



**KONYA İLİNDE YETİŞTİRİLEN HOLSTEİN ve HOLSTEİN
MELEZİ SIĞIRLARDA HH1 MUTASYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Serdar DEMİR
Yüksek Lisans

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk Lenger

Tez No: 2024-028

Afyonkarahisar

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Konya İlinde Yetiştirilen Holstein ve Holstein Melezi Sığırlarda HH1
Mutasyonunun Araştırılması**

Hazırlayan
Serdar DEMİR

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGİR

Tez No: 2024-028

AFYONKARAHİSAR
2024

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir.**
Proje No: “23.SAĞ.BİL.01”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	SERDAR DEMİR
	Numarası	213321001
	Anabilim Dalı	Medikal Biyoloji ve Genetik
	Programı	Medikal Biyoloji ve Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı
	Program Düzeyi	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
Tezin Başlığı		Konya İlinde Yetiştirilen Holstein ve Holstein Melezi Sığırlarda HH-1 Mutasyonunun Araştırılması
Tez Savunma Sınav Tarihi		12.07.2024
Tez Savunma Sınav Saati		10:30

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

../.../2024

Serdar DEMİR

ÖZET

Konya İlinde Yetiştirilen Holstein ve Holstein Melezi Sığırlarda HH1 Mutasyonunun Araştırılması

Modern süt sığırcılığı endüstrisinde, yüksek verimli hayvanların kullanılması sonucunda doğurganlığının azalması önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bilindiği üzere, suni tohumla yoluyla yüksek verimli boğalarla çok kısa bir süre içinde mutasyonlar tüm dünyaya yayılmıştır. Bu genetik mutasyonların özellikle gebeliğin ilk üç ayında embriyonik ölümlerden sorumlu ve büyük ekonomik kayıplara neden oluğu düşünülmektedir. Mutasyonlara bağlı erken embriyonik kayıplar, ve abortlar görülmektedir. Oluşan mutasyon, sığırların herhangi bir fonksiyonel geninde meydana gelirse ölüme yol açabilmektedir. Bu araştırmada, Konya bölgesinde özel bir işletmeden, Holstein ve Holstein melezi sığır ırklarına ait olan 300 baş hayvandan alınan kan örneği üzerinde çalışılmıştır. Örneklerin cinsiyet dağılımı %83,33 dişi ve %16,97 erkek şeklindedir. Çalışmada embriyonik ölümle ve yavru atmayla ilişkili olan APAF1 geninde HH1 mutasyonu saptanmaya çalışılmıştır. HH1 mutasyonu tespit edebilmek için ARMS-PCR tekniği kullanılmıştır. Çalışmada, toplam 300 örnek üzerinde jel elektroforez yöntemi uygulanmış ve bunların 287'sinden sonuç alınmıştır. Sonuç alınan örneklerin %76,31'i homozigot, %23,69'u ise heterozigot olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada, heterozigot ve homozigotluğun ırk ve cinsiyet üzerinde önemli bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: APAF1 Mutasyon, ARMS-PCR, HH1, Holstein Sığır

SUMMARY

The Study of HH1 Mutation in Holstein and Holstein Crossbred Cattle Raised in the City of Konya

In the modern dairy industry, the decrease in fertility as a result of the use of high-yielding animals is a significant problem. As it is known, mutations spread around the world in a very short time with high-yielding bulls through artificial insemination. These genetic mutations are known to be responsible for embryonic deaths, leading to significant economic losses, especially in the first three months of pregnancy. Mutations cause early embryonic losses and abortions. If a mutation occurs in any functional gene of cattle, it can lead to death. In this research, 300 blood samples from Holstein and Holstein hybrid cattle breeds were taken from a private enterprise in the Konya region and studied. The gender distribution of the samples is 83.33% female and 16.97% male. The study attempted to detect the HH1 mutation in the APAF1 gene, which is associated with embryonic death and abortion. ARMS-PCR technique was used to detect HH1 mutation. In the study, the gel electrophoresis method was applied to a total of 300 samples, and results were obtained from 287 of them. 76.31% of the samples were found to be homozygous, and 23.69% were heterozygous. This study found that heterozygosity and homozygosity had a significant effect on race and gender.

Keywords : APAF1 Mutation, ARMS-PCR, HH1, Holstein Cattle

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı yaparken gösterdiği sürekli destek, sabır ve öğretici tecrübeleriyle aklıma takılan her türlü konuda desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ö. Faruk LENGER' e, laboratuvar çalışmalarımda engin bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren takıldığım yerde çözüm üreten değerli hocam Sayın Prof. Dr. Metin ERDOĞAN' a, akademik eğitimimin başlamasından itibaren bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, paylaştığı tecrübeleri ile öğrenme ve araştırma azmimi artıran değerli hocam Sayın Prof. Dr. Cevdet UĞUZ' a, tez çalışmalarım boyunca bilgi birikimiyle ve hoşgörülü davranışlarıyla motivasyonuma katkıda bulunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mine DOSAY AKBULUT' a, takıldığım her şeyi çekinmeden sorabildiğim ve laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan değerli hocam Sayın Arş. Gör. Eda DEMİRTAŞ'a, minnet duygularımı ve sonsuz şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Elif Tuğçe SAMSUNLU arkadaşşıma da laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olduğu için teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştirip bu günlere getiren ve her daim desteklerini benden esirgemeyen anne ve babam Sayın Fatma ve İsmail DEMİR' e, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı 23.SAĞ.BİL.01 proje numarasıyla destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Serdar DEMİR

Afyonkarahisar

2023

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
SUMMARY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Sığırcının kökeni	3
2.2. Holstein Frisian Irkının Kökeni	4
1.3.Holstein Frisian Irkının Türkiye’de Yayılması	5
1.4.Holstein Frisian Irkının Fiziksel özellikleri	6
1.5.Gen Haritalama	6
1.5.1. Homozigotluk Haritalaması (Otozigot Haritalama)	6
1.6.Kalıtsal Hastalıkların Fenotip Olarak İfade Edilmesi	7
1.7.Holştayn Haplotipler (HH)	9
1.7.1. HH0	11
1.7.2. HH1	12
1.7.2.1.HH1 Haplotip Tespiti	14
1.7.2.2.APAF1	15
1.7.3. HH2	16
1.7.4. HH3	16
1.7.5. HH4	17
1.7.6. HH5	17
1.7.7. HH6	18
1.7.8. HH7	18
2. MATERYAL METOT	20
2.1.Materyal	20
2.1.1. Hayvan Materyali	20
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	20
2.1.2.1.PCR Cihazı	20
2.1.2.2.Yatay Elektroforez Sistemi	21
2.1.2.3.Jel Görüntüleme Sistem	22
2.2.Metot	22
2.2.1. Kanların Toplanması ve Saklanması	22

2.2.2. DNA İzolasyonu	23
2.2.3. Primer Tasarımı	24
2.2.4. Gradient PCR	24
2.2.5. ARMS-PCR	25
2.2.6. Jel Elektroforez	28
3. BULGULAR	29
3.1.Gradient PCR Bulguları	29
3.2.ARMS-PCR Bulguları	29
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	32
4.1. İstatistiksel Analiz Bulguları	33
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7. KAYNAKÇA	47
ÖZGEÇMİŞ	52
EK-1	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

APAF1:	Apoptotik Peptid Aktive Edici Faktör 1
ARMS-PCR:	Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi
ASPCR:	Alelel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BLAD:	Sığır Lökosit Bağlanma Yetmezliği
BTA:	Bos taurus otozom
CENPU:	Sentromer proteini U
CVM:	Kompleks Vertebral Malformasyon
dATP:	Deoksiadenozin Trifosfat
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP:	Deoksinükleotit Tri Fostat
DSYMB:	Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği
DUMPS:	Üridin Monofosfat Senteaz Eksikliği
EDTA:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
HF:	Holstein Friesian
HH:	Holstein Haplotip
ID:	Holstein Cinsi Kimlik Numarası
GART:	Glisinamid Ribonükleotid Transformilaz Proteini
KASP:	Kompetitive alel-spesifik PCR
MgCl ₂ :	Magnezyum Klorür
mf-ARMS:	multipleks floresan amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi
M.Ö.:	Milattan Önce
PCR:	polimeraz Zincir Reaksiyon
RFLP:	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
rpm:	Dakikadaki Devir Sayısı
SLC35A3:	Çözünen Taşıyıcı Aile 35, Üye A3
SNP:	Single Nucleotid Polymorphism

TAE: Tris Asetat Edta

TM: Mealting Temprature

Singeler

cm: Santimetre

kg: Kilogram

gr: Gram

°C: Santigrat Derece

%: Yüzde

sn: Saniye

dk: Dakika

µl: Mikrolitre

mM: Milimolar

ml: Mililitre

mg: Miligram

bç: Baz Çifti

kb: Kilobaz

mb: Megabaz

χ^2 : Ki- Kare Testi

p: Anlamlıklık Testine İlişkin Olasılık Değeri

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo1.1: Holştein haplotiplerinin ilk tespit edilen babaları ve etkilenen genler	11
Tablo 1.2: Farklı Ülkelerde HH1'in Yaygınlığı	15
Tablo 1.3: Holştein Haplotiplerinin Embriyo Kayıpları ve Abort Günleri	19
Tablo 2.1: HH1 bölgesinin Gradient PCR'ını belirlemek için kullanılan PCR ürünleri	25
Tablo 2.2: HH1 bölgesinin ARMS PCR ürünleri	27
Tablo 2.3: HH1 bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR protokolü	27
Tablo 4.1: Holstein Sığırların Bireysel Özelliklerine İlişkin Bulgular	33
Tablo 4.2: Saf kan/Melez Dağılımının Cinsiyet ve Heterozigot/homozigotluğa Göre Karşılaştırılması	34
Tablo 4.3: Aylık Yaş, Tohumlama Sayısı ve Laktasyon Sayısının Saf/Melez'e Göre Karşılaştırılması	35
Tablo 4.4: Aylık Yaş, Tohumlama Sayısı ve Laktasyon Sayısının Gruplar Halinde Saf/melez'e Göre Karşılaştırılması	36
Tablo 4.5. Aylık Yaş, Tohumlama Sayısı ve Laktasyon Sayısının Gruplar Halinde Heterozigot/homozigotluğa Göre Karşılaştırılması	37
Tablo 4.6. Saf/melez ve Cinsiyet Dağılımının Heterozigot/homozigot Göre Karşılaştırılması	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: HH1'in bulunduğu boğalar için soyağacı bilgileri	13
Çizelge2.1: HH1 ARMS-PCR Primer tasarımları	24
Çizelge 3.1: Saf Kan/Melez Hayvanların Homozigot/Heterozigotluk Dağılımı	31
Çizelge 3.2: Saf kan ve melez hayvanların cinsiyet dağılımı	31
Çizelge 3.3: Homozigotlu/Heterozigotluğun Cinsiyete ve Saf kan/Melez Olmasına Göre	32



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1: Bereketli Hilal Şeridi (İnt. Kyn. 1)	3
Resim 1.2: Bos Taurine ve Bos Indicine'in Sığırları.	4
Resim 2.1: PCR Cihazı	21
Resim 2.2: Elektroforez Sistemi	21
Resim 2.3: Jel Görüntüleme Sistem	22
Resim 3.1: HH1'in Gradient PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü	29
Resim 3.2: HH1'in ARM-PCR Jel Elektroforez Görüntüsü	30

1. Giriş

Sığır yetiştiriciliğinde, ekonomik özelliklerin geliştirilmesinde ve daha iyi duruma getirilmesinde rolü olan moleküler genetik tekniklerine ve bu alanda yapılan araştırmalara olan ilgi artmıştır. Hayvancılığın genetik alanındaki esas gelişimi, üstün fenotiplere sahip olan hayvanların seçici olarak yetiştirilmesine bağlı olmaktadır (Singh vd., 2014).

Hayvansal üretimin temel amacı, hayvanların genetik özelliklerini geliştirerek daha fazla verim elde etmektir (Hayes vd., 2013). Geleneksel hayvan yetiştirme araçlarıyla birlikte moleküler genetik tekniklerin kullanılması, seçim sürecini dengelemek ve dolayısıyla hayvan yetiştirme programını optimize etmek için önem taşımaktadır (Singh vd., 2014).

Kalıtsal bir hastalığın moleküler mekanizmasının bilinmesi, hastalığın sürüden eradikasyonu ve o kalıtsal hastalık bakımından ari sürülere sahip olabilmek için büyük önem taşımaktadır (Citek vd., 2006). Bu bağlamda, moleküler belirteçlerin kullanımı oldukça öneme sahip olmaktadır (Singh vd., 2014). Bu test yöntemleri kullanılarak popülasyonlardaki genetik sağlığın kontrol edilmesi sağlanabilmektedir. Kalıtsal bozuklukların moleküler temeli bilindiğinde, heterozigot taşıyıcıların doğumdan sonra ve hatta embriyo iken gen düzeyinde doğrudan tespit edilmesi mümkündür. Bununla birlikte, sitogenetik anomalilerin taşıyıcılarının tespiti kalıtsal bozuklara sahip olan hayvanların üremeye kullanılmamasına ve dolayısıyla popülasyonda genetik sağlığın korunmasına olanak sağlamaktadır (Citek vd., 2006).

Holşttein ırkında süt üretimine yönelik genetik seçilimin, doğurganlık özelliklerini ve hastalığa direnç genlerini olumsuz yönde etkileyen genom modifikasyonlarına yol açtığını göstermiştir (Brito vd., 2021)

Dişi doğurganlığının zaman içinde düzenli olarak azalması, modern süt sığırcılığı endüstrisinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. (Fritz vd., 2013).

Süt sığırlarının üreme performansı son yirmi yılda önemli ölçüde iyileşme gösterse de, mevcut süt sığırlarında standartların (1 yılda 1 buza) altında üreme mevcuttur ve bunun da süt endüstrisinde büyük mali kayıplara yol açtığı görülmüştür (Rezende

vd., 2018). Sığır ırkında üreme performansı, sığırın sağlığı, erkek ve dişi doğurganlığı, östrus döngülerinin düzensizliği, anovulasyon ve tohumlama sonrası embriyo kaybı, sürü yönetimi, beslenme, buzağılama özellikleri ve çevre gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Hansen 2011, Berry vd., 2014). Bu gibi faktörlerden dolayı, özellikle ineklerde üreme performansı kalıtım derecesi % 0,02 – 0,04 olarak belirlenmiştir (Berry vd., 2014).

Sığırların üreme performansında azalmaya neden olan fizyolojik ve genetik faktörler moleküler biyoloji yöntemleriyle ortaya çıkarılabilir (Butler, 2013). Tüm genom boyu ilişki analizleri, doğurganlığa ve ölü doğuma etki eden çekinik bozuklukları bulmak için kullanılmaktadır (Glusman vd., 2014; VanRaden vd., 2011a). Bu yöntemler, çok sayıda bireye yönelik genotipleri, haplotipleri ve öldürücü resesif genlerin yerini belirlemek için yeni bir yöntem sağlamaktadır. Tahmini etkileşim başına çok az gözlem olması nedeniyle, çok büyük fenotipik ve soyağacı verileri olsa bile, genomik veriler olmadan embriyo kaybına neden olan kusurların tespit edilmesi zor olmaktadır (VanRaden ve Miller, 2006).

