-TTG-TAG-GTCTCA-TGG-CAG-3')

CVM Allel (5'-CAC-AAT-TTG-TAG-GTC-TCA-TGG-CAT-3')

Reverse Primer (5'-GTT-ATA-CTA-CAG-GAG-TCA-CCT-CT-3')

3.2.5. PCR tekniği (Polimerase Chain Reaction)

Ghanem (2008) tarafından kullanılan PCR tekniği uygulanmıştır. Kaynak taraması ve primer kataloğunda belirtilen optimum annealing sıcaklıkları PCR' da programlanmıştır.

DNA örnekleri, PCR reaksiyonunda kullanmak amacıyla 50 ng/μl yoğunluğunda ayarlanmıştır. 0,2 ml' lik PCR tüplerine her bir DNA'dan 3'er μl konulmuştur. 47μl' lik karışım içerisindeki bileşenler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu

PCR Bileşenleri	Miktar (μl)
H ₂ O	29.45
MgCl ₂	4
10X buffer	4
dNTPs	7.5
Forward Primer	0.9
Reverse Primer	0.9
Taq DNA Polimeraz	0.25

PCR uygulamaları için Eppendorf Master Gradient Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Cihazın kapak sıcaklığı 100 °C dereceye ve blok sıcaklığı 95°C ayarlanmıştır. Böylece PCR sırasında reaksiyon karışımının buharlaşması önlenmiştir. Daha sonra, hazırlanan reaksiyon karışımı her bir PCR tüpüne (47μl +3μl DNA= 50 μl) paylaştırılmıştır. Her aşamada tüplerdeki reaktörler birbirleriyle iyice karıştırılmıştır.

Bu çalışma için optimize edilen PCR programı aşağıda verilmiştir.

İlk denatürasyon	95°C de 2 dk	} 30 döngü
Denatürasyon	95°C de 30 sn	
Yapışma	62 °C de 30 sn	
Uzama	72 °C de 30 sn	
Son uzama	72 °C de 10 dk	

Bu şekilde toplam 30 döngü uygulanmıştır. Son döngüde 72⁰C’ de 5 dakika bekletilerek PCR programı tamamlanmıştır. PCR işleminden sonra PCR ürünleri elektroforez işlemine kadar, +4 ⁰C’ de saklanmıştır.

3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

Elektroforezde tampon çözeltisi olarak Tris-Acetate-EDTA (TAE) kullanılmıştır. Bu çözelti pH: 8.0 olacak şekilde ve 50X yoğunluğunda hazırlanarak 1lt suda çözdürülmüştür. Bu stok çözeltiden 20 ml alıp saf su ile 1lt’ye tamamlayarak da 1X’lik TAE buffer hazırlanmıştır.

Çalışmada Agaroz jel eldesi için “peqGOLD Universal Agarose” markalı ürün kullanılmıştır. Daha önce birçok çalışmada kullanılmış ve başarılı olunmuş yüzde olan %2 lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz, TAE tampon çözeltisi ile bir erlen meyerde, mikrodalga fırın yardımıyla ısıtılmış toz halindeki agarozun çözelti içinde şeffaf bir hale gelene kadar ısıtılmış ve ara ara karıştırılmıştır. Karıştırılırken yürütme esnasında sorun yaratan baloncuk oluşturmamasına özen gösterilmiştir.

Sıvı haldeki Agaroz jel çözeltisi içerisine UV ışığı altında görüntülenmesini sağlayacak 0,5 µl Ethidium Bromide eklenmiş ve dikkatli bir şekilde karıştırılmıştır. Karışım akışkan özelliğini kaybetmeyecek şekilde soğumaya bırakılmıştır. Bu sırada daha önceden dezenfekte edilmiş Elektroforez tepsisine, jelle DNA yüklenebilmesi için, gerekli olan kuyucukları oluşturması amacıyla tarak yerleştirilmiştir. Sürekli sallamak suretiyle soğutulan jel tepsiye hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edilerek dökülmüştür ve jel katılaşmaya kadar soğumaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmıştır ve elektroforez tankının içine, jelin üst kısmını biraz geçecek kadar elektrolit çözeltisi dökülmüştür.

3.2.6.1. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi

12.5 µl PCR ürünü 2.5 µl dye (Loading Buffer; yükleme çözeltisi) ile boyadıktan sonra oluşturulan bu 15 µl karışım jeldeki kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Elektroforez işlemi sonunda görüntülenecek olan bantların büyüklüklerini saptamak için ilk kuyucuğa 100 bp aralıklarla bant veren 1.5 kb büyüklüğünde DNA marker yüklenmiştir.

3.2.6.2. Elektroforez işlemi

PCR işlemi tamamlandıktan sonra çoğaltılan DNA örneklerinin büyüklüklerine göre ayrılması için elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez uygulamasında, jel yoğunluğu, elektrik akımı ve elektroforez süreleri en net sonucu alabilmek amacıyla, birçok deneme sonucunda optimize edilmiştir.

