

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA MASTİTİS, ŞAP
VE TÜBERKÜLOZ HASTALIKLARINA DİRENÇLE İLİŞKİLİ GENLERDEKİ
POLİMORFİZMLERİN BELİRLENMESİ**

Ferit KARAYEL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOOOTEKNİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞUSTOS 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA MASTİTİS, ŞAP
VE TÜBERKÜLOZ HASTALIKLARINA DİRENÇLE İLİŞKİLİ GENLERDEKİ
POLİMORFİZMLERİN BELİRLENMESİ**

Ferit KARAYEL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZOOTEKNİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AĞUSTOS 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA MASTİTİS, ŞAP
VE TÜBERKÜLOZ HASTALIKLARINA DİRENÇLE İLİŞKİLİ GENLERDEKİ
POLİMORFİZMLERİN BELİRLENMESİ**

Ferit KARAYEL
ZOOTEKNİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2017-2355 nolu proje ile desteklenmiştir.**

AĞUSTOS 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA MASTİTİS, ŞAP
VE TÜBERKÜLOZ HASTALIKLARINA DİRENÇLE İLİŞKİLİ GENLERDEKİ
POLİMORFİZMLERİN BELİRLENMESİ**

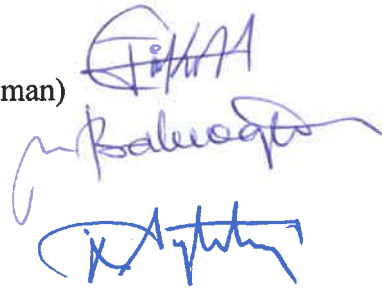
Ferit KARAYEL
ZOOTEKNİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 09/08/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Taki KARSLI (Danışman)

Prof. Dr. M. Soner BALCIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim AYTEKİN



ÖZET

TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI SIĞIR IRKLARINDA MASTİTİS, ŞAP VE TÜBERKÜLOZ HASTALIKLARINA DİRENÇLE İLİŞKİLİ GENLERDEKİ POLİMORFİZMLERİN BELİRLENMESİ

Ferit KARAYEL

Yüksek Lisans Tezi, Zootečni Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Taki KARSLI

Ağustos 2018; 45 sayfa

Mastitis, şap ve tüberküloz sığır yetiştiriciliğinde sık rastlanan ve büyük ekonomik kayıplara yol açan hastalıklardır. Bu çalışmada Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan dört sığır ırkında genotipik yapı mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilen CD14, MBL, ITGB6, SLC11A1 ve TLR2 genleri temelinde araştırılmıştır. Bu bağlamda çalışmanın amacı 1-) Holstein (SA) sığır ırkı ile Türkiye yerli sığır ırkları olan Bozırk (B), Yerli Kara (YK) ve Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) sığırlarında CD14, MBL, ITGB6, SLC11A1 ve TLR2 genleri üzerindeki bazı polimorfizmlerin araştırılması; 2-) Eğer varsa SA, B, YK ve DAK sığır ırklarında mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili genotiplerin belirlenmesi ve bu genlerin MAS çalışmalarında kullanım olanaklarının tartışılması; 3-) Hastalıklara dirençle ilişkili lokuslar temelinde filogenetik ilişkinin incelenerek, bu lokusların filogenetik analizler için uygun olup olmadığının belirlenmesidir. Yapılan çalışmada CD14 ve MBL1 (Ekzon 2; 2534 G>A ve 2651 G>A), SLC11A1 (5411G>A ve 7400G>A) ve TLR2 genleri üzerindeki polimorfizmler PCR-RFLP, ITGB6 reseptör (5’UTR bölgesi 29 G>A; 2145 T>C) genindeki polimorfizmler ARMS-PCR ve SLC11A1 genindeki tekrarlı bölgedeki varyasyon mikrosatellit yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, Türkiye’de yetiştirilen SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında CD14, MBL1 (ekzon 2; 2534 G>A ve 2651 G>A) genlerinin mastitis için, ITGB6 reseptör (5’UTR bölgesi, 29G>A) geninin şap için, SLC11A1 ve TLR2 genlerinin tüberküloz için yapılacak MAS çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir. ITGB6 reseptör (2145T>C) geni, SLC11A1 (7400G>A) geni ve SLC11A1 geni üzerindeki mikrosatellit lokusun ise çalışılan sığır ırklarında MAS çalışmaları için uygun olmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca çalışmada incelenen lokuslar üzerinden oluşturulan filogenetik ağaçta ırklar genetik kökenlerine uygun olarak kümelenmiş ve bu lokusların ırk ayırımında kullanılabileceği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELE: Sığır, Mastitis, Şap, Tüberküloz, Aday gen, Polimorfizm