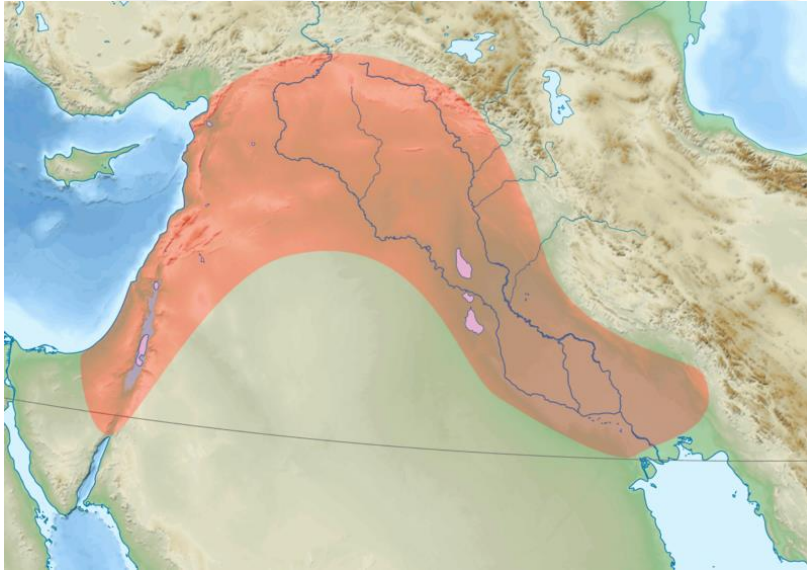
Holştayn ırkı sığırlarda erken embriyonik ölümlere ve atıklarla sonuçlanan haplotipler bulunmuştur. (Fritz vd., 2013, Schütz vd., 2016). Haplotip testleri, farklı sığır ırklarında, yapılan araştırmalarda bulunan bir kaç SNP (tek nükleotid polimorfizmi) değerleri keşfedilerek bilinmeyen resesif bozuklukları bulmak için uygulanmıştır. Bulunan bu haplotiplerden en az yedi adedi nedensel mutasyonlar sebebiyle aday genlerde belirlenmiştir (Schütz vd., 2016). Bunlardan HH1 (APAF1), HH4 (GART) ve HH5 / HH6 (SLC35A3) genlerinde bu duruma neden olan SNP'ler tespit edilmiştir (Fritz vd., 2013). Yapılan tüm bu çalışmalara rağmen yine de ölümcül haplotipler için araştırmalara devam edilmektedir (Schütz vd., 2016).

Bu çalışmamızda farklı ülkelerdeki sığır popülasyonlarında varlığı belirlenen Holştayn Haplotip-1 kalıtsal kusurunun, Konya ilinde yetiştirilen Holştayn ve Holştayn melezi sığır popülasyonundan alınan örnekler kullanılarak incelenmiştir. Tamamlanan araştırma ile Konya bölgesinde süt sığırları yetiştiriciliğinde diğer hastalıklara ek olarak tehdit oluşturan kalıtsal hastalık olan Holştayn Haplotip-1 (HH1), Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi PCR (ARMS-PCR) yöntemi

kullanılarak araştırılmış ve sağlıklı sürüler elde edilebilmesine fayda sağlamak amaçlanmıştır.

1.1.Sığırın Kökeni

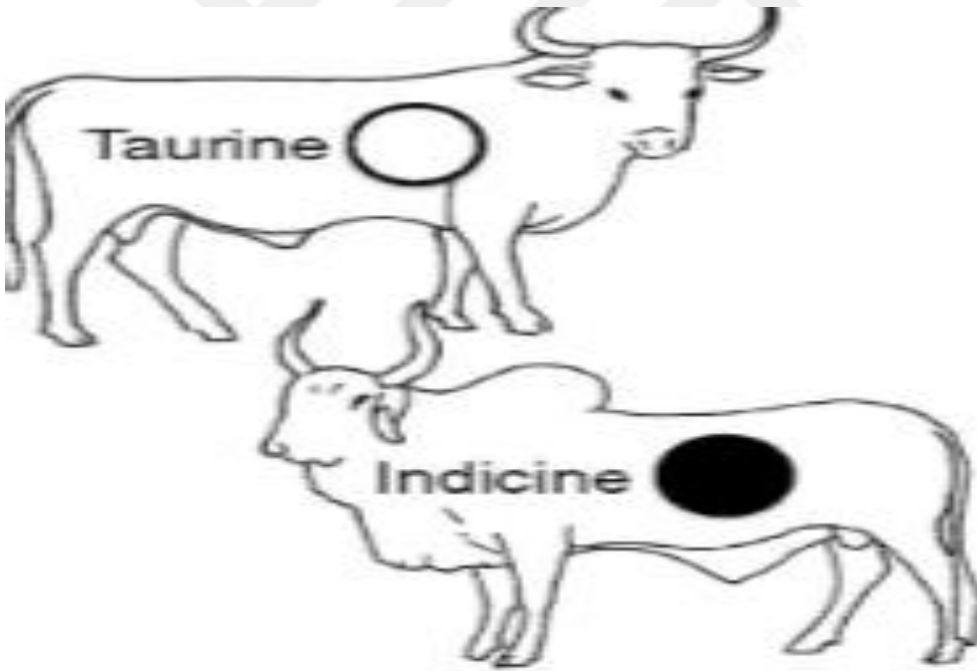
Jeolojik devirler içerisinde yer alan Geç Pleistosen (geç buzul devri) ile erken Holosen arasında en yaygın görülen sığır türü, Kuzey Afrika'dan Avrasya'nın Atlantik ve Pasifik kıyılarına kadar uzanan yaban öküzünün (*Bos primigenius*) yaşam alanını oluşturmaktadır. (Zeuner, 1963). Yapılan arkeolojik ve genetik çalışmalar kullanılarak Taurine sığırlarının (*Bos taurus*) atalarının, 10 000 yıldan daha fazla bir süre önce, Neolitik dönemde (civalı taş devri) Bereketli Hilal (resim-1.1.) diye adlandırılan yerde *Bos primigenius primigenius*'tan evcilleştirildiğini göstermektedir (Bruford vd., 2003 ; Ajmone-Marsan vd., 2010).



Resim 1.1: Bereketli Hilal Şeridi (İnt. Kyn. 1)

İndicine sığırların (*Bos indicus*) ataları, İndus Vadisi'nde *Bos primigenius nomadicus*'tan, evcilleştirildiğini göstermektedir (Loftus vd., 1994). Evcilleştirilmiş sığırların iki ana soyunun da aynı ata tür olan yaban öküzünden evcilleştirilmesi ile meydana gelmişlerdir (Zeuner, 1963). Evcilleştirilmiş sığırlar insanlarla birlikte dünyanın dört bir yanına yayılmıştır.(McTavish vd., 2013) Bu iki gruba sırasıyla taurine ve indicine sığırları diyebiliriz. Bahsedilen gruplar arasındaki en belirgin farklılıklar, indicine'in omuzlardaki gözle görülür kamburluk ve hörgüç, taurine

sığırlarındaki gibi dik kulaklarından ziyade sarkık kulaklarının olmasıdır (Grigson 1991). Avrupa sığır ırkları büyük ölçüde taurine kökenliken, Hindistan yarımadasındaki sığırlar indicine kökenlidirler (Frisch ve Vercoe 1977). Avrupa taurine sığırları, kullanım kolaylığı ve uysallıklarının yanı sıra süt ve et üretimi için daha yoğun bir seçime tabi tutulmuştur (Freeman vd., 2004, MacHugh vd., 1997). Genel olarak indicine sığırlar, yem stresine ve su stresine daha toleranslıdır ve taurine ırklarına kıyasla tropikal ortama daha fazla uyum sağlarlar (Frisch ve Vercoe 1977). Evcilleştirilen Taurine sığırları evcilleştirildikten sonra kuzeybatıya, Bereketli Hilal'den Türkiye üzerinden Balkanlar'a ve kuzey İtalya'ya, ya Akdeniz kıyı şeridini ya da kısmen Tuna Nehri boyunca uzanan bir rotayı takip ederek ardından Avrupa'ya hızla dağılmışlardır (Beja-Pereira vd., 2006, Pellecchia vd.,2007). Bos taurine ve Bos indicine resim-1.2'de gösterilmiştir.



Resim 1.2: Bos Taurine ve Bos Indicine'in Sığırları. (McTavish vd., 2013)

1.2.Holstein Frisian Irkının Kökeni

Bos Taurus primigenus, Holştayn (Siyah alaca) ırkının atasıdır. Ana vatanı Holanda'nın Frizya bölgesidir. Bu ırka, Almanya da bulunan Holstein eyaleti ismini vermiştir ve siyah-beyaz alaca sığır buraya Frizya bölgesinden gelmiştir. Tarihi

belgeler sayesinde Holştayn ırkının M.Ö. 350 senelerinde Frizya’da yetiştirildiği anlaşılmaktadır. Bölgenin yapısı ve özellikleri nedeniyle günümüze kadar Frizya’ya yabancı sığır ırkı sokulmamış böylece Frizya ırkı saflığını koruyabilmiştir. Hollanda’da 1879 yılında, siyah-beyaz alaca sığırı yetiştiricilerini bir araya getirmek için Frizya soy kütüğü derneği kurulmuştur. Dernek kurulmadan önceki seleksiyon çalışmaları dağınık şekilde yapıla gelmiştir. Dernek kurulduktan sonra ise seleksiyon çalışmalarının düzenli ve bilimsel biçimde uygulanmasını sağlamıştır (Alan ve Arpacık, 1998).

1.3.Holstein Frisian ırkının Türkiye’de Yayılması

Türkiye’de Holstein Frisian ırkının adı, Holanda ırkı ve Holştayn isimleri kullanılarak ifade edilmektedir. İsimde birliğin sağlanması için siyah-beyaz alaca isminin kullanılması daha yerinde olacaktır (Alan ve Arpacık, 1998). Türkiye’de 1958 yılında sistemli olarak siyah-beyaz alaca ırkı yetiştiriciliğine sadece kamu kurumlarında başlanmıştır (Alan ve Arpacık, 1998; Kumlu, 1999). O yıl 30 dişi ve 1 erkek Holstein dana Amerika’dan getirilerek, siyah alaca sürüsü Karacabey harasında kurulmuştur.

1986 yılından itibaren, Tarım ve Orman Bakanlığı ve bazı özel şirketler tarafından yaklaşık 300 000 gebe düve ülkemize getirildi. Bu düvenlerin büyük bir çoğunluğu Siyah-Alaca ırkı olarak ülkemize girişi sağlanmıştır (Akman, 1998; Kumlu, 1999). Siyah-Alaca sığırlarının sayısı, dış ticarete sağlanan teşviklerin katkısıyla, son zamanlarda sayılarının oldukça artmakta olduğu gözlenmiştir. Bu gelişimden faydalanmak ve bu gelişmeye teşvik gerçekleştirmek için özellikle 1990 yılından başlayarak Türk-Alman ve Türk-İtalyan ülkeleri ile işbirliği yapılmıştır. Bu gelişim neticesinde Siyah-Alaca sığırlarında soy kütüğü oluşturmak ve verim kayıtlarını tutmak için birçok projeler yapılmıştır ve 1995 yılında bu projelere yönelik olarak Holştayn Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birlikleri ilk kez kurulmuştur (Kumlu ve Akman 1996). İllerde bulunan bu birliklerden bir kısmı birleşerek 1998 yılında, Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği’ni (DSYMB) oluşturmuşlardır (Kumlu, 1999). Tarım ve Orman Bakanlığının desteğini de alarak, Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği, “Ulusal Siyah-Alaca Damızlık Sığır Yetiştirme Programını” uygulamaya koymuştur (Kumlu, 1999; Kumlu ve Akman, 1999).

1.4.Holstein Frislean Irkının Fiziksel özellikleri

Holştayn sığırı fiziksel özellikler bakımından sütçü kapasiteye uygundur. Beden yapısı, önden arkaya doğru bakıldığında vücut genişler ve derinlikte artar bununla beraber baş asil ve zarif, deri ince ve yumuşak olup boyunda vertikal kıvrımlar yapar. Tüyleri kısa ve parlaktır. Sırt bel ve sağrı düzgün bir hat şekillindedir. Kemik yapısı sağlam ve düzgün duruşa sahiptir. Memelerin genel görünümü, büyük, yumuşak ve iyi şekillenmiş olup önce karının alt bölgesinden arkaya yukarıya doğru düzgün bir şekilde uzanarak bağlanmıştır. Karnın altında bulunan süt damarlarının uzun ve belirgin oluşu sütçülük kabiliyetini göstermektedir. Diğer sütçü ırklara göre cidago yükseklikleri daha uzundur (Cidago yükseklikleri 140-155 cm). Vücut ağırlıkları 600-1000 kg kadar olan bu ırkın yılda ortalama 305 günlük süt verimi diğer sütçü ırklara göre %5,6-8,6 oranında daha fazla olduğu görülmektedir (Alan ve Arpacık, 1998, Özkök ve Uğur., 2007; Yaylak vd., 2015; İnt. Kyn. 2).

1.5.Gen Haritalama

Genetik haritalama, genomun matematiksel analizi olarak da bilinir ve genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerini bulmak için moleküler teknikler ve istatistiksel analizleri kullanılmaktadır. Genlerin lokalizasyonu ve işlevleri arasında bağlantı kurmak için genetik haritalama kullanılmaktadır (Boyacıoğlu ve Dündar, 2012)

1.5.1. Homozigotluk Haritalaması

Otozigotluk, homolog kromozomların her ikisinin de aynı orijinden gelmesi durumuna denir. Akraba evliliği yapan ailelerden gelen çekinik karakterde bir hastalık taşıyan bireyler, hastalık lokusu ile bağlantılı olan markırlar açısından yüksek bir olasılıkla otozigottur. Lokos heterojenitesi nedeniyle başka türlü çözülmesi neredeyse imkansız olan otozomal resesif hastalıkların tespitinde bu yöntem başarılı olarak kullanılmaktadır (Forsheve ve Johnson, 2004, Woods vd., 2004).

Homozigotluk haritalaması adı verilen yeni bir yaklaşım, sığır ırklarında, doğurganlığı etkileyen haplotipler olarak tanımlanan, fetal ve erken postembriyonik mortaliteyle ilişkili genom bölgelerinin tanımlanmasında homozigotluk haritalaması

yöntemi kullanılmaktadır. Damızlık sığır popülasyonlarındaki geniş yayılmaları nedeniyle, doğurganlığı etkileyen haplotipler, ineklerde doğurganlığın azalmasının ana nedenlerinden birini oluşturmaktadır. Başta sığırlar olmak üzere hayvanların yapısal ve fonksiyonel genomu üzerine yapılan araştırmaların hızla arttığı göz önünde bulundurularak yakın gelecekte yeni genetik kusurların keşfedilmesi beklenebilir. Bu nedenle DNA teşhisi, damızlık hayvan popülasyonlarında genetik kusurların yayılmasından kaynaklanan risklerin izlenmesinde ve yönetilmesinde etkili bir araç haline gelebilecektir. Homozigotluk haritalama tekniği kullanılarak belirlenen kusurlar doğurganlık haplotipleri olarak belirlenmektedir. DUMPS, BLAD, CVM ve brachyspina gibi önceden bilinen genetik kusurlar da bu yöntem kullanılarak doğrulanmıştır. Holşttein ırkında kayıtlı olan, tohumlama başarısını ve gebelikle sonuçlanan tohumlama oranını etkileyen on doğurganlık haplotipi (HCD, HH-0, HH1, HH2, HH3, HH4, HH5,) bulunmaktadır (Zinovieva, 2016).