PCR'da çoğaltılan DNA fragmentlerini içeren üründen yaklaşık 15µl jele yüklenmiş ve 100 V da 45 dk yürütülmüştür. Böylece çoğaltıldığı düşünülen 395 bp'lik bantlarının jelde ayrılması sağlanmıştır.

3.2.7. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi aşağıda Çizelge 3.2'deC ayrıntılı olarak verilmiştir.

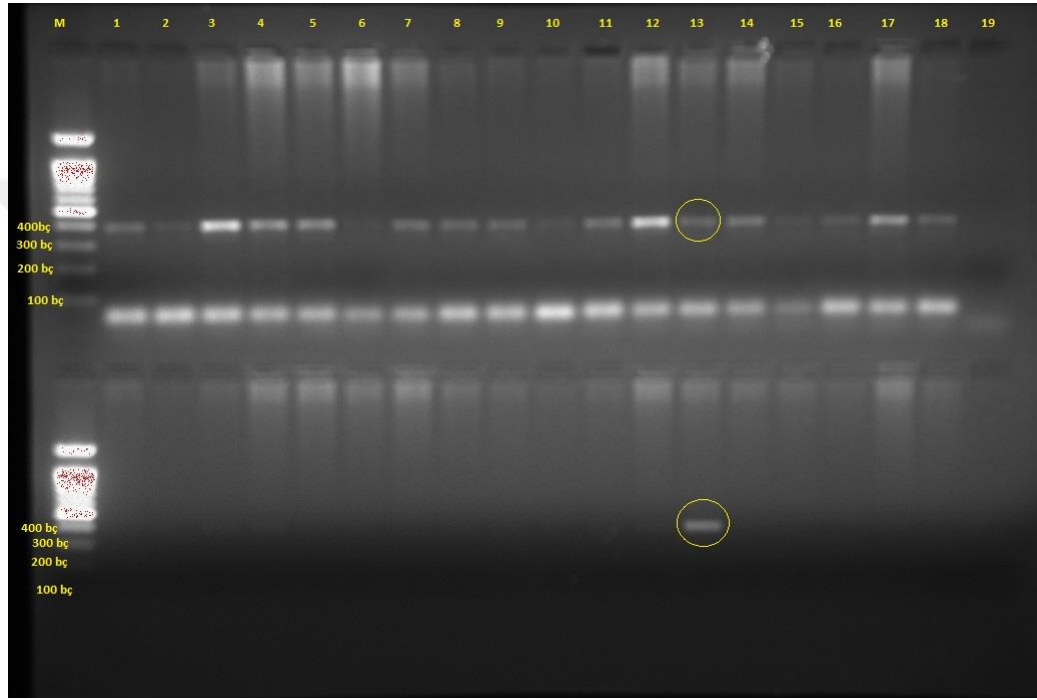
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan araç ve gereçlerin listesi

Cihazın Adı, Markası, Modeli	Kullanım Amacı
Saf Su Cihazı (MILLIPORE Direct-Q uv Water Purification System)	PCR reaksiyonunda ve PCR bileşenlerini seyreltilmesinde
Jel Görüntüleme Sistemi (VILBER LO-URMAT)	PCR ürünlerini ve kesim ürünlerini görüntülemesinde
Spektrofotometre (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000)	DNA miktarlarının belirlenmesinde
Otomatik Çalkalayıcı (Thermomixer) (Eppendorf IsoTherm-System 3880)	DNA izolasyonunda