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Taki KARSLI

Prof. Dr. M. Soner BALCIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim AYTEKİN

ABSTRACT

DETERMINATION OF POLYMORPHISM IN GENES ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO MASTITIS, TUBERCULOSIS AND FOOT-AND-MOUTH DISEASES IN SOME CATTLE BREEDS REARED IN TURKEY

Ferit KARAYEL

M.Sc. Thesis in Animal Science

Supervisor: Asst. Prof.Dr. Taki KARSLI

August 2018; 45 pages

Mastitis, foot-and-mouth disease and tuberculosis are diseases commonly encountered in cattle breeding that lead to gross economic losses. In this study, the genotypic structure of the four cattle breeds raised in Turkey were analyzed on the basis of CD14, MBL, ITGB6, SLC11A1 and TLR2 genes which were previously reported to have been related with resistance to mastitis, foot-and-mouth disease and tuberculosis. In this regard, the study was aimed at 1-) investigating some polymorphisms on the CD14, MBL, ITGB6, SLC11A1 and TLR2 genes in Holstein (SA) cattle breed and the domestic cattle breeds in Turkey, namely Turkish Grey Steppe (TGS), Anatolian Black (AB) and East Anatolian Red (EAR); 2-) identifying the genotypes, if any, related with resistance to mastitis, foot-and-mouth and tuberculosis diseases in the cattle breeds of SA, TGS, AB, and EAR and discussing the possibilities to use these genes in the MAS studies; 3-) identifying the phylogenetic relation based on the loci related with resistance to diseases and determining whether these loci are suitable for phylogenetic analyses. In the study, the polymorphisms on CD14 and MBL1 (Exon 2; 2534 G>A and 2651 G>A), SLC11A1 (5411G>A and 7400G>A) and TLR2 genes were identified by PCR-RFLP, the polymorphisms on ITGB6 receptor (5'UTR region 29 G>A; 2145 T>C) gene by ARMS-PCR and the variation in the repetitive region of the SLC11A1 gene by microsatellite marker method.

The results of the study indicate that in the cattle breeds of SA, AB, TGS, EAR produced in Turkey, the CD14, MBL1 (exon 2; 2534 G>A and 2651 G>A) genes may be used for the MAS studies for mastitis, ITGB6 receptor gene (5'UTR region, 29G>A) for foot-and-mouth disease, SLC11A1 (5411 G>A) and TLR2 genes for tuberculosis. On the other hand, it was concluded that the microsatellite locus on ITGB6 receptor (2145T>C) gene, SLC11A1 (7400G>A) gene and SLC11A gene are not suitable for the MAS work related to the said cattle breeds. Also the breeds were grouped according to their genetic origins in the phylogenetic tree that was drawn on the basis of the loci analysed in the study and it has been seen that these loci may be used for breed separation.

KEYWORDS: Cattle, Mastitis, Foot-and-mouth disease and Tuberculosis, Candidate gene, Polymorphism

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Taki KARSLI
Prof. Dr. M. Soner BALCIOĞLU
Asst. Prof. Dr. İbrahim AYTEKİN