1.6.Kalıtsal Hastalıkların Fenotip Olarak İfade Edilmesi

Bütün evcil hayvanlarda anne ve babadan yavruya aktarılan genetik materyalde meydana gelen kalıtsal hastalıklar morfolojik ve fizyolojik bozuklukların yanı sıra hayvanın sağlığını ve verimini olumsuz yönde etkileyebilmekte veya embriyonik ölüme sebep olarak fertlileteyi düşüren kalıtsal hastalıklar olarak tanımlanabilmektedir (Arthur vd., 2001, Citek vd., 2006). Sığır doğurganlığının azalması modern süt endüstrisinde önemli bir sorun oluşturmaktadır. Bu düşüş, süt üretimi için yoğun seçilimin yanı sıra ölümcül genetik kusurlar gibi diğer faktörlere de bağlanmaktadır (Fritz vd., 2013)

Suni tohumlama yöntemi başta süt sığırı yetiştiriciliği olmak üzere, hayvancılık sektörünün gelişiminde önemli bir rolü vardır (Medeiros ve ark., 2002). Süt sığırlarında doğurganlık, süt ineklerinin tohumlanmasıyla başlayan ve buzağların başarılı bir şekilde canlı doğumuyla biten karmaşık bir olgudur (Han 2016). Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde, suni tohumlama yöntemiyle genetik ilerleme hızını artırırken, yüksek verimli erkek damızlıkların yaygın olarak kullanımıyla çok sayıda yavru elde edilmiştir. Suni tohumlama yöntemi ile ırk içindeki hayvan başına verimlilik artırırken genetik havuzun daralmasına ve genetik yatkınlığın da artmasına neden olmaktadır (Akyüz ve Ertuğrul, 2006, Thomsen ve ark., 2006).

Ülkemizde ise bazı yetiştiriciler, siyah alaca ırkı ineklerini farklı süt ırkı boğaların spermaları ile tohumlanmış. Ancak bilinçsiz olarak yapılan melezlemelerin kullanılan ırklarda bozulmalara yol açabileceği, ekonomik artışın sağlanamayacağı ve ırkların geleceğinin tehlikeye girebileceği bildirilmiştir (Arpacık, 1982).

Yüksek akrabalı yetiştirme oranlarındaki artış, süt sığırı ırklarında düşük doğurganlığın nedenini oluşturabilmektedir ve üretimi olumsuz yönde etkileyecek kalıtsal hastalıkların kısa sürede tüm dünya çapında yayılmasına neden olmaktadır (Citek vd., 2006, Brito vd., 2021).

Suni tohumlama için kullanılan damızlık adaylarının ırka özgü kalıtsal hastalıkları taşıyıp, taşımadıklarının kesin olarak belirlenmesi ile kalıtsal hastalıklar kontrol altına alınabilmektedir (Akyüz ve Arslan, 2009). Çoğu zaman, kalıtsal hastalıkların yayılmasında taşıyıcı bireyler önemlidir, çünkü bu hastalıklar genellikle otozomal çekinik allellerden kaynaklanmaktadır. Otozomal çekinik allellerin karakteristik fenotipik özelliği, sadece her iki allelinde kalıtıldığında ifade edilebilmektedirler. Dolayısıyla otozomal çekinik kalıtılan alleller, bireyin heterozigot olduğu durumlarda fenotipte tespit edilememesinden dolayı popülasyon içinde varlıklarını devam ettirebilmektedirler (Akyüz ve Ertuğrul, 2006, Agerholm, 2007, Akyüz ve Arslan, 2009). Bu sebeple sığır yetiştiriciliğinde otozomal çekinik kalıtsal hastalıklar, X'e bağlı dominant veya x'e bağlı çekinik olarak aktarılan ve pedigree analizi kullanılarak nasıl bir kalıtım yolu izlediği daha kolay anlaşılan kalıtsal bozukluklara kıyasla geniş popülasyonlar için de daha büyük bir endişe kaynağı olmaktadır (Agerholm, 2007). Hiçbir klinik belirti göstermeden taşıyıcı olanların genotiplerinde bulunan mutant alleller, kullanılan suni tohumlama ve embriyo nakli ile çok kısa sürede popülasyona yayılabilmektedir (Soysal 2016).

Heterozigot lokuslara sahip bir ebeveynde, nesil genotiplerinin ebeveyndeki en az bir heterozigot lokus açısından ebeveynden farklı olması koşuluyla hangi haplotipin bir nesilden bir nesile aktarıldığını belirlemek mümkün olur (Baruch vd., 2006). Bütün vücut hücrelerindeki kromozomlar ikili şekilde bulunur bunlardan biri anadan diğeri babadan gelmektedir. Bu genler benzer olabilir ve babadan gelen allele anadan gelen allel benzeyebilir. Benzediği durumda, hayvan o gen için homozigot olmaktadır. Anadan ve babadan gelen alleller farklı olabilir, bu durum ise hayvan o

gen için heterozigot olmaktadır (Soysal 2016). Sığırlarda belirlenen kalıtsal hastalıkların % 87' si çekinik kalıtım özelliği göstermekte ve bu kalıtsal hastalıkların birçoğu ırka özgü olmaktadır (Healy, 1996)

1.7.Holştayn Haplotipler (HH)

Genetik biliminde, haplotip, birlikte aktarılan kromozomlar üzerinde birbirleriyle alakalı DNA dizisine ya da lokuslardaki allel kombinasyonuna denir. Bir haplotip, belirli lokus kümelerinden oluşan rekombinasyon vakalarına bağlı olarak tek bir lokusu veya tüm bir kromozomu içerebilmektedir (International Hapmap Consortium, 2003).

Dünyada sığır genomu hakkında daha fazla bilgi edinilirken çok sayıda sığırdaki genetik kusura rastlanılmıştır. Holstein, Jersey, Brown Swiss ve Ayrshire ırklarındaki bir dizi yeni genetik kusur hakkında bazı bilgileri ortaya çıkmaktadır. Bunlar, genomik değerlendirmeler için kullanılan inek ve boğaların SNP50 genotip veri tabanının tamamı değerlendirilerek ve çeşitli haplotiplerin sıklığı incelenerek keşfedilmişlerdir. Haplotip için homozigot olan canlı bireyler seçilip ve taşıyıcı boğalarla ineklerle tohumlandıklarında gebe kalma oranında gözlenen bir azalma ya da ölü doğumlarda artış belirlenmiştir (Georges vd., 2019).

Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından belirlenen ve takibi yapılan “donmuş boğa sperması ithalatında uyulması gereken usul ve kurallar” gereğince boğaların HH1, HH2 ve HH3 genlerinin taşımaması zorunluluk haline getirilmiştir. Ancak 2015 yılında Türkiye’de Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından, yurt dışından alınmasına izin verilen donmuş spermallerden, 273 boğa içerisinde 1 boğa HH1, 1 boğa HH2, 4 boğa HH3, 6 boğa HH4 ve 22 boğa HH5 geni taşımaktadır. Özet olarak 31 boğa (%11.36) en az bir haplotip gen taşımaktadır Holştayn haplotipler, (HH1, HH2, HH3, HH4 ve HH5) genel anlamda embriyonun ya da zigotun ölümüne yol açmış ve gebelik oranlarında düşüşler nedeniyle 2015 yılında sperma ithalatı talimatlarına girmişlerdir. Bu haplotip genlere sahip olan boğa spermalarının ithalatı ve bu spermaların Türkiye’de hayvan yetiştirmede kullanımına devam ettikçe, gebelik oranları düşüş gözlemlenecektir. İthalat şartlarına uyulmazsa Türkiye’de yetiştirilen sığırlarda, zararlı genlerin frekansı artacak, her bir gebelik için daha fazla tohum

atılacak, daha az sayıda buzağı doğumu, daha az damızlık düve elde edilecek ve sonuç olarak daha fazla damızlık düve ithalatı gerçekleşecektir (İnal ve Çam, 2016). Holştein haplotiplere sebep olan babaların isimleri, doğum yılları ile etkiledikleri gen bölgeleri tablo 1.1’de belirtilmiştir.



Tablo1.1: Holştein haplotiplerinin ilk tespit edilen babaları ve etkilenen genler

HAPLOTİPLER	BELİRLENMİŞ BABALAR	ETKİLENEN GEN
HH1	Pawnee Farm Arlinda Chief (1962)	Apoptotik peptid aktive edici faktör 1 geni (APAF1)
HH2	Willowholme Mark Anthony (1975)	Intraflagellar protein 80 (IFT80)
HH3	Gray View Skyliner (1954)	Kromozom 2'nin yapısal bakımı (SMC2)
HH4	Besne Buck (1986)	Glisinamid ribonükleotid transformilaz proteini (GART)
HH5	Thornlea Texal Supreme (1957)	Dimetil-adenosin transferaz 1 (TFB1M).
HH6	Mountain (1987)	SDE2 telomer bakım homologu (SDE2)
HH7	Secret (1980), Dutch Boy (1996), Merdrignac (1996)	Sentromer proteini U (CENPU)

(Mohshina ve Gedik, 2022)

1.7.1. HH-0

Ölü doğumla ilişkili HH-0 haplotipi, 21. kromozom (BTA-21) üzerindeki 20-25 Mb bölgesinde haritalandırılmıştır. (Vanraden vd., 2011a) HH-0 haplotipi ile FANCI

(Fanconi anemia complementation group I) geninde 3329 baz çiftinde bir eksilme sonucunda meydana gelmektedir (Charlier vd.,2012). FANCI geni normalde 37 ekzon içerirken oluşan mutasyon sonucunda 25-27' ye kadar bir delesyon oluşur bu da 28. Ekzonda stop kodonun oluşmasına ve erken sonlanmasına neden olmaktadır. Bu haplotipini, babası Round Oak Rag Apple Elevation olduğu tespit edilmiştir (Li vd., 2016)

1.7.2. HH1

VanRaden ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2011a), Holstein sığırlarında ölü doğumlarda artış, gebelik oranlarında azalma ve homozigot eksikliği ile ilişkili olan, Holstein Haplotip-1 (HH1) adı verilen mutasyonun sığır kromozomu 5 (BTA-5) üzerinde olduğunu bulmuşlardır.

Gebelik sırasındaki embriyonik ve fetal kayıp, ulusal doğurganlık veri tabanı kullanılarak araştırılmış ve çoğunlukla HH1 için gebeliğin 60 ila 200. günleri arasında meydana geldiği, ancak diğer bazı resesif defektler için daha önce meydana geldiği bulunmuştur (Adams vd 2016). Vanraden ve arkadaşları (2011b) HH1 için yaptıkları çalışmada ise embriyo kayıplarının gebelik boyunca meydana geldiğini ortaya koymuşlardır.

HH1 haplotipinin izi, 50 yıl önce doğan tek bir babaya kadar takip edilmiştir (Vanraden vd., 2011b). Adams ve arkadaşları (2016), VanRaden ve arkadaşlarının (2011a) Soyağacı verilerini kullanarak, 1962 doğumlu Pawnee Farm Arlinda Chief (Chief) HH1 haplotipini taşıyan en eski genotipli ata olarak tanımlamışlardır. Chief, Holstein ırkının tarihindeki en etkili babalardan biri olmuştur. 16 000'den fazla kız çocuğu, 500 000'den fazla kız torunu ve 2 milyondan fazla kayıtlı torununun yanı sıra, popüler babalar haline gelen birçok damızlık boğanın babası olmuştur. Chief'in iki oğlu, Walkway Chief Mark (Mark) ve Milu Betty Ivanhoe Chief (Ivanhoe Chief), önceki genotipleme bilgilerine dayanarak HH1 taşıyıcıları olarak tanımlanmıştır. Chief'in diğer bir oğlu S-W-D Valiant'ın (Valant) HH1 haplotipini taşımadığı tespit edilmiştir (VanRaden ve diğerleri, 2011a).

Chief'in diğer bir oğlu S-W-D Valiant'ın (Valant) HH1 haplotipini taşımadığı tespit edilmiştir. Chief ve Mark daha önceki bir çalışmadan elde edilen tam genom

dizisine sahipti ve bu nedenle HH1 haplotipindeki mutasyonları tanımlamak için bir ön tarama için faydalı olmuşlardır (Larkin vd., 2012).

Chief ve oğullarından 3'ünün tam genom yeniden dizilim yöntemi kullanarak HH1 mutasyonunun nedeninin BTA5'teki APAF1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1= APAF1 p.Q579X) geninde anlamsız bir mutasyon belirlenmiştir (Adams vd., 2016). Chief ve üç oğlunun doğum yılları ile 2016 yılındaki en etkili 25 boğa ile karşılaştırılması çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1: HH1'in bulunduğu boğalar için soyağacı bilgileri: Pawnee Farm Arlinda Chief (Chief), Milu Betty Ivanhoe Chief (Ivanhoe Chief), S-W-D Valiant (Valiant), ve Walkway Chief Mark (Mark)

Boğa	ID*	Doğum Yılı	Boğanın Babası	Alellerin Yüzdesi (%)**
Chief	1427381	1962	Pawnee Farm Reflection Admiral (138326)	14,3
Ivanhoe Chief	1578139	1969	Chief	--
Valiant	1650414	1973	Chief	8,7
Mark	1773417	1978	Chief	7,8

Adams vd., 2016

*Holstein cinsi kimlik numarası

**2016 yılında kullanılan en iyi Holstein boğalarla ortak alellerin yüzdesi (en etkili 25 boğa listesinden boğanın Holstein ırkına genel katkısının bir göstergesidir.)

1.7.2.1. HH1 Haplotip Tespiti

HH1 haplotipini tanımlayabilmek için yüksek yoğunluklu SNP genotiplemesini kullanmışlardır. Haplotip sıklığı %2,25 olmasına rağmen, genotiplendirilmiş 78 000'den fazla birey arasında HH1 için homozigot birey bulunamamıştır. Bu bulgu, BTA5'in 8 Mbp'lik bir bölgesinde yer alan resesif öldürücü bir alelin popülasyonda dolaştığı hipotezine yol açmıştır (VanRaden 2011a).

Chief'in HH1 kaynak haplotipinin tamamı olmasa da bir kısmı olarak tanımlanan rekombinant haplotipler, findhap.f90 kullanılarak 2011 yılı itibarıyla 54 001 SNP genotipine sahip 78.465 hayvanın soyağacında tespit edilmiştir (VanRaden vd., 2011b; Sonstegard vd., 2013). Varsayılan mutasyonu içeren 7,1 Mbp'yi kapsayan 75 işaretleyici kaynak haplotipinin tüm kopyalarının, Chief'e dayandığı ve başka hiçbir önemli ataya dayanmadığı görülmüştür (Adams vd.,2016).

VanRaden ve arkadaşları (2011a) yalnızca kaynak haplotipi üzerinde çalışmışken, kaynak haplotipin yalnızca bir kısmı için homozigot olan rekombinant haplotiplere sahip canlı hayvanlar, haplotipin bu kısmının ölümcül mutasyon içermediği ihtimalini göz ardı edilebilmektedir. Etkilenmemiş hayvanlardaki homozigot haplotip bölgelerini hariç tutmak yerine, etkilenen hayvanlar tarafından paylaşılan homozigotluk bölgesine odaklanan tipik homozigotluk haritalamasının ayna görüntüsüdür. Tüm rekombinant haplotiplerin işlenmesinden sonra, hariç tutulmayan alan, açıklandığı gibi mutasyon açısından kritik bölge olarak tanımlanmıştır (Sonstegard vd., 2013).