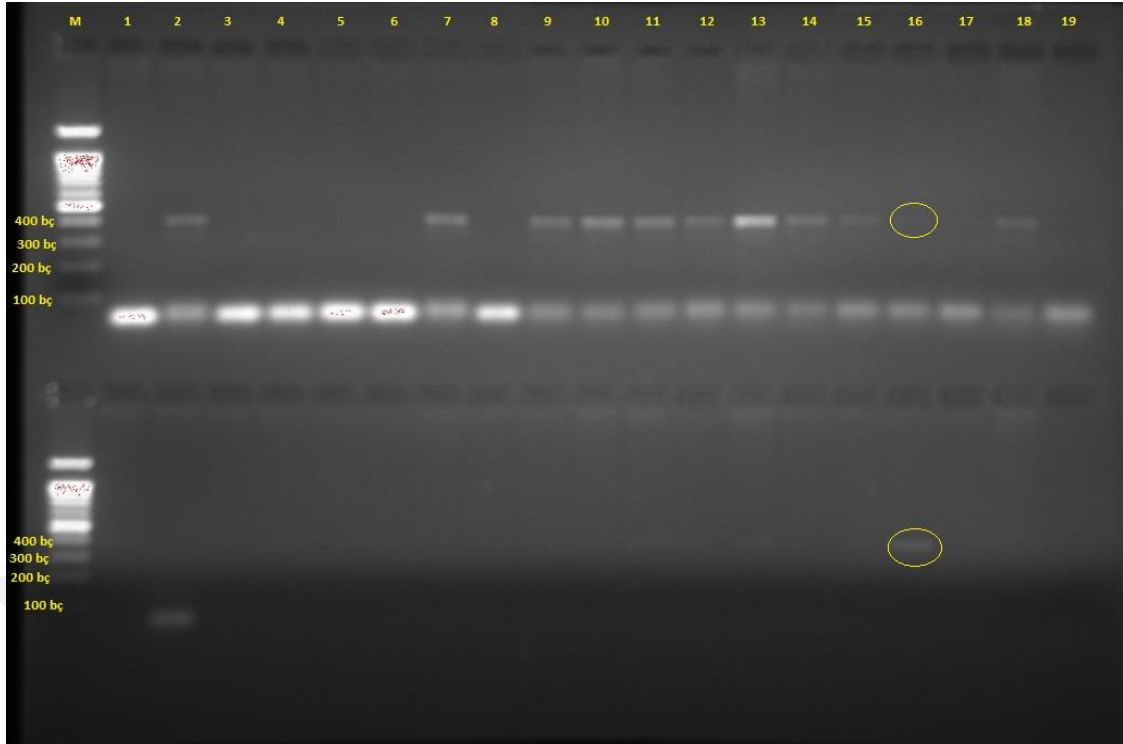
Konsantratör (Eppendorf Concentrator 5301)	DNA miktarlarının ayarlanmasında
Vortex (Yellow Line, TTS2)	DNA izolasyonunda
Santrifüj (Hettich MIKRO 200)	DNA izolasyonunda
Hassas Terazı (SHIMADZU BX320H)	DNA izolasyonu için tampon çözelti hazırlamada ve jel için agaroz tartımında
Thermal Cycler (eppendorf Masstercycler gradient 96'lık)	PCR ile DNA'nın çoğaltılmasında
Agaroz Jel Elektroforez Takımları (BIO-RAD 20 taraklı)	DNA izolasyon sonuçlarının görünmesinde, PCR ve kesim sonuçlarının belirlenmesinde
Güç Kaynağı (BIO-RAD PowerPac Basic)	Jel elektroforezi için voltaj ve zamanın ayarlanmasında
Mikro Dalga Fırını (Arçelik MD553)	Agaroz jel dökümünde
Buzdolabı (Beko BK8450T)	DNA, PCR ürünleri ve çeşitli kimyasalların korunmasında
Derin Dondurucu (Beko 7971DF)	DNA, PCR ürünleri ve çeşitli kimyasalların korunmasında
Su Banyosu (Memmert)	DNA izolasyonunda ve PCR ürünlerinin kesilmesinde
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (YellowLine MSH basic)	DNA izolasyonu için tampon çözelti hazırlamada
Mikropipetler(eppendorf)	Tüm labaratuvar çalışmalarında
pHmetre (Thermo ORION 3 STAR)	DNA izolasyonları ve Elektroforez çözeltilerinin pH larının ayarlanmasında
Otoklav (nüve OT 020V)	Kullanılan malzemelerin ve çözeltilerin sterilizasyonunda