ÖNSÖZ

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde ekonomik üretim yapmanın ilk koşulu damızlık değeri yüksek, sağlıklı hayvanlarla çalışılmasıdır. Çiftlik hayvanlarında hastalıklar, ölüm oranlarının artması, ekonomik önemi olan özelliklerde verim seviyesinin ya da kalitesinin düşmesi, aşılama ve tedavi maliyetleri gibi nedenlerle büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle yetiştiriciler damızlık değeri yüksek, sağlıklı hayvanlar ile çalışmak zorundadır. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de sığır yetiştiriciliği hayvansal üretimin önemli kollarından biridir. Türkiye’de süt ve kırmızı et üretiminin çok büyük kısmı (yaklaşık %90) sığırdan karşılanmaktadır. Sığır yetiştiriciliğinde hastalıklarla mücadele için çevresel faktörlerin iyileştirilmesi, aşılama ve ilaç kullanımının yanı sıra hastalıklara genetik olarak daha dirençli hayvanların seçilmesi ve popülasyondaki sayılarının artırılması önemlidir. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan sığır ırklarında sıklıkla görülen mastitis, şap ve tüberküloz gibi hastalıklara direnç lokuslarının belirlenmesi ve bu lokusların klasik ıslah çalışmalarına ek olarak yapılacak MAS çalışmalarında kullanımı hastalıklar ile mücadelede önemli katkılar sağlayabilir. Ancak Türkiye’de sığırlarda hastalıklara dirençle ilgili MAS çalışmalarında kullanılabilecek aday genler konusunda yeterli çalışma yoktur.

Bu amaçla yürütülen yüksek lisans tez çalışmasında, Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan Siyah Alaca, Yerli Kara, Bozırk ve Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırklarında daha önce değişik çalışmalarda mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili olduğu bildirilen aday genlerin araştırılması ve MAS çalışmalarında kullanım olanaklarının tartışılması hedeflenmiştir.

Öncelikle bana bu konu hakkında çalışma fırsatı veren ve tezin her aşamasında desteklerini sunan tez danışman hocam, Sayın Dr. Öğr. Ü. Taki KARSLI’ya, laboratuvar imkanlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU’na ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Bülent UZUN’a, ayrıca laboratuvar çalışmaları sırasında desteklerini esirgemeyen Zootekni Bölümü yüksek lisans öğrencileri Sayın Eymen DEMİR, Sayın Hüseyin Göktuğ FİDAN ve Sayın Mehmet ASLAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Teze FYL-2017-2355 proje numarası ile maddi kaynak sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Sığırın Zoolojik Sistemdeki Yeri.....	4
2.2. Araştırma Kapsamında Kullanılan Sığır Irkları	4
2.2.1. Holstein (Siyah Alaca-SA).....	4
2.2.2. Yerli Kara (YK)	5
2.2.3. Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK).....	5
2.2.4. Bozırk (B)	6
2.3. Direnç/Duyarlılık Genleri Araştırılan Hastalıklar	7
2.3.1. Mastitis.....	7
2.3.2. Şap.....	7
2.3.3. Tüberküloz	8
2.4. Araştırmada Kullanılan Moleküler Marker Yöntemleri.....	8
2.4.1. PCR-RFLP yöntemi	8
2.4.2. ARMS-PCR yöntemi	9
2.4.3. Mikrosatellit DNA marker yöntemi	10
2.5. Kaynak Taramaları	11
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler.....	17
3.2. Metot	17
3.2.1. Kan örneklerinin alınması	17
3.2.2. Genomik DNA izolasyonu	17
3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması	19

3.2.4. PCR-RFLP, ARMS-PCR ve mikrosatellit analizleri	19
3.2.5. PCR-RFLP analizleri	21
3.2.6. ARMS-PCR analizleri.....	23
3.2.7. Mikrosatellit analizleri	23
3.2.8. İstatistik analizler	24
4. BULGULAR	25
4.1. DNA İzolasyonu.....	25
4.2. Mastitis Hastalığına Direnç İçin Çalışılan Lokuslar	25
4.3. Şap Hastalığına Direnç İçin Çalışılan Lokuslar	29
4.4. Tüberküloz Hastalığına Direnç İçin Çalışılan Lokuslar	30
4.5. Hastalıklara Dirençle İlişkili Lokuslar Üzerinden Filogenetik İlişki	35
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇLAR	39
7. KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Sığır Irklarında Mastitis , Şap ve Tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili genlerdeki polimorfizmlerin belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

03/09/2018

Ferit KARAYEL



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç	: Baz çifti
°C	: Santrigrat derece
dk	: Dakika
kb	: Kilobaz
M	: Molar
Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
rpm	: Devir/dakika
sn	: Saniye
T _m	: Erime sıcaklığı
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

Kısaltmalar

AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
B	: Bozırk
dNTP	: Deoksinükleotid Trifosfat
DAK	: Doğu Anadolu Kırmızıısı