Yapılan çalışmalar ile HH1'in varlığı bulunmuştur ve dünya genelinde prevalansına bazı ülkeler bakmıştır. Bakılan ülkelerdeki prevalans ise tablo 1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 1.2: Farklı Ülkelerde HH1'in Yaygınlığı

ÜLKE	HH1	REFERANS
FRANSA	1,6	Fritz vd., (2013); Hozé vd., (2020)
URUGUAY	4,44	Briano-Rodriguez vd., (2021)
ÇİN	6,92	Khan vd., (2021)
HİNDİSTAN	2,96	Kumar vd., (2020)
RUSYA	2,96	Khatib vd., (2020)
KAZAKİSTAN	0	Ussenbekov vd., (2022)
JAPONYA	2,9	Ghanem vd., (2018)

(Mohshina ve Gedik, 2022)

1.7.2.2.APAF1

APAFA1'in uzunluğu ilk olarak Adams ve arkadaşları (2016) tarafından rapor edilmiştir. Bu raporda, UCSC Genom Tarayıcısı tarafından verilen polipeptit uzunluğu olan 1.238 amino asit kullanılmıştır. APAFA1 proteininin (NP 001178436.1) UCSC Genom Tarayıcı açıklaması, NCBI sığır genom açıklamasına dayanmaktadır. Fritz ve arkadaşları (2013) görünüşe göre ya 248 amino asit olan insan proteinini ya da sığır dizisinin 1 248 amino asit olan alternatif bir açıklamasını (örneğin, XP_005206703) kullanmışlardır. UNIPROT'ta sığır APAFA1 proteini (Giriş F1MUW4) 1 251 amino asittir ve bu, amino terminaline 2 amino asit eklenmesi ve başka bir dahili kalıntının eklenmesinden kaynaklanmaktadır (Adams vd., 2016)

APAFA1 tarafından kodlanan protein, sitokrom-c aracılı apoptotik kaskadının merkezi bir bileşenini oluşturmaktadır ve doğrudan kanser, gelişimsel bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisinde rol oynamaktadır (Honarpour vd. 2001, Apweiler vd., 2004, Blake vd., 2010)

APAFA1 proteini, sitokrom-c ve dATP ile bağlandığında kaspaz-9 preproteinini bağlayan ve onu olgun aktif formuna ayıran sitoplazmik bir yapı olan apoptozomu

oluşturan bir oligomer oluşturmaktadır. Kaspaz-9'un aktifleştirilmiş formu, sonuçta apoptotik hücre ölümüne yol açan kaspaz kaskadını başlatmaktadır. Fare gelişimi sırasında APAF1'in ekspresyonu, çeşitli hayati doku ve organlarda 7. ve 9. günler arasında başlar ve merkezi sinir sisteminin gelişimi için çok önem taşımaktadır. Farelerde homozigot APAF1 geninin nakavt edilmesi, 16,5. günde embriyonik öldürücülüğe yol açar ve APAF1 eksikliği olan farelerde beyinde aşırı büyüme ve kraniofasial malformasyonlar görülmektedir (Cecconi vd., 1998; Yoshida vd., 1998; Honarpour vd., 2001; Müller vd., 2005).

APAF1 polipeptitinden 670 C-terminal amino asidinin silinmesi, sığır proteininde tahmin edilen fonksiyonel WD40 alanını oluşturan 15 WD40 tekrarını ortadan kaldırır. WD40 alanları sinyal iletimi, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozda rol oynayan birçok proteinde bulunur ve protein-protein etkileşimleri için gereklidirler. (Acehan vd., 2002). WD40 alanının silinmesi muhtemelen kaspaz-9'un bağlanması ve apoptoz yolunun başlatılması için gerekli olan apoptozomların oluşturulmasında başarısızlıkla sonuçlanacaktır. (Acehan vd., 2002; Riedl and Salvesen, 2007).

1.7.3. HH2

Gebeliğin 60. gününden önce olan dönemde fetusun ölümüne neden olan Haplotip, Holstein haplotip-2'dir (VanRaden vd., 2011a; VanRaden vd., 2011b). HH2, BTA-1'de 94,8 ile 96,5 MB arasındaki kromozomal aralıkta yer almaktadır (McClure vd., 2014).

Yang ve arkadaşları (2022), intraflagellar taşıma proteini 80 (IFT80) geninde çerçeve kayması mutasyonuna neden olan bir baz silinmesini bildirmiştir. HH2'de timin silinmesi, IFT80 geninin 11. eksonunda 10 7172 616 genomik pozisyonunda meydana gelir. (Yang vd., 2022).

1.7.4. HH3

HH3'ün 8. Kromozom (BTA-8) üzerinde 90-95 Mb bölgesinde haritalandığı Vanraden ve arkadaşları (2011a) tarafından ortaya konulmuştur. Holştayn sığırlarında ölümcül kusur olan HH3, gebeliğin ilk üç ayından önce yavru kaybına neden olur (VanRaden vd., 2011b; McClure vd., 2014). HH3'nin genotiplendirilmiş

en eski atası, Gray View Skyliner adlı üretken bir Amerikan boğasıdır (VanRaden vd., 2011b).

HH3, 8. kromozomda 92-97Mb aralığında tanımlanmış olup, neden olan mutasyon, SMC2 geninin 24. eksonunda tek bir nükleotid yer değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. HH3'teki T'den C'ye değişiklikler, 1 135. amino asitte serinden fenilalanin ikamesine neden olur, bu da SMC2 proteinindeki NTPase alanını değiştirir Mutasyona uğramış HH3 embriyolarında, ATP hidrolize etme kapasitesi büyük ölçüde zayıflar ve normal yoğunlaşma aktivitesini engeller, bu da embriyonik gelişimle bağdaşmayan kromozomların yapısal anormalliklerine neden olmaktadır (McClure vd., 2014).

1.7.5. HH4

Yapılan bir çalışmada, HH4, 1. kromozom (BTA-1) üzerinde yer alan glisinamid ribonükleotid transformilaz (GART) geninde nedensel bir mutasyona (g.A1277227C; p.Asn290Thr) sahip olduğu tespit edilmiştir (Fritz vd., 2013).

HH4 ilk olarak Fransız Holştayn sığırlarında rapor edilmiştir (Fritz vd., 2013). HH4 homozigot embriyo gebeliğin 60. gününden önce abort yapmaktadır (Fritz vd., 2013; Cooper vd., 2014). HH4'ün ilk heterozigot taşıyıcı boğası, 1986 doğumlu Besne Buck adlı bir Fransız boğadır (Cole vd., 2016).

HH4 haplotipi BTA-1'in 1,9-3,3 Mb bölgesini kapsamakta olup öldürücülük GART genindeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır (Fritz ve ark., 2013). GART proteini tüm ökaryotlarda tamamen korunmuştur ve kalıtsal moleküllerin önemli bileşenleri olan pürinlerin birincil sentezi için gerekli olmaktadır. GART gen fonksiyonu olmayan bir embriyonun, nükleik asit sentezleyememesi nedeniyle erken gebelikte abort yapması muhtemel olmaktadır (Fritz vd., 2013).

1.7.6. HH5

Gebeliğin ikinci ayına kadar olan dönemde embriyonik kayıplara neden olan Haplotip HH5, kromozom 9 (BTA-9) üzerinde bulunmaktadır (Vanraden vd., 2011a). HH5 ile ilişkili fetal mortalitenin nedeninin 138 kb'lık bir delesyon olduğu tespit edilmiştir

Mutasyon olayının homolog rekombinasyon/delesyon sonucu meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Delesyon, mitokondriyal transkripsiyon faktörü B1 olarak da bilinen dimetiladenozin transferaz 1 geninin tam dizisini etkiler. (Schütz vd., 2016).

1.7.7. HH6

Ölümcül haplotip HH6, gebeliğin çok erken bir aşamasında (35 günden önce) gebelik kaybına neden olmaktadır. HH6, suni tohumlamada yaygın olarak kullanılan Mountain adlı bir Amerikan boğasından yayıldığı bildirilmektedir. Sığır SDE2 geni, yedi ekzondan oluşan 15 504 baz uzunluğunda bir diziye sahiptir. SDE2 geninin nükleotit dizisindeki ATG (Met) kodonunu ACG'ye değiştirir; bu, çeviri en yakın çerçeve içi Met kodonunda başladığında 83 amino asitle kesilir. Bu kaçırılan amino asitler, ökaryotlar arasında korunan 8 amino asitli bir motifi (SDE2-C olarak adlandırılır) içerir. SDE2, hücrelerin replikasyon stresini hafifletmesine yardımcı olur ve kültürlenmiş insan HeLa hücrelerinde tam bir DNA replikasyon süreci sağlar. Ek olarak SDE2, *Schizosaccharomyces pombe*'de seçilen pre-mRNA'ların intron spesifik bir şekilde eklenmesini destekler. SDE2-C motifi içermeyen mutasyona uğramış HH6 embriyoları, SDE2 protein fonksiyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir ve bu da birkaç hücre bölünmesinden sonra embriyo ölümüne neden olabilir (Fritz vd., 2018).

1.7.8. HH7

Holstein ırkında HH7'nin gebeliğin 35. gününden önce embriyonik ölümden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. İkisi ABD menşeli Secret ve Dutch Boy ve Fransız menşeli Merdignac olmak üzere üç boğanın HH7'nin en erken taşıyıcıları olduğu rapor edilmiştir. HH7, CENPU genindeki dört bazın silinmesinin sonucudur. Bu silme işlemi, CENPU genindeki dört nükleotidi (g.14168130 ila 14168133 TACT) ortadan kaldırır ve ortaya çıkan mutasyon, genin birleştirme modelini değiştirir. CENPU geni 13 ekzona, 47546 baz dizisine sahiptir ve 409 amino asit uzunluğunda protein üretir. CENPU, mitoz sırasında uygun kromozom ayrımı için gerekli olan bir sentromer bileşenidir. İnsanlarda ve farelerde CENPU geninin bozulması sırasıyla mitotik kusurlar ve öldürücülük göstermektedir (Hozé vd., 2020).

Bahsedilen haplotiplerin embriyo ve abort yaptıkları günler tablo 1.3’de gösterilmiştir.

Tablo 1.3: Holştein Haplotiplerinin Embriyo Kayıpları ve Abort Günleri

35	60	90	120	150	180	210	240	270
HH1*								
HH4*								
HH2*								
HH3*								
HH5*								
HH6**								
HH7**								

Yukardaki çizelgede en baş kısım 0. gün olarak alınmış ve ilgili haplotipin embriyo ve abort zamanları gösterilmiştir.

*HH1, HH2, HH3, HH4 ve HH5 (Zinovieva 2016)

**HH6 ve HH7 (Mohshina ve Gedik, 2022)

2. MATERYAL METOD

Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyolojisi ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Bu araştırmada alınan kan örneklerinden genomik DNA molekülünün izole edilmesi, kalıtsal kusurlarla ilgili bölgelerin PCR ve Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi PCR yöntemleri ile çoğaltılması ve oluşan jel görüntüleri incelenmesini içermektedir.

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada kullanılan hayvanlar, Konya ilinde bulunan özel bir çiftlikteki doğum ve üreme kayıtlarına sahip hayvanlar incelenerek seçilmiştir. Seçilen bu sığırlar, 205 baş saf kan dişi Holstein Frisian ırkı, 45 baş Holstein X Simental melezi dişi sığırdan ve 40 baş saf kan erkek Holstein Frisian ırkı, 10 baş Holstein X Simental melezi erkek sığırdan oluşmak üzere, toplamda 300 baş hayvandan kan numunesi alınmıştır.

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan malzemler kullanılmıştır.

2.1.1.1. PCR Cihazı

Çalışmamızda Holstien Haploti-1 gen bölgesinin çoğaltılması için Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR cihazı (ThermoFisher Scientific) kullanılmıştır.



Resim 2.1: PCR Cihazı

2.1.1.2.Yatay Elektrophorez Sistemi

Kan örneklerinden elde edilen DNA, PCR ve ARMS-PCR ürünlerinin görüntülenmesi için, Thermo 4000P güç kaynağı ve midicell primo EC 320 (Thermo) elektrophorez jel sistemi kullanılmıştır.



Resim 2.2: Elektrophorez Sistemi

2.1.1.3. Jel Görüntüleme Sistem

DNA, ve ARMS-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülme işleminden sonra jel görüntülerinin alınabilmesi için Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme cihazı kullanılmıştır.



Resim 2.3: Jel Görüntüleme Sistem

2.2. Metod

2.2.1. Kanların Toplanması ve Saklanması

Bu çalışmada kullanılan kan örnekleri, çiftlikte ön çalışma ile belirlenmiş olan hayvanlardan alınmıştır. Kan alınırken hayvan, uygun koşullarda zapturapt edilerek, hayvanın kuyruğu bir el ile kaldırılıp diğer boştaki el ile kuyruğun altındaki venadan (Vena Coccygea lateralis) kan alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kuyruk kaldırıldıktan sonra boşta kalan el ile, vacutainer ve kan alma iğnesi kullanılarak kuyruk venasına girilir. Girildikten sonra kuyruk bırakılmadan vacutainer içine kapaklı ve vakumlu K2 EDTA'lı 3 ml'lik kan alma tüpü konularak kanın dolması beklenir. Kan tüpe dolduktan sonra tüp vacutainerden çekilir ve iğne damardan çıkartılır. Kanlar alındıktan sonra hızlı bir şekilde buz aküleri ile birlikte, Afyon Kocatepe

Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarına soğuk zincir bozulmadan götürülmüştür. Laboratuvara gelmiş olan kanlar, -20 °C de muhafaza edilmiş ve DNA izolasyonu gerçekleştirilene dek saklanmıştır.

2.2.2. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılmak amacıyla alınan kan örneklerinden, spin kolon yöntemi uygulanarak DNA izole edilmiştir.

10 µl Proteinaz-K (20mg/ml), 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere konulmuştur. Ardından 200 µl kan numuneleri tüplere ilave edilmiştir. Oluşan karışımın üzerine 200 µl ekstraksiyon çözeltisi eklenerek 15 sn. güçlü bir şekilde vortekslenildikten sonra etüvde 15 dakika boyunca 56°C'de bekletilmiştir. Süre tamamlandıktan sonra etüvden çıkartılıp kapakta kalan damlacıkları uzaklaştırmak amacıyla kısa süreli santrifüj işlemi uygulanmıştır. Sonrasında üzerlerine 210 µl kadar binding buffer ilave edilerek 15 sn vortekslenmiştir. Kapakta kalan damlacıkları uzaklaştırmak için kısa süreli santrifüj işlemi uygulanmış ve mikrosantrifüj tüpleri içerisindeki tüm içerek spin kolon tüplerine aktarılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak 1 dk kadar 6 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Spin kolon tüpünün altında kalan sıvı atılmıştır. Sonrasında, 650 µl yıkama solüsyonu-I spin kolonların üzerine eklenerek 1 dk 6 000 rpm'de santrifüj edilerek Spin kolon tüpünün altında kalan sıvı dökülmüştür. 500 µl yıkama solüsyonu-II spin kolonlara eklenerek 1 dk 6 000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmış ve Spin kolon tüpünün altında kalan sıvı kısım atılmıştır. Daha sonra, tekrar 250 µl yıkama solüsyonu-II spin kolonlara ilave edilerek 3 dk 14 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında spin kolon yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve üzerilerine 50 µl TE buffer (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) solüsyonu ilave edilerek 8 dk oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bekleme süresi dolduktan sonra tüpler, 1 dk daha 6 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kanlardan elde edilen DNA'lar, daha sonra kullanılmak için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Primer Tasarımı

Holstein Haplotip-1 gen dizisi için NCBI gen bankasından faydalanılarak primer tasarlama işlemi ve çalışmamızda kullanılan primer setlerinin dizaynı için Kumar ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmadan yararlanılmıştır. Kullanılan primer setleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. (Genbank No: NM 001191507.1) (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Çizelge2.1: HH1 ARMS-PCR Primer tasarımları (Kumar vd. 2020)

Outer Forward (OF)	ACATCTTCTTGGACGACAGCCATTTCCT
Outer Revers (OR)	ATGACATAGTCAGCGCTCTGCTCCCTCT
Inner Forward (İF)	GTGAACTGGAACTTCAGAGGTTTATCTGC
Inner Revers (İR)	GTGAACTGGAACTTCAGAGGTTTATCTGC

2.2.4. Gradient PCR

Elde edilen DNA'lar kullanılarak, Holstein Haplotip-1 (HH1) gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanacak olan primerlerin en iyi bağlanma sıcaklıklarını (T_m, Melting Temperature) tespit edebilmek için Gradient PCR yapılmıştır. Öncelikle elimizde bulunan DNA örneklerinden karışık bir şekilde seçilmiş olan 6 farklı örnekten toplamda 12 µl DNA örneği bir havuzda toplanılmıştır. Daha sonra bu DNA havuzuna yapılan Gradient PCR da HH1 bölgesini çoğaltmak için en uygun sıcaklık 61 °C, en uygun MgCl₂ miktarı 2 mM/µl olarak bulunmuştur.