4. BULGULAR

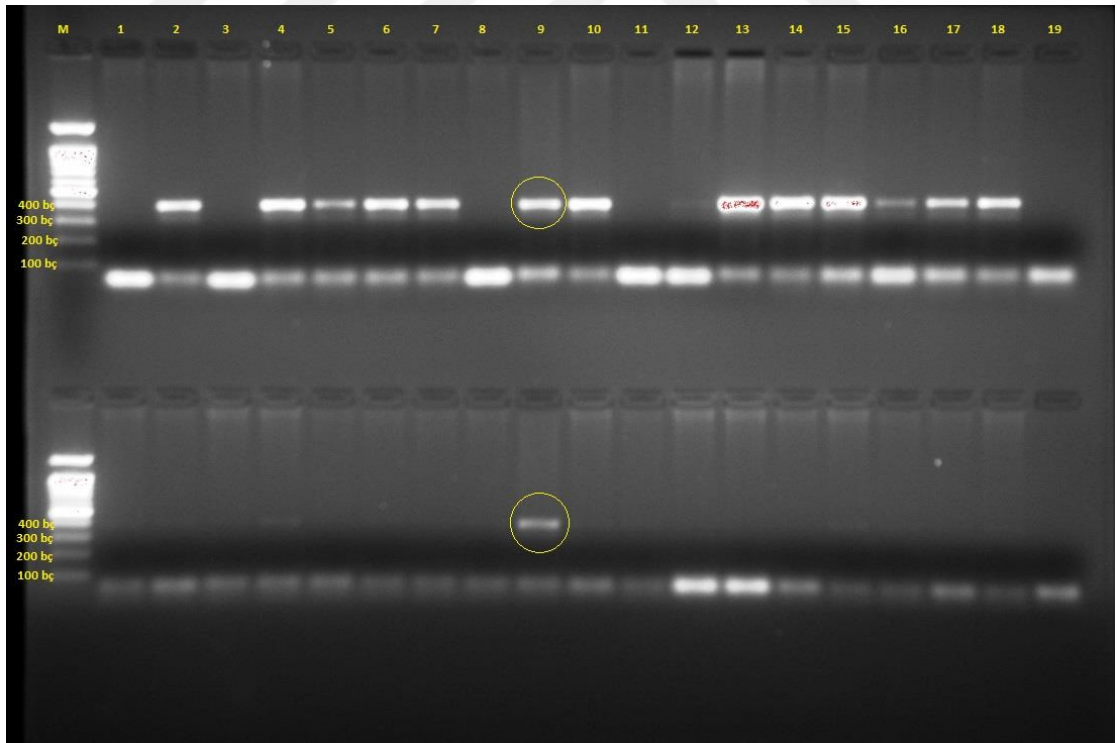
Araştırmanın hayvan materyalini oluşturan Siyah Alaca ırkından alınan kan örnekleri laboratuvarda izole edilmiştir. AS-PCR yöntemiyle çoğaltılan 395 bp 'lık PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 45 dk 100 V 'de yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucu heterozigot bireyler yuvarlak içerisinde belirtilmiştir. 200 denek içerisinde 7 adet heterozigot birey bulunmuştur. Bulgular Şekil (3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7)' de belirtilmiştir. Heterozigot bireyleri gösteren bantlar yuvarlak içerisinde belirtilmiştir.



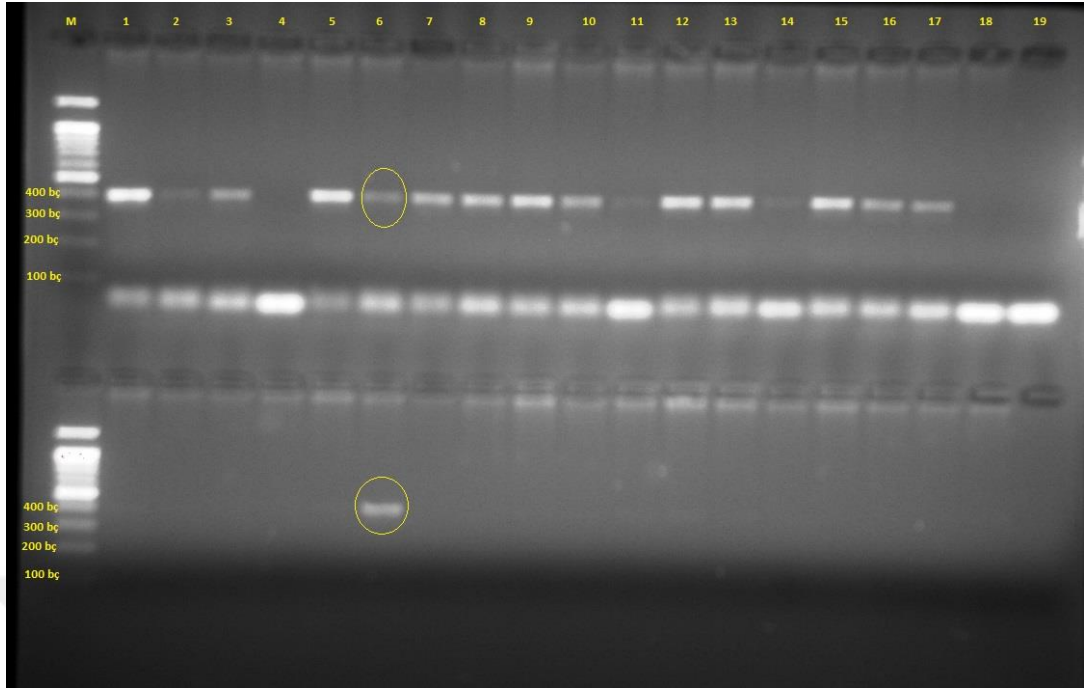
Şekil 3.1. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü



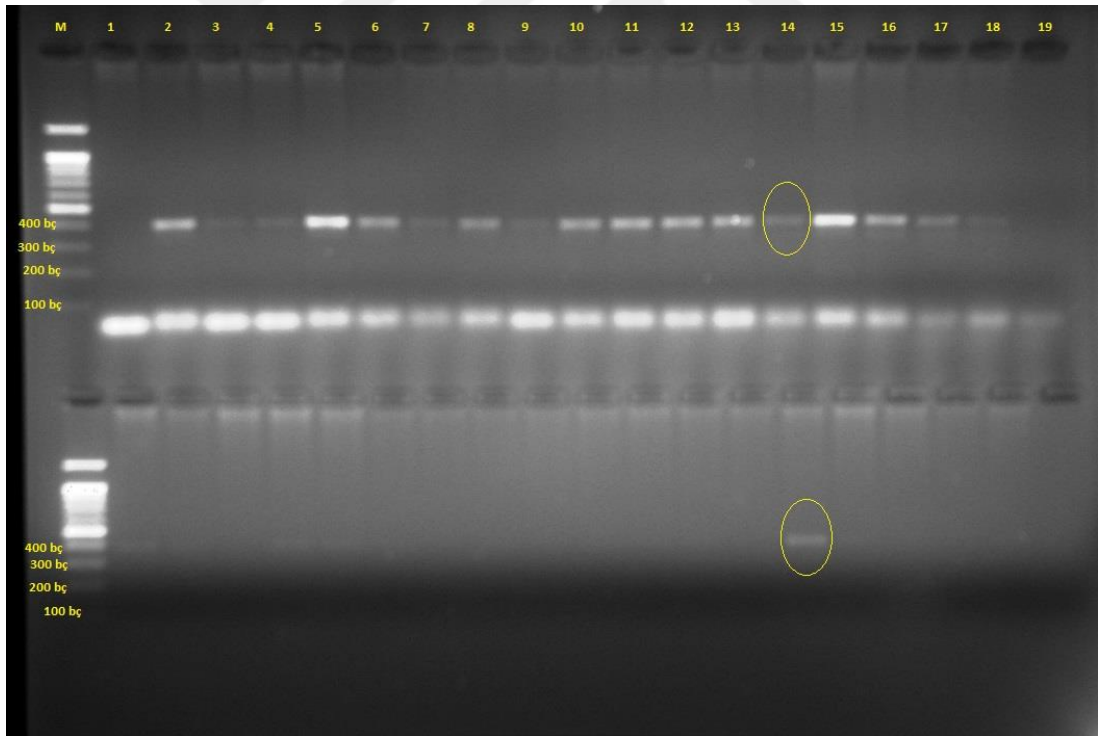
Şekil 3.2. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü



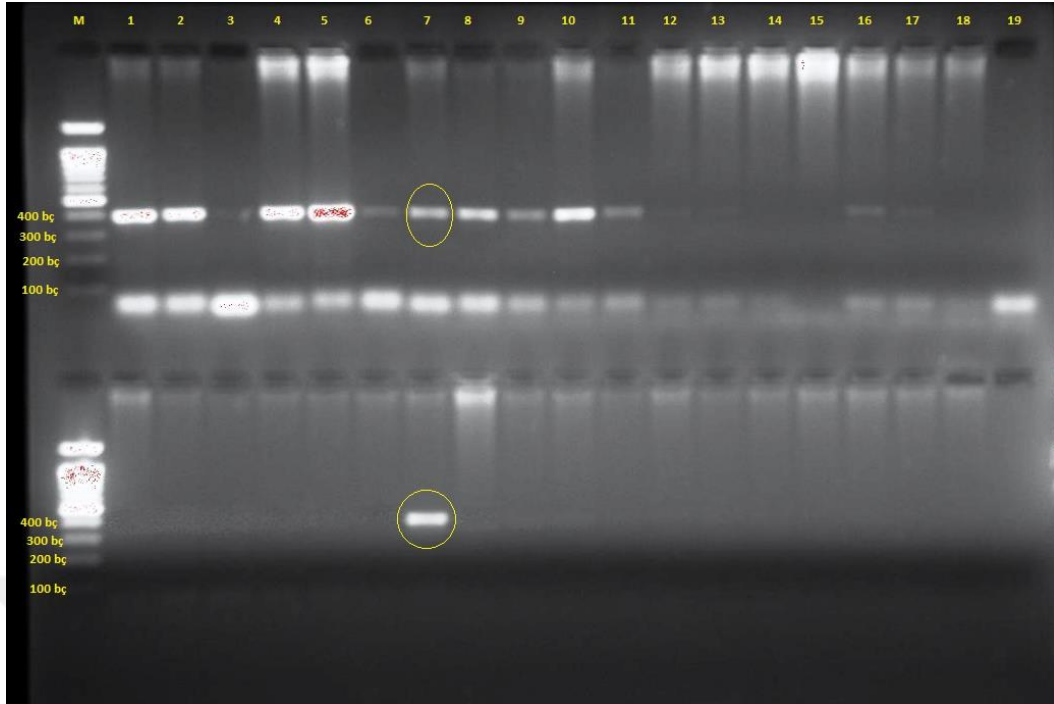
Şekil 3.3. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü



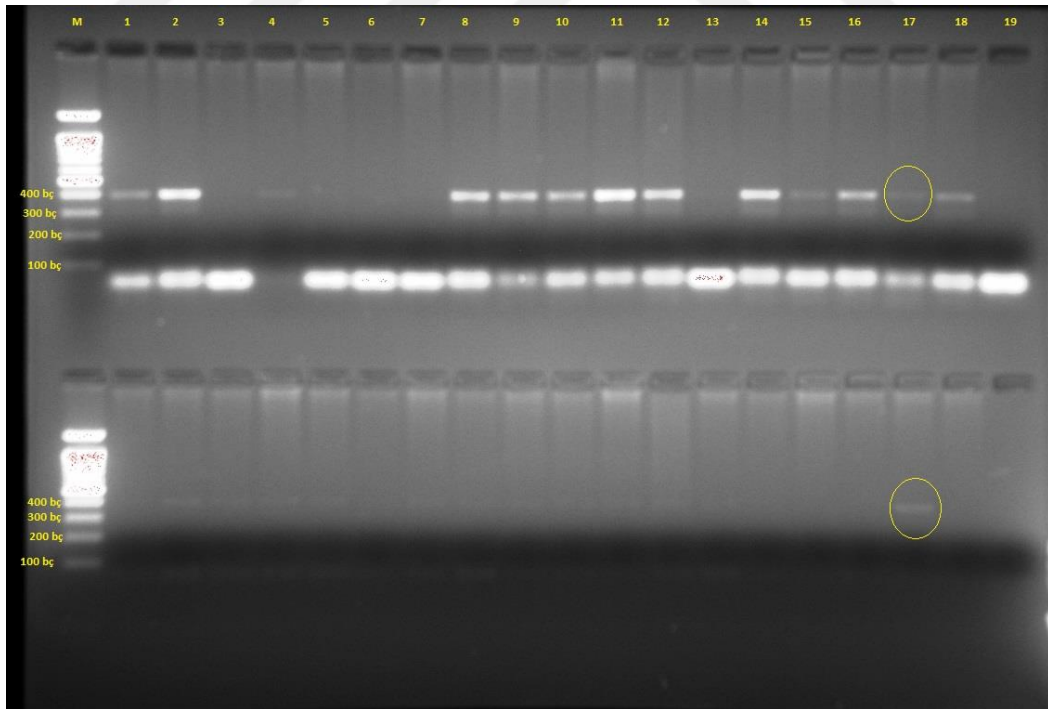
Şekil 3.4. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 3.5. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 3.6. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 3.7. CVM genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü

5. TARTIŞMA

Antalya ilinde yetişen Siyah Alaca ırkından alınan 200 adet örnekte CVM kalıtsal hastalığının varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada sığırlarda 3. kromozom üzerinde bulunan SLC35A3 geninin 395 bp uzunluğundaki parçası her bir örnekte başarıyla çoğaltılmıştır. Çoğaltma esnasında mutant ve yabanıl gen bölgesinin çoğalmasını sağlayan primerler ve her iki primer için ortak reverse primer kullanılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jele yüklenmiş ve UV ışık altında görüntülenmiştir. 200 denek üzerinden yapılan değerlendirmede 7 adet CVM taşıyıcısı birey saptanmıştır. Taşıyıcı hayvanların oranı %3,5 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar Meydan' ın (2010) çalışmasıyla benzerlik göstermiştir. Meydan' ın 350 örnek üzerinden yapılan çalışmasında taşıyıcı hayvanların oranı % 3,4 olarak bildirilmiştir. Bu oran dünyanın farklı ülkelerinden bildirilen oranlara göre çok düşüktür. Dünyada bildirilen oranlar Danimarka (% 31,0) (Agerholm 2004), Polonya (% 24,8) (Ruoæ 2007), Japonya (%32,5) (Nagahata 2009) ve İsveç (% 23,0) (Berglund 2004) olarak bildirilmiştir. Bu hastalığın frekansının yurtdışında yüksek olmasının nedeni hasta yavruların pedigrileri incelendiğinde ortaya çıkmıştır. Hasta yavruların 1974 yılında ABD'de doğan ve üstün verim özellikleri nedeniyle tüm dünyada suni tohumlamada yaygın olarak kullanılan Carlin-M Ivanhoe Bell isimli boğa ile akraba oldukları belirlenmiştir(Agerholm 2004,Shütz 2008).

Yapılan çalışmalarla ilgili taramalarda bu CVM taşıyıcısı hayvanları belirlemek için birçok PCR yöntemi kullanılmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda Kulaklı (2011) PCR-RFLP yöntemini kullanırken Meydan (2010) DNA sekans analizi yöntemini kullanmıştır. Yurtdışında yapılan çalışmalarda çoğunlukla PCR-RFLP yöntemi kullanılmış ancak bu yöntem en az iki PCR işlemi gerektirdiği için iş yükünü arttırmıştır. Bunun yanında PCR-PIRA yöntemi de kullanılırken Ghanem (2007) çalışmamızda olduğu gibi AS-PCR yöntemini kullanmıştır. AS-PCR yöntemi bu çalışmada tek PCR ve tek elektroforez işlemiyle gerçekleştiği için iş gücünde ve zamanda kazanç sağlamaktadır. Bu sayede kısa zamanda daha çok örnek üzerinde çalışmaya olanak sağlar.