Gradient PCR, primerlerin bağlanma sıcaklığının (T_m, Melting Temperature) belirlenmesinde kullanılan prosedür şu şekildedir ve aynı zamanda tablo 2.1'de de gösterilmiştir. Mikro santrifüj tüpü olarak, 2 ml tüplerinin içine, PCR tüplerine; 1 µl 10x Buffer, 25 mM 0,75 µl MgCl₂ (1.5 mM), 0,3 µl dNTP, 0,25 µl out forward 1 (10 nmol) ve 0,25 µl out revers (10 nmol) 0,25 µl in forward 1(10nmol) ve 0,25 µl in revers 1(10nmol) Taq DNA polimeraz (Thermo) 0,0625 µl, 1,5 µl DNA ve 7,8875 µl ultra distile su ilave edilmiş toplam hacimin 12,5 µl olması sağlanarak bir PCR karışımı elde edilmiştir.

Tablo 2.1: HH1 bölgesinin Gradient PCR'ını belirlemek için kullanılan PCR ürünleri

Bileşenler 1 örnek için kullanılan miktar	1 örnek için kullanılan miktar
10x Buffer	1 µl
25 mM MgCl ₂	0,75 µl
DNTP	0,3 µl
Outer forward	0,25 µl
Outer revers	0,25 µl
İnner forward	0,25 µl
İnner revers	0,25 µl
Taq polimeraz	0,0625 µl
Utra distile su	7,8875 µl
DNA	1,5 µl

2.2.5. ARMS-PCR

Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi (ARMS), alele özgü polimeraz zincir reaksiyonu (ASPCR) veya belirli alellerin PCR amplifikasyonu olarak tanımlanmıştır. ARMS yöntemi, tek baz değişikliklerini veya küçük delesyonları içeren herhangi bir mutasyonun varlığını saptamak için basit, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. ARMS, yalnızca hedef alel numune içinde bulunduğunda test DNA'sının amplifikasyonuna izin veren ve hedef olmayan aleli amplifiye etmeyecek diziye özgü PCR primerlerinin kullanılmasına dayanır. Bir ARMS reaksiyonunu takiben, bir PCR ürününün varlığı veya yokluğu, hedef alelin varlığı veya yokluğunu ortaya koyduğu için tanısaldır (Little, 1995).

Teorik olarak ARMS, polimorfik kısıtlama bölgesi çevresinde yeterli genomik sekansın bilinmesini sağlayarak, bu gibi durumlarda hızlı haplotip analizine izin vermektedir (Newton vd., 1989).

ARMS-PCR testi, hedef olmayan alelde yanlış tetiklemeyi en aza indirmektedir ve hedef alelide saptayabilmektedir. ARMS-PCR ürününü üretecek olan primer dizisini ve reaksiyon koşullarının bir kombinasyonunu belirlemek gerekmektedir. Yaklaşım, mümkün olduğu kadar çok değişkeni (örneğin, termal döngü parametreleri, enzim konsantrasyonu, vb.) standardize etmek için değişkeni değiştirerek reaksiyonu optimize etmek gerekmektedir (Little, 1995).

Albertino vd. (2022), yaptıkları çalışmada ARMS-PCR tekniği için geliştirdikleri primerler ve protokolün, %100 spesifik ve etkili olduğunu yaptıkları çalışmada tespit etmişlerdir. Bu yöntemle hayvanların genotipini belirlemek için nispeten basit ve ekonomik olduğu kanıtlanmıştır.

Kumar vd. (2020), yaptıkları bir çalışmada, ARMS PCR yöntemini HH1 mutasyonunun saptanması için geliştirmişlerdir.

Geliştirilen ARMS-PCR yöntemleri göz önünde bulundurularak çalışmamız için gerekli olan ARMS-PCR yöntemimizi geliştirdik. Bu yöntem şu şekildedir ve Tablo2.2’de gösterilmiştir. HH1 bölgesi, her bir örnek için PCR tüplerine; 1,5 µl DNA örneği 1 µl 10x Buffer, 25 mM 0,75 µl MgCl₂ (1.5 mM), 0,3 µl dNTP, 0,25 µl out forward 1 (10 nmol) ve 0,25 µl out revers (10 nmol) 0,25 µl in forward 1(10nmol) ve 0,25 µl in revers 1(10nmol) Taq DNA polimeraz (Thermo) 0,0625 µl, 2 µl DNA ve 7,8875 µl ultra distile su ilave edilmiş toplam hacimin 12,5 µl olması sağlanarak bir PCR karışımı elde edilmiştir.

Tablo 2.2: HH1 bölgesinin ARMS PCR ürünleri

Bileşenler 1 örnek için kullanılan miktar	1 örnek için kullanılan miktar
10x Buffer	1 µl
25 mM MgCl ₂	0,75 µl
DNTP	0,3 µl
Outer forward	0,25 µl
Outerrevers	0,25 µl
İnner forward	0,25 µl
İnner revers	0,25 µl
Taq polimeraz	0,0625 µl
Utra distile su	7,8875 µl
DNA	1,5 µl

Bahsedilen ARMS-PCR yöntemiyle oluşturulan PCR ürünlerini PCR cihazında çoğaltmak için kullanılan yöntem tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3: HH1 bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR protokolü

SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
95	3 dk	1
95	30 sn	40
61	30sn	
72	45 sn	
72	10 dk	1

2.2.6. Jel Elektroforez

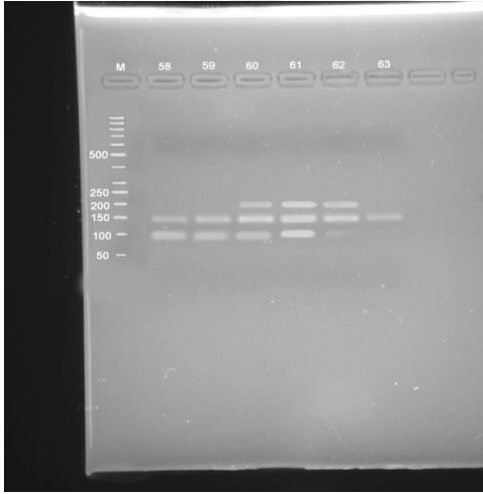
İzole edilerek elde edilen DNA'ları ve PCR ürünlerini görüntüleme işlemi için (% 2'lik) agaroz jel yapılmıştır. Bunun için 2 gr Agaroz toz hassas kantar ile tartılıp, balon jöjeye döküldümüş ve üzerine 100 ml TAE (TrisAsetat- EDTA) solüsyonu eklenmiştir. Daha sonrasında mikrodalga fırına konularak erimesi sağlanmıştır. Pürüzsüz bir şekilde erimiş olan jelin içine 1 µl kadar RedSafe boya solüsyonu ilave edilmiştir. Oluşan karışımın ılık bir hale gelmesi beklenmiş ve daha sonrasında elektroforez tepsisine aktarılmıştır. Elektroforez tepsisinin içine taraklar konularak elde edilen jel 30 dk oda sıcaklığında ve 30 dk' da buzdolabı içinde +4 derecede katılaşması için bekletilmiştir. Sonrasında elektroforez tepsisinin içinde bulunan taraklar tepside uzaklaştırılmıştır. Tepsi, elektroforez tankına alınmıştır. Elektroforez tankına konulan jelin üzerini geçecek şekilde TAE solüsyonu koyulmuştur. Oluşan her bir kuyucuğa 8 µl yükleme boyası (Loading Dye) ile 6 µl miktarında PCR ürünü barındıran karışım ilave edilmiştir. Yükleme işleminden sonra cihaz çalıştırılmış ve 30 dk boyunca örnekler 90 voltta jelde yürütülmesi sağlanmıştır. Ardından Vilber Lourmat BIO-VISION jel görüntüleme sisteminden faydalanılarak jel görüntülenmiştir. Görüntünün gözlenmediği bantlar negatif olarak değerlendirilirken görüntünün olduğu bantlar ise pozitif olarak değerlendirmeye alınmıştır. ARMS PCR'de üç farklı bant elde edilmiştir. Normal olanlar 2 bant şeklinde, mutant allel taşıyanlar ise 3 bant şeklinde gözlemlenmiştir. (mutant T aleli için 105 bp, normal C aleli için 140 bp ve ortak fragman olarak 189 bp)

3. BULGULAR

HH1, kromozom 5 (BTA-5) üzerindeki pozisyon (63 150 400) da meydana gelen mutasyon sonucunda C→T dönüşümünden kaynaklı olduğu bilinmektedir. ARMS-PCR testi yöntemi, tek bir PCR reaksiyonunda HH1 mutasyonunun tespiti için kullanılmıştır.

3.1.Gradient PCR Bulguları

ARMS-PCR yönteminde kullanılan primerler için, primerlerin bağlanma sıcaklıklarını belirlemek amacıyla gradient PCR yapılmıştır. Holstein Haplotip-1'in primerlerinin optimum bağlanma sıcaklık (T_m) derecesinin 61°C olduğu tespit edilmiştir. Gradient PCR sonucunda elde edilen T_m derecelerine göre tüm örneklerle ARMS-PCR yöntemi uygulanmıştır. Oluşan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görüntüleri şekil 3.1'de gösterilmiştir.

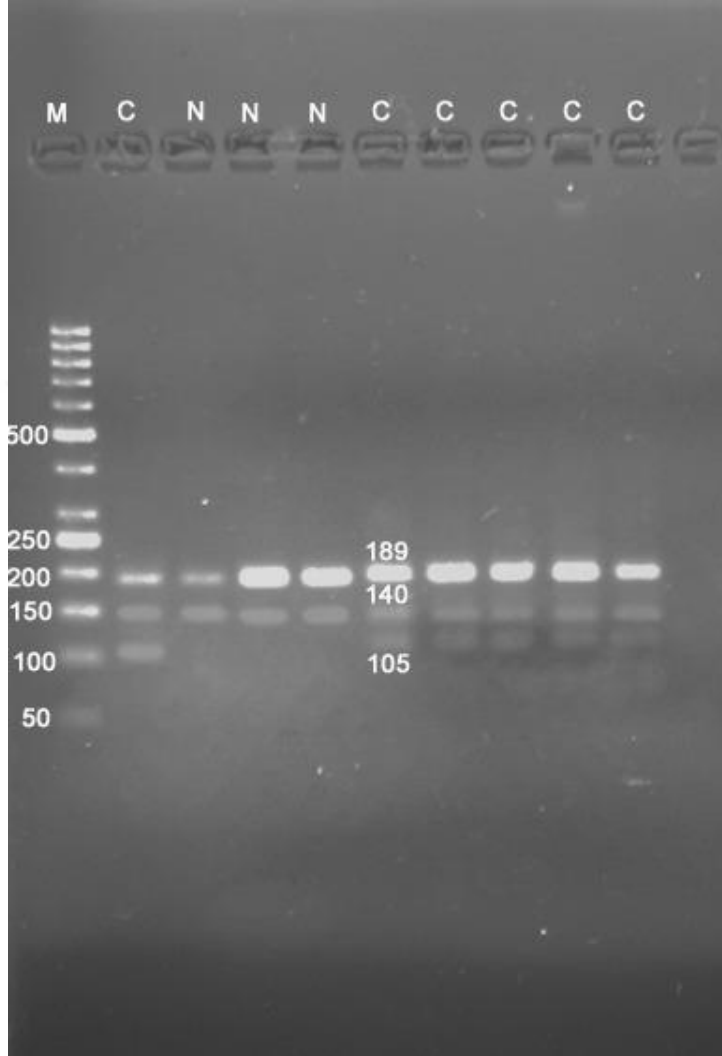


Resim 3.1: HH1'in Gradient PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.2.ARMS-PCR Bulguları

ARMS-PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan PCR ürünlerinin jel elektroforez yöntemi ile görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen görüntülerde, üç farklı fragman bulunması hedeflenmiştir. Bu elde edilen görüntülerde, üç farklı fragman (mutant T

aleli için 105 bp, normal C aleli için 140 bp ve ortak fragman olarak 189 bp) görülerek normal ve HH1 taşıyıcı numunelerin ayırt edebilmesi sağlanmıştır. Oluşan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezdeki görüntüleri şekil 4'te gösterilmiştir.



Resim 3.2: HH1'in ARM-PCR Jel Elektroforez Görüntüsü

ARMS-PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan PCR ürünleri jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi sonucunda saf/melez hayvanlar için homozigot/heterozigotluk belirlenmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, toplam 300 baş hayvana bakılmıştır. Bakılan hayvanlardan 245 saf kan hayvandan alınan örneklerin 171'i homozigot, 62'si ise heterozigot olarak bulunmuş ve 12'sinden görüntü alınamamıştır. Buna ek olarak 55 melez hayvandan alınan örneklerin 48'i homozigot, 6'sı ise heterozigot olarak bulunmuş ve 1'inden görüntü alınamamıştır. Sonuçlar çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Saf Kan/Melez Hayvanların Homozigot/Heterozigotluk Dağılımı

	Saf kan (n*=245)	Melez (n*=55)
Homozigot	171	48
Heterozigot	62	6
Jel Görüntüsü	12	1
Alınamayanlar		

*: Toplam hayvan sayısı

Çalışmada kullanılan hayvan materyalinin cinsiyet dağılımı; 40 saf kan erkek hayvan, 10 melez erkek hayvan, 205 saf kan dişi hayvan ve 45 melez hayvan olarak belirlenmiştir. Bu dağılım çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: Saf kan ve melez hayvanların cinsiyet dağılımı

	Saf kan (n=245)	Melez (n=55)
Erkek	40	10
Dişi	205	45

Jel görüntülerinin sonuçları homozigot ve heterozigotluğun ırk ve cinsiyet üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu göstermektedir ($p=0,078>0,05$).

Toplam 300 baş hayvandan alınan örneklerle jel elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Jel elektroforez yöntemi uygulanan örneklerin 13 tanesinden görüntü alınamamıştır (Çizelge 3.3).

Saf dişi hayvanların 140 tanesi homozigot olarak bulunmuştur. Melez dişi hayvanların 40 tanesi homozigot olarak bulunmuştur.

Saf dişi hayvanların 53 tanesi Heterozigot olarak bulunmuştur. Melez dişi hayvanların 4 tanesi heterozigot olarak bulunmuştur.

Saf erkek hayvanların 31 tanesi homozigot olarak bulunmuştur. Melez erkek hayvanların 8 tanesi homozigot olarak bulunmuştur.

Saf erkek hayvanların 9 tanesi Heterozigot olarak bulunmuştur. Melez erkek hayvanların 2 tanesi heterozigot olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.3: Homozigotlu/Heterozigotluğun Cinsiyete ve Saf kan/Melez Olmasına Göre

	Saf kan		Melez	
	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi
Homozigot	31	140	8	40
Heterozigot	9	53	2	4

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmadan elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma ile kategorik değişkenler için frekans ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Nicel değişkenlerin (yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısı) ırklara ve heterozigot/homozigot sayısına göre karşılaştırılmasında bağımsız örneklemeler için t testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin (cinsiyet, heterozigot/homozigot) ırklara göre karşılaştırılmasında ise Ki-kare testi kullanılmıştır. Analizler SPSS 22.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. $p < 0,05$ anlamlılık seviyesi seçilmiştir.

4.1. İstatistiksel Analiz Bulguları

Holştein ve Holştein melezi sığırların bazı özelliklerine ilişkin bulgular, frekans ve yüzde dağılımları tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1: Holstein Sığırların Bireysel Özelliklerine İlişkin Bulgular

Değişkenler		N (%)	
Saf/Melez	Saf	245 (81,67)	
	Melez	55 (18,33)	
Cinsiyet	Erkek	50 (16,67)	
	Dişi	250 (83,33)	
Homozigot/Heterozigot	Homozigot	219 (76,31)	
	Heterozigot	68 (23,69)	
Aylık Yaş (N=300) (Ort±Ss / Medyan(Min-Maks))		37,40 ± 19,59	35,5 (6 -105,1)
Tohumlama (N=247) (Ort±Ss / Medyan(Min-Maks))		1,79 ± 1,21	2 (0 -6)
Laktasyon (N=222) (Ort±Ss / Medyan(Min-Maks))		1,20 ± 0,90	1 (0 -5)

Çalışmamızda kullanılan hayvanların %81,67’si (n=245) saf holstein ırkı iken %18,33’ü (n=55) melezi holstein ırkına ait sığırlardan oluşmaktadır ve toplam hayvan sayısı 300 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan hayvanların cinsiyet dağılımları ise, %83,33’ü (n=250) dişi iken %16,67’si (n=50) erkek hayvanlardan oluşmaktadır. Yapılan çalışmada alellerin, %76,31’i (n=219) homozigot iken %23,69’u (n=68) heterozigot olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan hayvanların yaş ortalamaları $37,4 \pm 19,59$ ay, tohumlama sayısı ortalaması $1,79 \pm 1,21$, laktasyon ortalaması ise $1,20 \pm 0,90$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1)

Tablo 4.2’de Irkların cinsiyet ve heterozigot/homozigotluğa göre karşılaştırılmasına yönelik ki kare analizi sonuçları sunulmuştur. Tablo incelendiğinde saf/melezi dişi ve erkek olarak benzer dağılım gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0,739>0,05$). Buna ek

olarak çalışmada saf/melezlerin heterozigot/homozigot üzerinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür ($p=0,016<0,05$).

Tablo 4.2: Saf kan/Melez Dağılımının Cinsiyet ve Heterozigot/homozigotluğa Göre Karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar	Saf	Melez	*X ²	**p
Cinsiyet	Erkek	40(16,3)	10(18,2)	0,111	0,739
	Dişi	205(83,7)	45(81,8)		
Heterozigot/ homozigotluk	Homozigot	171(73,4)	48(88,9)	5,824	0,016
	Heterozigot	62(26,6)	6(11,1)		

*X²: Ki-kare testi; **p<0,05

Tablo 4.2 incelendiğinde Saf erkek hayvanların %16,3 (n=40) olduğu melez erkek hayvanların ise %18,2 (n=10) olduğu görülmüştür. Buna ek olarak dişi saf hayvanların %83,7 (n=205) olduğu, melez hayvanların %81,8 (n=45) olduğu görülmüştür (Tablo 4.2).

Saf kanların %73,4'ü (n=171) homozigot, %26,6' sının (n=62) ise heterozigot olduğu görülmüştür. Buna ek olarak melez hayvanların %88,9'unda (n=48) homozigotluk görülürken %11,1'inde (n=6) heterozigotluk görülmüştür (Tablo 4.2).

Bizim çalışmamızda, saf kan hayvanlarda heterozigotluk melezlere göre daha yüksek çıkmıştır. Buda demek olur ki saf kan hayvanlarda heterozigot olma olasılığı daha yüksektir. Saf kan hayvanlar, Holstein Friesian ırkının tam genom dizisini taşımaktadır. Melez hayvanlarda ise hayvan materyali kısmında bahsedilen Holstein X Simental melezlemesinden dolayı genom diziminde değişiklik olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.3'de aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısının saf/melez olmalarına göre karşılaştırılmasına ilişkin analiz sonuçları sunulmuştur. Çalışmanın tutarlı olması için, aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısında istatistiksel olarak bir fark beklenmemiştir. Tablo 4.3'daki bulgular incelendiğinde saf/melez

arasında aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısı bakımından anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.3: Aylık Yaş, Tohumlama Sayısı ve Laktasyon Sayısının Saf/Melez'e Göre Karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar	*N	** $\bar{x}$	***SS	****p
Aylık Yaş	Saf	245	37,05	19,49	0,510
	Melez	55	38,98	20,13	
Tohumlama Sayısı	Saf	203	1,80	1,23	0,709
	Melez	44	1,73	1,15	
Laktasyon Sayısı	Saf	179	1,16	0,90	0,220
	Melez	43	1,35	0,87	

*Hayvan sayısı **Değerlerin ortalaması ***Değerlerin standart sapması **** $p<0,05$

Saf hayvanların yaş ortalaması ve standart sapma değerleri, $37,05 \pm 19,59$ ay olarak hesaplanmış olup Melez hayvanlar için yaş ortalaması ve standart sapma değerleri ise. $38,98 \pm 20,13$ olarak hesaplanmıştır. Saf hayvanların tohumlama sayısına göre ortalaması ve standart sapma değerleri, $1,80 \pm 1,23$ olarak hesaplanmış olup Melez hayvanlar için tohumlama sayısına göre ortalaması ve standart sapma değerleri ise. $1,73 \pm 1,15$ olarak hesaplanmıştır. Saf hayvanların laktasyon sayısına göre ortalaması ve standart sapma değerleri, $1,16 \pm 0,90$ olarak hesaplanmış olup Melez hayvanlar için laktasyon sayısına göre ortalaması ve standart sapma değerleri ise. $1,35 \pm 0,87$ olarak hesaplanmıştır. (Tablo 4.3)

Aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısının kendi içinde gruplar oluşturularak safkan/melez olmasına göre karşılaştırılmasına yönelik ki kare testi ve bağımsız örneklem için t testi sonuçları Tablo 4.4’de sunulmuştur. Tablo 4.4’deki bulgular incelendiğinde saf/melez arasında aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısı bakımından kendi içinde gruplar oluşturulmuş ve bu gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.4: Aylık Yaş, Tohumlama Sayısı ve Laktasyon Sayısının Gruplar Halinde Saf/Melez’e Göre Karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar	Saf	Melez	*X ²	**p
Aylık Yaş	0-12 Ay	26(10,6)	5(9,1)	0,650	0,722
	12-24 Ay	45(18,4)	8(14,5)		
	24 Ay Üzeri	174(71)	42(76,4)		
Tohumlama	0	30(14,8)	7(15,9)	0,038	0,998
	1	56(27,6)	12(27,3)		
	2	65(32)	14(31,8)		
	3 ve Üzeri	52(25,6)	11(25)		
Laktasyon	0	39(21,8)	8(18,6)	0,210	0,646
	1 ve Üzeri	140(78,2)	35(81,4)		

*X²: Ki-kare testi; **p<0,05

Aylık yaşlar kendi aralarında 3 farklı gruba ayrılmış ve saf/melez olmalarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 olarak seçilen hayvınların aylık yaşları 0-12 arasında olup, 26 saf kan hayvandan ve 5 melez hayvandan oluşmaktadır. Grup 2 olarak seçilen hayvınların aylık yaşları 12-24 arasında olup, 45 saf kan hayvandan ve 8 melez hayvandan oluşmaktadır. Grup 3 olarak seçilen hayvınların aylık yaşları 24 aylık ve üzeri olup, 174 saf kan hayvandan ve 42 melez hayvandan oluşmaktadır (Tablo 4.4).

Tohumlama sayısı 4 farklı gruba ayrılmış ve saf/melez olmalarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 0 olup, 30 saf kan hayvandan ve 7 melez hayvandan oluşmaktadır. Grup 2 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 1 olup, 56 saf kan hayvandan ve 12 melez hayvandan oluşmaktadır. Grup 3 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 2 olup, 65 saf kan hayvandan ve 14 melez hayvandan oluşmaktadır. Grup 4 olarak seçilen hayvınların

tohumlama sayısı 3 ve 3'ün üzeri olup, 52 saf kan hayvandan ve 11 melez hayvandan oluşmaktadır (Tablo 4.4).

Laktasyon sayısı kendi içinde 2 farklı gruba ayrılmış ve saf/melez olmalarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 olarak seçilen hayvınların laktasyon sayısı 0 olup 39 saf kan hayvandan ve 8 melez hayvandan oluşmaktadır. Grup 2 olarak seçilen hayvınların laktasyon sayısı 1 ve üzeri olup, 140 saf kan hayvandan ve 35 melez hayvandan oluşmaktadır (Tablo 4.4).

Aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısının kendi içinde gruplar oluşturularak heterozigot/homozigotluğa göre karşılaştırılmasına yönelik ki kare testi ve bağımsız örneklem için t testi sonuçları Tablo 4.5'de sunulmuştur. Tablo 4.5'deki bulgular incelendiğinde heterozigot/homozigotluğa arasında aylık yaş, tohumlama sayısı ve laktasyon sayısı bakımından kendi içinde gruplar oluşturulmuş ve bu gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.5: Aylık Yaş, Tohumlama Sayısı ve Laktasyon Sayısının Gruplar Halinde Heterozigot/Homozigotluğa Göre Karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar	Homozigot	Heterozigot	*X ²	**p
Aylık Yaş	0-12 Ay	29(13,2)	2(2,9)	5,762	0,056
	12-24 Ay	38(17,4)	14(20,6)		
	24 Ay Üzeri	152(69,4)	52(76,5)		
Tohumlama	0	28(15,7)	5(8,9)	1,829	0,609
	1	49(27,5)	15(26,8)		
	2	57(32)	20(35,7)		
	3 ve Üzeri	44(24,7)	16(28,6)		
Laktasyon	0	37(23,6)	9(17,3)	0,892	0,345
	1 ve Üzeri	120(76,4)	43(82,7)		

*X²: Ki-kare testi; **p<0,05

Aylık yaşlar kendi aralarında 3 farklı gruba ayrılmış ve heterozigot/homozigot olmalarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 olarak seçilen hayvınların aylık yaşları 0-12 arasında olup, 29 hayvan homozigot ve 2 hayvan heterozigot olarak bulunmuştur. Grup 2 olarak seçilen hayvınların aylık yaşları 12-24 arasında olup, 38 hayvan homozigot ve 14 hayvan heterozigot olarak bulunmuştur.. Grup 3 olarak seçilen

hayvınların aylık yaşıları 24 aylık ve üzeri olup, 152 hayvan homozigot ve 52 hayvan heterozigot olarak bulunmuştur. (Tablo 4.5).

Tohumlama sayısı 4 farklı gruba ayrılmış ve heterozigot/homozigot olmalarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 0 olup, 28 hayvan homozigot ve 5 hayvında heterozigot olarak bulunmuştur. Grup 2 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 1 olup, 49 hayvan homozigot ve 15 hayvında heterozigot olarak bulunmuştur Grup 3 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 2 olup, 57 hayvan homozigot ve 20 hayvında heterozigot olarak bulunmuştur. Grup 4 olarak seçilen hayvınların tohumlama sayısı 3 ve 3'ün üzeri olup, 44 hayvan homozigot ve 16 hayvında heterozigot olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Laktasyon sayısı kendi içinde 2 farklı gruba ayrılmış ve heterozigot/homozigot olmalarına göre karşılaştırılmıştır. Grup 1 olarak seçilen hayvınların laktasyon sayısı 0 37 hayvan homozigot ve 9 hayvında heterozigot olarak bulunmuştur Grup 2 olarak seçilen hayvınların laktasyon sayısı 1 ve üzeri olup, 120 hayvan homozigot ve 43 hayvında heterozigot olarak bulunmuştur (Tablo 4.5).

Saf/Melez ve cinsiyet dağılımının heterozigot/homozigotluğa göre karşılaştırılmasına yönelik bağımsız örneklem için Ki-kare testi sonuçları Tablo 4.6'de sunulmuştur. Tablo 4.6 incelendiğinde homozigot ve heterozigotluğun ırk ve cinsiyet üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p=0,078<0,05$).

Tablo 4.6. Saf/melez ve Cinsiyet Dağılımının Heterozigot/homozigot Göre Karşılaştırılması

Değişken	Gruplar	Saf		Melez		*X ²	**p
		Erkek	Dişi	Erkek	Dişi		
Heterozigot/ Homozigot	Homozigot	31(14,2)	140(63,9)	8(3,7)	40(18,3)	6,812	0,078
	Heterozigot	9(13,2)	53(77,9)	2(2,9)	4(5,9)		

*X²: Ki-kare testi; **p<0,05

Erkek hayvanların heterozigot/homozigot dağılımı saf ve meleze göre incelendiğinde; homozigot saf erkek hayvanların %14,2 (31) olarak hesaplanmış olup melez erkek hayvanlarda ise %3,7 (8) olarak hesaplanmıştır. Heterozigot saf erkek hayvanların %13,2 (9) olarak hesaplanmış olup melez erkek hayvanlar %2,9 (2) olarak hesaplanmıştır.

Dişi hayvanların heterozigot/homozigot dağılımı saf ve meleze göre incelendiğinde; homozigot saf dişi hayvanların %63,9 (140) olarak hesaplanmış olup melez dişi hayvanlarda ise %18,3 (40) olarak hesaplanmıştır. Heterozigot saf dişi hayvanların %77,9 (53) olarak hesaplanmış olup melez dişi hayvanlarda ise %5,9, (4) olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Genetik değeri en yüksek olan babalardan bazılarının, doğurganlığı etkileyen resesif mutasyonları barındırdığı ve bunun popülasyonda hızla yayılabileceği gösterilmiştir. Bu bozukluklar ineklerde tohumlama başına düşük ve gebelikte azalma ile sonuçlanabilmektedir. (Ghanem vd., 2018).

PCR tabanlı deneyler, bu tür genetik mutasyonların taranması için en uygun ve ekonomik yöntemleri oluşturmaktadır (Mamotte, 2006). HH1 mutasyonun (APAF1) tanısı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi ve sekans dizilimi ile ortaya konulmuştur. Bu yöntemlere ek, tek sarmallı konformasyon PCR (Kaminski,2020), alelik spesifik PCR (Ghanem vd., 2018), ve amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi PCR (Kumar vd., 2020), gibi test yöntemleri de kullanılabilir. Biz kendi çalışmamızda bu yöntemlerden ARMS-PCR yöntemini kullandık.