6. SONUÇLAR

Hayvan yetiştiriciliğinde ıslah çalışmaları hayvanların evcilleştirilmesiyle başlamıştır. İnsan yaşamı boyunca birim hayvandan daha fazla ürün elde etmeyi amaçlamıştır. Bu bağlamda hayvan yetiştiriciliğinde yapılan ıslah çalışmaları sonucunda süt verimi, döl verimi gibi özellikler her geçen gün artmaktadır. Hayvan ıslahında çevresel faktörlerin sürü üzerine etkisi kısa sürede yansımaktadır. Ancak genetik yapılarıdaki değişim uzun süren ıslah çalışmaları sonucunda olumlu sonuçlanabilir.

Genetik çalışmalar sonucu kalıtsal olumlu özelliklerin yavrulara aktarıldığını bildiğimiz gibi bazı kalıtsal hastalıklarında yavrulara aktarıldığını unutmamamız gerekiyor. Irk ıslahında dünyada en çok kullanılan yöntem suni tohumlamadır. Suni tohumlama ile üstün verim özelliklerine sahip bir boğadan çok sayıda üreticinin faydalanması sağlanmıştır. Ancak suni tohumlamada kullanılan boğaların kalıtsal hastalıklardan ari olmasına dikkat edilmelidir. Bu yöntemle yüksek verim özellikleri aktarabildiği gibi ölümcül kalıtsal hastalıklarda ileri kuşaklara aktarılabilir.

Yüksek verimliliğin yetiştiriciler için çok önemli olduğu önemli bir gerçektir. Ancak kalıtsal hastalıklar yüzünden meydana gelebilecek ölü doğum ile kaybedilen ürün miktarı kazanılandan çok daha fazla olacaktır. Sığırlarda gebelik süresi 280 gündür ve doğumdan sonra en az iki ay bir dinlendirme süresi uygulanmalıdır. Bu durumda bir sığır yılda bir kez doğum yapacağı için bu konuda çok dikkatli olunmalıdır. Doğum veya öncesinde oluşabilecek bir olumsuzluk bir yıl kayıp edilmesine neden olacaktır.

CVM, öldürücü kalıtsal bir hastalıktır. Bu nedenle populasyonlarda bu genin frekansının azaltılması çok önemlidir. Yurtdışında yapılan çalışmalarda hasta buzağlarının pedigrileri incelendiğinde Carlin-M Ivanhoe Bell isimli tüm dünyada suni tohumlamada kullanılan bir boğa ile akraba oldukları saptanmıştır. Bu sebepten suni tohumlamada kullanılan boğaların genetik hastalıklar açısından geniş kapsamlı araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada Antalya yöresinde yetiştirilen Siyah Alacalarda CVM kalıtsal hastalığının varlığı araştırılmıştır. Araştırmanın, Meydan vd. (2010) tarafından yapılan çalışmayla benzerlik göstermesi bu hastalığın yurtdışındaki kadar olmasa da ülkemizde de varlığının bir göstergesi olmuştur. Bu hastalığın oluşturabileceği olumsuz sonuçlardan etkilenmemek için daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılmalı ve taşıyıcı hayvanların belirlenerek sürüden uzaklaştırılmaları sağlanmalıdır. Taşıyıcı olarak belirlenen hayvanlar gerekli birimlere bildirilmiş ve bu hayvanların üremelerinde gerekli önlemlerin alınması sağlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Adamov, N., Mitrov, D., Esmerov, I. and Dovc, P. 2014. Detection of recessive mutations (BLAD and CVM) in Holstein-Friesian cattle population in Republic of Macedonia. *Mac. Vet. Rev.*, 37 (1): 61-68.
- Alaie, H., Mirhoseini, S. Z., Mehdizadeh, M. and Dalirsefat, S. B. 2012. Identification of Complex Vertebral Malformation carriers in Holstein and Guilan native cow breeds in Iran using SSCP markers. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2(4): 319-322.
- Avanus, K. and Altinel, A. 2017. Comparison of allele-specific PCR, created restriction-site PCR, and PCR with primer-introduced restriction analysis methods used for screenin complex vertebral malformation carriers in Holstein cattle. *J. Vet. Sci.*, 18 (4): 465-470.
- Anonim 1: <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/HAYGEM.pdf> [Son erişim tarihi: 01.02.2019].
- Anonymous 1: https://en.wikipedia.org/wiki/Holstein_Friesian_cattle [Son erişim tarihi: 01.02.2019].
- Agerholm, J.S., Bendixen, C., Andersen, O., and Arnbjerg, J., 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13: 283-289.
- Agerholm JS, Andersen O, Almskou MB, Bendixen C, Arnbjerg J, Aamand GP, Nielsen US, Panitz F., and Petersen AH, 2004. Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies. *Acta Vet Scand*, 45: 133-137.
- Berglund, B., Persson, A., and Stalhammar, H., 2004. Effects of complex vertebral malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. *Acta Vet. Scand.*, 45: 161-165.
- Citek, J., Rehout, V., Hajikova, J., and Pavkova, J. 2006. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 51(6): 333-339
- Citek J, Rehout V, Vecerek L, and Hajkova J (2007). Genotyping glycogen storage disease type II and type V in cattle reared in the Czech Republic. *J. Vet. Med.*, 54, 257-259.
- Duncan, R.B., C.B. Carrig, and Agerholm J. S. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf : Report of a case in the USA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13: 283-289.
- Gentile A., and Testoni S. 2006. Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov. Vet. Res.* 43: 17–29.
- Ghanem ME, Akita M, Suzuki T, Kasuga A., and Nishibori M, 2008. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. *Anim Reprod Sci*, 103: 348-354.
- Hemati, B., Gharai-Fatbahad, S., Fazeli, M. H., Namvar, Z. and Ranji, M. 2015. Investigation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) and Complex Vertebral Malformation (CVM) in a population of Iranian Holstein Cows. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5 (1): 69-72.