Holstein haplotip 1, dünya çapında Holstein Friesian sığırlarında erken embriyonik kayıplardan ve abortlardan sorumlu olan ölümcül mutasyonlardan birisidir. HH1'in taranması için ARMS-PCR tekniği kullanılarak, PCR bazlı analiz geliştirilmiş ve doğrulanmıştır (Kumar 2020) HH1'in nedeninin sığır kromozu 5 (BTA5)'teki apoptoz peptid aktive edici faktör 1 geninde anlamsız bir mutasyon (g.C6315040T; p.Gln579X) olduğu bulunmuştur. APAF1 genindeki ekson 11'de sitozinin timin (C→T) ile yer değiştirmesi sonucu oluşan mutasyondan kaynaklandığı ve 579 amino asit pozisyonunda (Q579X) erken durdurma kodonu ile Glutamin değişimine yol açtığı tespit edilmiştir (Adams vd., 2016).

Fritz ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada kullandıkları toplam 47 878 Holstein Frisian ırkı sığır kullanılmıştır. Bu çalışmaya dâhil edilen tüm hayvanlar, Illumina Bovine 50k BeadchipH ile genotiplendirilmiş ve babaları ile anne tarafından büyükbabaları aynı çiple genotiplendirilmişlerdir. HH1 mutasyonu için test edilen 4 878 hayvandan 1 245'inde (%2,6) mutasyon varlığı görülmüştür.

İnal ve Çam (2015) tarafından yapılan çalışmada, Türkiye'ye ithal edilen boğa spermaları incelenmiştir. İncelenen 273 boğa spermasından 1'inde (%0,36) heterozigotluk (HH1 taşıdığı) tespit edilmiştir.

Ghanem ve arkadaşlarının (2018) Japon'da, yaptıkları çalışmada, 240 Holstein-Friesian sığırı kullanılarak (dişi 240), APAF1 geninin 11. ekzonundaki tek bazlık mutasyonu ayırt etmek için alele spesifik PCR (AS-PCR) kullanmışlardır. APAF1'deki C/T mutasyonunu AS-PCR yöntemi kullanarak etkili bir şekilde ayırt etmişlerdir. Çalışmada kullanılan 240 inekten 7 ineğin (%2,9) APAF1 mutant alelinin bir kopyasını taşıdığını tespit etmişlerdir (Ghanem vd., 2018).

Kumar ve arkadaşları (2020) Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada, 228 erkek hayvan kullanarak, HH1'in taranması için Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi PCR tekniğinden yararlanmışlardır. HH1 için amplifiye edilmiş ürünler %2,5 agaroz jeli kullanılarak jel elektroforezi ile görselleştirilip yorumlanmıştır. ARMS PCR testi, tek PCR reaksiyonunda HH1 mutasyonunun tespiti için geliştirilmiştir. ARMS PCR'da üç farklı fragman (mutant T aleli için 105 bp, normal C aleli için 140 bp ve ortak fragman olarak 189 bp) normal ve HH1 taşıyıcı numunelerini ayırt etmek için kullanılmıştır. Bu teknik ile taşıyıcı frekansını %3,34 olarak bulmuşlardır.

Daha önceki alel spesifik PCR analizi ile HH1 mutasyonunun saptanması amacıyla homozigot ve heterozigot aleli ayrı ayrı çoğaltmak için iki PCR reaksiyonu gerekli olmaktadır (Ghanem vd., 2018). ARMS PCR yönteminde, tek PCR reaksiyonunda amplifikasyonun özgüllüğünün daha yüksek olması nedeniyle alel spesifik PCR'a göre daha iyi bir teknik olarak kabul edilmektedir (Little, 1997).

Kamiński yaptığı çalışmada (2020), Polonya'da 1996-2017 yılları arasında doğan boğaları analiz ederek 178 erkek hayvanı (boğa) çalışmasında kullanmıştır. Yaptığı çalışma ile, potansiyel Q579X polimorfizmi taşıyıcılarını taramak için hızlı ve ucuz bir yöntem kullanmak ve bir Polonya Holstein-Friesian boğa örneğinde yaygınlığını kontrol etmek istemiştir. Kamiński (2020), HH1'den sorumlu C/T anlamsız mutasyonunun neden olduğu APAF1 genini yeni polimeraz zincir reaksiyonu tek iplikli konformasyon polimorfizmi (PCR-SSCP) tekniği ile teşhis etmiştir. PCR-SSCP yöntemi, HH1'den sorumlu APAF1 mutasyonunun net bir şekilde tanımlanmasında kullanılmıştır ve jel elektroforez görüntüsünde, C/C homozigotlarında 3 bant ve C/T heterozigotlarında 4 bant görüntüsü görmüştür ve 178 boğa arasında 85 HH1 (%47.75) taşıyıcısı bulmuştur (Kamiński 2020).

Khatib ve arkadaşları (2020) Rusya’da yapılan bir çalışmada toplam 1 991 Holstein Frisian ırkı sığır (1 500 erkek 491 dişi) kullanarak çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. HH1 için test ettikleri hayvan sayısı 1 521 baş hayvandan oluşmaktadır. Çalışmalarında DNA çipleri kullanarak genotiplendirme yapmışlar ve PCR ile çoğaltıp görüntüsünü almışlardır. HH1 mutasyonu için test edilen 1 521 hayvandan 45’inde (2,96) mutasyon varlığı görülmüştür.

Briano-Rodriguez ve arkadaşları (2021) Uruguay’da bulunan 27 çiftlikten toplam 383 buzağının (1-30 günlük) HH1 mutasyonunun araştırması için BeadChip Bovino 50K (GeneSeek) kiti kullanarak genotiplerini belirlemişlerdir. Bu belirlenen genotiplere göre HH1 mutasyonu 383 buzadan 17 (%4,44) adedinde görülmüştür.

Khan ve arkadaşların (2021) Çin’in Pekin kentinde bulunan altı süt çiftliğinden toplamda 1 633 Holstein Frisian ırkı sığırdan kan örnekleri alınmış ve Kompetitive aler-spesifik PCR (KASP) yöntemiyle HH1 mutasyonu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda 1 633 inekten 113 (%6,92) adedinin HH1 mutasyonunu taşıdığı tespit edilmiştir.

Albertino ve arkadaşları (2022), Brezilya’da yaptıkları çalışmada toplam 248 Holstein Frisian ırkı sığırın DNA örneklerini (210 inek ve 38 boğa) ARMS-PCR tekniği kullanarak analiz etmişlerdir. Araştırmayı yapan bilim adamları tarafından geliştirilen primerleri doğrulamak için sentetik genler üretilmiştir. ARMS-PCR tekniği için geliştirilen primerler ve protokol, genotiplere göre ampikon oluşumları beklendiği gibi olduğundan %100 özgüllük ve etkinlikle çalışmaktadır. Burada doğrulanan APAF1 mutasyonu için ARMS-PCR protokolü, hayvanların genotipini belirlemek için nispeten basit ve ekonomik bir yöntem olabilir. Bu çalışmada değerlendirilen ineklerin ve boğaların ortalama yaşları sırasıyla ortalamaları ve standart sapmaları, 5 ($\pm 1,5$) ve 3 ($\pm 1,5$) şeklinde bulunmuştur. Sonuç olarak, Brezilya Holstein sığır popülasyonunda yapılan bu prevalans çalışmasında APAF1’den sorumlu mutasyon tespit edilememiştir (Albertino vd., 2022).

Ussenbekov ve arkadaşları (2022) Kazakistan’da yaptıkları çalışmada toplam 164 Holstein Frisian ırkı sığır için HH1 mutasyonunu, PCR-Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemiyle araştırmışlardır. Yaptıkları araştırma

sonucunda Kazakistan’da yapılan bu çalışmada HH1 mutasyonuna rastlanılmamıştır.

Albertino ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışmada, kullanılan ineklerin ortalama yaşları ve standart sapması 60 ± 18 ay şeklinde bulunmuştur. Boğaların ortalama yaşları standart sapmaları, 36 ± 18 ay şeklinde bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada; Saf hayvanların yaş ortalaması ve standart sapma değerleri, $37,05 \pm 19,59$ ay olarak hesaplanmıştır. Melez hayvanlar için yaş ortalaması ve standart sapma değerleri ise. $38,98 \pm 20,13$ olarak hesaplanmıştır.

Khan ve arkadaşları (2024), Çin'in Pekin kentindeki Holstein Frisian ırkı sığırlardan toplamda 484 baş hayvandan rastgele kan örneği almışlardır. Bu alınan kan örneklerinde multipleks floresan amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi (mf-ARMS) PCR yöntemini ve tek baz farkını bile tespit edebilen kılcal elektroforez kullanılarak HH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. mf-ARMS PCR yöntemi PCR, 2x PCR karışımı (5µL), mf-ARMS primer karışımı 10µm (1µL), nükleaz içermeyen saf su (3µL) ve şablon DNA 50ng/µL (1µL) içeren 10µL reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Optimum bağlanma sıcaklığı 58°C olarak bulunmuştur. Primerlerle örtüşen lokusların parçalarını ve boyutlarını floresan FAM veya HEX boyası ile etiketlemişler ve yoğunluğa göre ayarlamışlardır. Yapılan bu çalışma sonrasında Pekin’den alınan 484 örnekten 14 (%2,89) tanesinde HH1 mutasyonu vardır ve bu hayvanlar heterozigottur.

Kumar ve arkadaşlarının (2020) ARMS-PCR protokolü ile karşılaştırıldığında, Albertino ve arkadaşlarının (2022) protokolü ile karşılaştırıldığında birkaç farklılığı vardır, ampikon parçalarının boyutları ilk olarak verilenler Kumar ve arkadaşlarına (2020) aitken ikinci olarak verilenler Albertino ve arkadaşlarına (2022) aittir, dış primerler için 189 bp, iç (C) için 140 bp ve iç (T) için 105 bp'ye karşı dış primerler için 430 bp, iç için 286 bp (C) ve iç (T) için 198 bp şeklinde idi. Amplifikasyon koşulları karşılaştırıldığında ise 95°C 'de 3 dakika ilk denatürasyon, ardından 94°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika 35 döngü olacak şekilde ve son olarak 72°C'de 10 dakika Kumar ve arkadaşları (2020) tarafından yapılmıştır. Albertino ve arkadaşları (2022) tarafından, 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyon,

ardından 95°C'de 45 saniye, 60,1°C'de 1 dakika, 72°C'de 45 saniye 35 döngü olacak şekilde, son olarak da 72°C'de 10 dakika şeklinde yapılmıştır.

Khan ve arkadaşları (2024), yaptıkları çalışmada ARMS-PCR yöntemini floresan boya kullanarak yapmışlardır ve 95°C'de 5 dakika ilk denatürasyon, ardından bunu 95°C'de 30 saniye, 58°C'de 1 dakika, 30 döngü olacak şekilde ve son olarak 60°C'de 30 dakika şeklinde yapmışlardır.

Çalışmamızda amplikon parçalarının boyutları Kumar ve arkadaşlarının da (2020) belirttiği gibi, dış primerler için 189 bp, iç (C) için 140 bp ve iç (T) için 105 bp olarak belirlenmiştir. Bizim kullandığımız Amplifikasyon koşulları, ilk denatürasyon 95°C'de 3 dakika, ardından 95°C'de 30 saniye, primerlerin bağlanması için 61°C'de 30 saniye, 72°C'de 45 saniye olacak şekilde 40 döngü; son olarak 72°C'de 10 dakika ve 4 °C'de bekletilecek şekilde programlanmıştır.

ARMS-PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan HH1 mutasyonunun varlığını tespit etmek için jel elektroforez kullanılmıştır. Bu durum araştırmacılara göre farklılık göstermektedir. Kumar ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada %2,5'luk jel kullanmış, Ussenbekov ve arkadaşları (2020) ise %3'luk jel kullanmışlardır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada %2'lik jel kullanılmıştır. Khan ve arkadaşları (2024), ise kılcal elektroforez yöntemini kullanmışlardır.

Bizim çalışmamızda, HH1 mutasyonuna sebep olan APAF1 geninin prevalansı, yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde bir sonuç vermiştir. Çalışmamızda, 300 baş örneğin 245'i saf kan hayvanlardan oluşmaktadır. Saf kan hayvanlardan alınan bu örneklerin 171'i homozigot, 62'si ise heterozigot olarak bulunmuş ve 12'sinden görüntü alınamamıştır. Buna ek olarak 55 melez hayvandan alınan örneklerin 48'i homozigot, 6'si ise heterozigot olarak bulunmuş ve 1'inden görüntü alınamamıştır. Görüntü alınan 287 hayvana ait alellerin, %76,31'i homozigot (n=219) iken %23,69'u heterozigot (n=68) olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan hayvanların cinsiyet dağılımları ise, %83,33 dişi (n=250) iken %16,97'si erkek (n=50) hayvanlardan oluşmaktadır.

Yaptığımız çalışmada toplam 287 hayvandan 68'inde (%23,29) mutasyonun varlığı tespit edilmiştir. Fritz ve arkadaşları (2013) 47 878 hayvandan 1 245'inde (%2,6),

Khatib ve arkadaşları (2020) 1 521 hayvanadan 45'inde (%2,96), Khan ve arkadaşları (2021) 1633 hayvandan 113'ünde (%6,92) HH1 mutasyonunu tespit etmişlerdir. Khan ve arkadaşları (2024) 484 dişi hayvandan 14'ünde (%2,89) heterozigotluğa rastlamışlardır. Briano-Rodriguez ve arkadaşları (2021) 383 hayvandan 17'sinde (%4,44) heterozigotluğa rastlamışlardır. Ussenbekov ve arkadaşları (2022) ise 164 hayvandan hiç birinde HH1 mutasyonunun varlığına rastlamamışlardır.

Çalışmamızda kullanılan toplam 50 erkek hayvanlardan %22'si heterozigot olarak bulunmuştur. İnan ve Çam (2015) 273 boğa sperması (erkek) ile çalışmış olup 1'inde (%0,36) heterozigotluk tespit etmişlerdir. Kumar ve arkadaşları (2020) 228 erkek hayvanda çalışmış olup %3,34 heterozigotluk tespit etmişlerdir. Kamiński yaptığı çalışmada (2020), 178 boğa arasında 85'ini (%47.75) heterozigot olarak bulmuştur. Albertino ve arkadaşları (2022), yaptıkları çalışmada 38 erkek hayvan kullanmışlar ve heterozigotluğa rastlamamışlardır.

Çalışmamızda kullanılan toplam 238 dişi hayvanlardan 57'si (%24) heterozigot olarak bulunmuştur. Ghanem ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada, 240 dişi hayvanın 7'sinde (%2,9) heterozigotluk bulmuşlardır. Albertino ve arkadaşları (2022), yaptıkları çalışmada 210 dişi hayvan kullanmışlardır ve heterozigotluğa rastlamamışlardır.

Yaptığımız çalışmada kullanılan hayvan materyalinin saf kan/melez, dişi/erkek olarak homozigot ve heterozigotluğa oranı detaylı olarak incelenmiştir. Saf erkek hayvanların, homozigotluğu %14,2 (n=31) ve heterozigot %13,2 (n=9) olarak hesaplanmıştır. Melez erkek hayvanlarda ise homozigotluğu %3,7 (n=8) ve heterozigotluğu %2,9 (2) olarak tespit edilmiştir. Saf dişi hayvanların, homozigotluğu %63,9 (n=140) ve heterozigotluğu %77,9 (53) olarak hesaplanmıştır. Melez dişi hayvanlarda ise homozigotluğu %18,3 (n=40) ve heterozigotluğu %5,9, (4) olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan homozigot/heterozigotluk oranlarının diğer çalışmalara göre farklılık göstermesinin sebebi olarak, zamanında işletme için alınan boğa spermalarının kontrol edilmeksizin satın alınmış olabileceği, bu spermaların sürü

içerisinde kullanılması ve sürü içi çiftleşmeler neticesinde heterozigotluk oranının artmış olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kalıtsal hastalıklar, diğer birçok hastalıkta olduğu gibi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Kalıtsal hastalıkların, embriyo kayıplarına ve abortlara sebep olduğu bilinmektedir. Moleküler teknikler kullanılarak kalıtsal hastalıkların teşhisi daha kolay olmaktadır. Yapılan genetik araştırmalar ile kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonlar ortaya konulmaktadır.