- Kotikalapudi, R., Patel, R. K., Sunkara, P. H. S. and Roy, A. 2013. Detection of silent homozygous polymorphism in exon 4 of SLC35A3 gene in a Holstein cattle carrier for Complex Vertebral Malformation. *Inter J. Vet. Sci.*, 2(2): 61-64.
- Kulaklı, A. Kayseri Bölgesinde Yetiştirilen Holştayn Sığırlarında Kompleks Vertebral Malformasyon Hastalığı Geninin Allel Frekansının Belirlenmesi Erciyes Üniv Vet Fak Derg 8(2) 69-74, 2011 G.N. B M. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 8(2) 69-74, 2011
- Kumlu S. 1999. Damızlık ve Kasaplık Sığır Yetiştirme. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Setma Matbaacılık, ISBN: 975-96864-0-6. Antalya
- Mahdipour, M., Sharma, A., Dubey, P. P, Kumar, V., Misra, B. and Singh, A. (2010). Identification of Complex Vertebral Malformation using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis in Karan Fries bulls. *Current Trend in Biotch. Pharm.* 4 (4): 850-854.
- Meydan, H., Yildiz, M. A. and Agerholm, J. S. 2010. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52: 56.
- Miller, S., Dykes, D. and Plesky, H.A. 1988. Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Cells. *Nucleic Acids Research*, 16 (3): 1215.
- Nagahata H, Oota H, Nitani A, Oikawa S, Higuchi H, Nakade T, Kurosawa T, Morita M., and Ogawa H, 2002. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *J Vet Med Sci*, 64(12): 1107-1112.
- Rezaee AR, Nassiry MR, Valizadeh R., and Tahmoorepour M, 2008. Study of complex vertebral malformation disorder in Iranian Holstein bulls. *World Journal of Zoology*, 2(2): 36-39.
- Revell, S., 2001. Complex vertebral malformations in a heterozygotes were diagnosed [16]. Holstein calf in the UK. *Vet Rec.*, 149: 659-660.
- Ruoeæ A., and Kaminski S, 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet* 48(3): 247-252.
- Schütz E, Scharfenstein M., and Brenig B, 2008. Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the Holstein population. *J Dairy Sci*, 91: 4854- 4859.
- Takeda, S., Ichii, S. and Nakamura, Y. 1993. "Detection of K-ras mutations in sputum by mutant allele specific amplification (MASA). *Human Mutation* 2: 112.
- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A. H., Holm, L. E., Nielsen, V. H., Agerholm, J. S., Arnbjerg, J., and Bendixen, C. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-Nacetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Reserch*, 16, 97–105.
- Trukhachev, V., Oleynik, S., Zlydnev, N. and Morozov, V. 2017. Screening of Complex Vertebral Malformation (CVM) and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in the Ayrshir cattle breed in the North Caucasus. *Proceedings of the 8th International Scientific Conference Rural Development 2017*.

- Wang, C. et. al. 2011. Identification of complex vertebral malformation carriers in Holstein cattle in South China. *Genet. Mol. Res.*, 10 (4): 2443-2448.
- Wouda, W., Visser, I. J., Borst, G. H., Vos, J. H., Zeeuwen, A. A. and Peperkamp, N.H. (2000). Developmental anomalies in aborted and stillborn calves in The Netherlands. *Veterinary Record*, 147: 612-612.
- Zhang, Y., Fang, X., Sun, D., Wang, Y., Yu, Y., Xie, Y., Zhang, S., and Zhang, Y. 2012. A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3:24

ÖZGEÇMİŞ

Murat Gökçe EREN

neretarum@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2005-2010	Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Antalya