Holşttein haplotiplerinin, Holşttein sığırlarında erken embriyonik kayıp ve abortlara neden olduğu bilinmektedir. HH1 bu haplotiplerin bir üyesidir ve APAF1 genininden kaynaklanan bir mutasyon sonucunda meydana gelmektedir. HH1 haplotipinin varlığı sığırlarda ve farelerde embriyonik ölümlere sebep olmaktadır ve yapılan çalışmalar bu durumu desteklemektedir. Holşttein sığırlarında HH1 mutasyonundan kaynaklanan döl verimi ve gebelik oranlarında düşüşler olmakta ve bu düşüşler ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Sağlıklı bir sürü elde etmek için HH1 gibi mutasyonları taşıyan boğaların tespit edilip sürülerde kullanılmasının önüne geçilmelidir. Suni tohumlamanın hızlı bir şekilde kullanılmasından dolayı sperma alımında ve ihracatında HH1 gibi mutasyonlardan arı hayvınların seçilmesi gerekmektedir.

Yapılan araştırma Türkiye’de bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca bu çalışma, Türkiye’de yetiştirilen Holşttein sığırlarında HH1 mutasyonları için yapılacak diğer genetik çalışmalara alt yapı oluşturacaktır.

7. KAYNAKÇA

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2), 423-432.
- Adams, H. A., Sonstegard, T. S., VanRaden, P. M., Null, D. J., Van Tassell, C. P., Larkin, D. M., Lewin, H. A. (2016). Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle. *Journal of dairy science*, 99(8), 6693-6701.
- Agerholm, J. S. (2007). Inherited disorders in Danish cattle. *Apmis*, 115, 1-76.
- Ajmone-Marsan, P., Garcia, J. F., Lenstra, J. A. (2010). On the origin of cattle: how aurochs became cattle and colonized the world. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 19(4), 148-157.
- Akyüz, B., & Ertuğrul, O. (2006). Veteriner hekimlikte kalıtsal bozuklukların belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 53-56.
- Akyüz, B., & Arslan, K. (2009). Sığır yetiştiriciliğini tehdit eden kalıtsal hastalıklar. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 43-51.
- Alpan, O., Arpacık, R. (1998). Sığır yetiştiriciliği. *Baskı, Şahin Matbaası, Ankara*, 184-197.
- Arthur, P. F., Renand, G., Krauss, D. (2001). Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. *Livestock Production Science*, 68(2-3), 131-139.
- Albertino, L. G., Albuquerque, A. L. H., Ferreira, J. F., Oliveira, J. P. M., Borges, A. S., Patelli, T. H. C., Oliveira-Filho, J. P. (2022). Allele Frequency of APAF 1 Mutation in Holstein Cattle in Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 822224..
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, . C., Boeckmann, B, Ferro, S, Yeh, L. S. L. (2004). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D115-D119.
- Arpacık, R. (1982). Sığır yetiştiriciliği. *Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayınları*, (6-004), 0056
- Baruch, E., Weller, J. I., Cohen-Zinder, M., Ron, M., & Seroussi, E. (2006). Efficient inference of haplotypes from genotypes on a large animal pedigree. *Genetics*, 172(3), 1757-1765.
- Berry, D. P., Wall, E., & Pryce, J. E. (2014). Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *animal* 8 (1), 105–121. doi: 10.1017/S1751731114000743.
- Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Bertorelle, G. (2006). The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), 8113-8118.
- Blake, J. A., Bult, C. J., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Eppig, J. T., Mouse Genome Database Group. (2010). The Mouse Genome Database (MGD): premier model organism resource for mammalian genomics and genetics. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D842-D848.

- Boyacıoğlu, S. Ö., Dündar, M. (2012). Gen haritalama stratejileri. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 21(1), 50-60.
- Bruford, M. W., Bradley, D. G., Luikart, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4(11), 900-910.
- Briano-Rodriguez, C., Romero, A., Llambí, S., Sica, A. B., Rodriguez, M. T. F., Giannitti, F. ve Quintela, F. D. (2021). Lethal and semi-lethal mutations in Holstein calves in Uruguay. *Ciência Rural*, 51(7), e20200734.
- Brito, L. F., Bédère, N., Douhard, F., Oliveira, H. R., Arnal, M., Peñagaricano, F., Miglior, F. (2021). Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. *Animal*, 15, 100292.
- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*, 94(6), 727-737.
- Charlier, C., Agerholm, J. S., Coppieters, W., Karlskov-Mortensen, P., Li, W., De Jong, G., Fredholm, M. (2012). A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. DOI: 10.1371/journal.pone.0043085
- Citek, J., Rehout, V., Hajkova, J., Pavkova, J. (2006). Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med*, 51(6), 333-339.
- Citek J., Rehout V., Hajkova J., Pavkova J., (2006). Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med Czech*, 51(6): 333–339.
- Cole, J. B., Null, D. J., VanRaden, P. M. (2016). Phenotypic and genetic effects of recessive haplotypes on yield, longevity, and fertility. *Journal of dairy science*, 99(9), 7274-7288.
- Cooper, T. A., Wiggans, G. R., Null, D. J., Hutchison, J. L., Cole, J. B. (2014). Genomic evaluation, breed identification, and discovery of a haplotype affecting fertility for Ayrshire dairy cattle. *Journal of dairy science*, 97(6), 3878-3882.
- Freeman, A. R., Meghen, C. M., MacHugh, D. E., Loftus, R. T., Achukwi, M. D., Bado, A., Bradley, D. G. (2004). Admixture and diversity in West African cattle populations. *Molecular Ecology*, 13(11), 3477-3487.
- Frisch, J. E., Vercoe, J. E. (1977). Food intake, eating rate, weight gains, metabolic rate and efficiency of feed utilization in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. *Animal Science*, 25(3), 343-358.
- Fritz, S., Capitan, A., Djari, A., Rodriguez, S. C., Barbat, A., Baur, A., Boichard, D. (2013). Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PloS one*, 8(6), e65550.
- Fritz, S., Hoze, C., Rebours, E., Barbat, A., Bizard, M., Chamberlain, A., ... & Capitan, A. (2018). An initiator codon mutation in SDE2 causes recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Journal of dairy science*, 101(7), 6220-6231.
- Forsheew, T., Johnson, C. A. (2004). SCAMP: a spreadsheet to collate autozygosity mapping projects. *Journal of Medical Genetics*, 41(12), e125-e125.
- Georges, M., Charlier, C., Hayes, B. (2019). Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nature Reviews Genetics*, 20(3), 135-156.

- Ghanem, M. E., Nishibori, M., Isobe, N., Hisaeda, K. (2018). Detection of APAF1 mutation in Holstein cows and mummified fetuses in Japanese dairy herds. *Reproduction in domestic animals*, 53(1), 137-142.
- Glusman, G., Cox, H. C., Roach, J. C. (2014). Whole-genome haplotyping approaches and genomic medicine. *Genome medicine*, 6, 1-16.
- Grigson, C. (1991). An African origin for African cattle?—some archaeological evidence. *African Archaeological Review*, 9(1), 119-144.
- Han, Y., Peñagaricano, F. (2016). Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. *BMC genetics*, 17, 1-11.
- Hansen, P. J. (2011). Challenges to fertility in dairy cattle: from ovulation to the fetal stage of pregnancy. *Rev Brasil Reprod Anim*, 35, 229-238.
- Hayes, B. J., Lewin, H. A., Goddard, M. E. (2013). The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in genetics*, 29(4), 206-214.
- Healy, P. J. (1996). Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *Journal of Animal Science*, 74(4), 917-922.
- Honarpour, N., Gilbert, S. L., Lahn, B. T., Wang, X., Herz, J. (2001). APAF1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9683-9687
- Hozé, C., Escouflaire, C., Mesbah-Uddin, M., Barbat, A., Boussaha, M., Deloche, M. C., Capitan, A. (2020). A splice site mutation in CENPU is associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 607-612.
- İnal Ş., Çam M., (2016). Türkiye’de 2015 yılında Sperması İthal Edilen Boğalardaki Kalıtsal Kusurlar. *EurAsian J Vet Sci*, 32(4): 278-284
- İnt. Kay. 1, https://tr.wikipedia.org/wiki/Bereketli_Hilal#/media/Dosya:Fertile_Crescent.png /, Erişim tarihi: 30.06.2024
- İnt. Kay. 2, https://www.tarimorman.gov.tr/HAYGEM/Belgeler/Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/B%C3%BCy%C3%BCKba%C5%9F%20Hayvanc%C4%B1%C4%B1k/2019%20Y%C4%B1%C4%B1/Damizlik_sigir_secimi.pdf/, Erişim tarihi: 30.05.2024
- Kamiński, S. (2020). Novel method for identification of the lethal mutation in bovine APAF1 gene and its preliminary prevalence in Polish Holstein-Friesian bulls. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(1).
- Khan, M. Y. A., Omar, A. I., He, Y., Chen, S., Zhang, S., Xiao, W., ve Zhang, Y. (2021). Prevalence of nine genetic defects in Chinese Holstein cattle. *Veterinary medicine and science*, 7(5), 1728-1735.
- Khan, M. Y. A., Dai, D., Su, X., Tian, J., Zhou, J., Ma, L., ve Zhang, Y. (2024). Multiplex fluorescent amplification-refractory mutation system PCR method for the detection of 10 genetic defects in Holstein cattle and its comparison with the KASP genotyping assay. *Animal Genetics*, 55(3), 457-464.
- Khatib, A., Mazur, A. M. ve Prokhortchouk, E. (2020). The distribution of lethal Holstein haplotypes affecting female fertility among the Russian Black-and-White cattle. *EurAsian Journal of BioSciences*, 14(2), 2545-2552.

- Kumar, A., Gupta, I.D., Mohan, G., Vineeth, M.R., Jayakumar, S., Niranjan, S. K. (2020). Development of PCR based assays for detection of lethal Holstein haplotype 1, 3 and 4 in Holstein Friesian cattle. *Molecular and cellular probes*, 50, 101503.
- Larkin, D. M., Daetwyler, H. D., Hernandez, A. G., Wright, C. L., Hetrick, L. A., Boucek, L., Lewin, H. A. (2012). Whole-genome resequencing of two elite sires for the detection of haplotypes under selection in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), 7693-7698.
- Little, S. (1995). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics*, 7(1), 9-8
- Loftus, R. T., MacHugh, D. E., Bradley, D. G., Sharp, P. M., Cunningham, P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7), 2757-2761.
- MacHugh, D. E., Shriver, M. D., Loftus, R. T., Cunningham, P., Bradley, D. G. (1997). Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, 146(3), 1071-1086.
- McClure, M. C., Bickhart, D., Null, D., VanRaden, P., Xu, L., Wiggans, G., Sonstegard, T. S. (2014). Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2, and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3. *PloS one*, 9(3), e92769.
- McTavish, E. J., Decker, J. E., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., & Hillis, D. M. (2013). New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), E1398-E1406.
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Müller, M., Berger, J., Gersdorff, N., Cecconi, F., Herken, R., Quondamatteo, F. (2005). Localization of Apaf1 gene expression in the early development of the mouse by means of in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 234(1), 215-221.
- Newton, C. R., Graham, A., Heptinstall, L. E., Powell, S. J., Summers, C., Kalsheker, N., Markham, A. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17(7), 2503-2516.
- Özkök, H., Uğur, F. (2007). Türkiye’de yetiştirilen Esmer ve Siyah Alaca sığırlarda süt verimi, ilk buzağılama yaşı ve servis periyodu. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38(2), 143-149.
- Pellecchia, M., Negrini, R., Colli, L., Patrini, M., Milanese, E., Achilli, A., Ajmone-Marsan, P. (2007). The mystery of Etruscan origins: novel clues from *Bos taurus* mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1614), 1175-1179
- Rezende, F. M., Dietsch, G. O., Peñagaricano, F. (2018). Genetic dissection of bull fertility in US Jersey dairy cattle. *Animal genetics*, 49(5), 393-402.
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(5), 405-413.
- Schütz, E., Wehrhahn, C., Wanjek, M., Bortfeld, R., Wemheuer, W. E., Beck, J., Brenig, B. (2016). The Holstein Friesian lethal haplotype 5 (HH5) results from a complete

- deletion of TBF1M and cholesterol deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) insertion into the coding region of APOB. *PloS one*, 11(4), e0154602.
- Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R. R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Sharma, A. (2014). Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic medicine*, 6(2), 49-58.
- Sonstegard, T. S., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Van Tassell, C. P., Null, D. J., Schroeder, S. G., McClure, M. C. (2013). Identification of a nonsense mutation in CWC15 associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle. *PloS one*, 8(1), e54872.
- Soysal, M. İ. (2016). Çiftlik hayvanlarında genetik iyileştirme. *Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü. Biyometri Genetik Ana Bilim Dalı*, 52-57s.
- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968): 789-796. doi: 10.1038/nature02168 PMID 14685227
- Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A. H., Holm, L. E., Bendixen, C. (2006). A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome research*, 16(1), 97-105.
- Ussenbekov, Y., Bagdat, A., Bimenova, Z., Orynkhonov, K., Sobiech, P., Samardžija, M. ve Dobos, A. (2022). Identification of monomorphic and polymorphic genes associated with recessive fertility defects in Holstein cows reared in Kazakhstan. *Veterinarski arhiv*, 92(1), 27-35.
- VanRaden, P. M., Miller, R. H. (2006). Effects of nonadditive genetic interactions, inbreeding, and recessive defects on embryo and fetal loss by seventy days. *Journal of dairy science*, 89(7), 2716-2721.
- VanRaden, P. M., Olson, K. M., Null, D. J., Hutchison, J. L. (2011a). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of dairy science*, 94(12), 6153-6161.
- VanRaden, P. M., Null, D. J., Olson, K. M., Hutchison, J. L. (2011b). Reporting of haplotypes with recessive effects on fertility. *Interbull Bulletin*, (44).
- Yang, Y., Si, J., Lv, X., Dai, D., Liu, L., Tang, S., Zhang, Y. (2022). Integrated analysis of whole genome and transcriptome sequencing reveals a frameshift mutation associated with recessive embryonic lethality in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 53(1), 137-141.
- Yaylak, E., Akbaş, Y., Özsoy, A. N. (2015). Siyah Alaca ile Bazı Süt Sığır Irkları Arasında Yapılan Melezlemeler ve Melez İneklerin Performansları. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(1), 97-106.
- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Mak, T. W. (1998). Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, 94(6), 739-750.
- Zeuner, F. E. (1963). A history of domesticated animals.
- Zinovieva, N. A. (2016). Haplotypes affecting fertility in Holstein cattle. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya= Agricultural Biology*, 51(4), 423-435.
- Woods, C. G., Valente, E. M., Bond, J., & Roberts, E. (2004). A new method for autozygosity mapping using single nucleotide polymorphisms (SNPs) and EXCLUDEAR DOI: 10.1136/jmg.2003.016873