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetat
F	: Forward (İleri) Primer
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
MAS	: Marker Destekli Seleksiyon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	: Kantitatif Özellik Lokusu
R	: Reverse (Geri) Primer
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SA	: Siyah Alaca
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
UV	: Ultra Viole
TAE	: Tris Asetat EDTA
TE	: Tris EDTA
vd	: ve diğerleri
YK	: Yerli Kara

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Yerli Kara sığır ırkı.....	5
Şekil 2. 2. Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırkı.....	6
Şekil 2. 3. Bozırk sığır ırkı.....	6
Şekil 2. 4. PCR-RFLP Yöntemi.....	9
Şekil 2. 5. ARMS-PCR yöntemi.....	10
Şekil 2. 6. Mikrosatellit DNA marker yöntemi	11
Şekil 4. 1. DNA izolasyonuna ait agaroz jel görüntüsü.....	25
Şekil 4. 2. Şekil 4.2. CD14 geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü.....	25
Şekil 4. 3. CD14 geni PCR ürünlerinin <i>Hinf</i> I restriksiyon enzimi ile kesilmesi	26
Şekil 4. 4. Şekil 4.4. MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü	27
Şekil 4. 5. MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için PCR ürünlerinin <i>Mae</i> II restriksiyon enzimi ile kesilmesi.....	27
Şekil 4. 6. MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü.....	28
Şekil 4. 7. MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için PCR ürünlerinin <i>Sty</i> I restriksiyon enzimi ile kesilmesi.....	28
Şekil 4. 8. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi 29G>A) geni için ARMS-PCR görüntüsü 29	
Şekil 4. 9. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi (2145T>C) geni için ARMS-PCR görüntüsü.....	30
Şekil 4. 10. SLC11A1 (5411G>A) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 4. 11. SLC11A1 (5411G>A) geni için PCR ürünlerinin <i>Mae</i> II restriksiyon enzimi ile kesilmesi.....	31
Şekil 4. 12. SLC11A1 (7400C>G) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü.....	32
Şekil 4. 13. SLC11A1 (7400C>G) geni için PCR ürünlerinin <i>Pst</i> I restriksiyon enzimi ile kesilmesi.....	32
Şekil 4. 14. TLR2 geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü	33
Şekil 4. 15. TLR2 geni için PCR ürünlerinin <i>Eco</i> RV restriksiyon enzimi ile kesilmesi.....	33
Şekil 4. 16. Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan dört farklı sığır ırkında hastalıklara direnç lokusları üzerinden oluşturulan UPGMA dendogramı	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Sığırın zoolojik sistemdeki yeri	4
Çizelge 3.1. DNA izolasyonu için kullanılan tampon çözeltilerin molaritesi/miktarı ve içerikleri.....	19
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan yöntemler ve PCR işlemi için primer sekansları	20
Çizelge 3. 3. PCR bileşenleri ve programı.....	21
Çizelge 3. 4. RFLP işleminde kullanılan RE ve kesim koşulları.....	22
Çizelge 3. 5. PCR ve RFLP işlemleri sonunda olası bant büyüklükleri	22
Çizelge 3. 6. ARMS-PCR için PCR bileşenleri ve programı	23
Çizelge 4. 1. CD14 geni için gen ve genotip frekansları.....	26
Çizelge 4. 2. MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için gen ve genotip frekansları	27
Çizelge 4. 3. MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için gen ve genotip frekansları	28
Çizelge 4. 4. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi, 29G>A) geni için gen ve genotip frekansları.....	29
Çizelge 4. 5. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi, 2145T>C) geni için gen ve genotip frekansları.....	30
Çizelge 4. 6. SLC11A1 (5411G>A) geni için gen ve genotip frekansları.....	32
Çizelge 4. 7. SLC11A1 (7400G>A) geni için gen ve genotip frekansları.....	33
Çizelge 4. 8. TLR2 geni için gen ve genotip frekansları	34
Çizelge 4. 9. SLC11A1 geni üzerinde mikrosatellit marker analizi sonucu elde edilen allel frekansları	34
Çizelge 4.10. Dokuz lokusta elde edilen genetik mesafe ve genetik benzerlik değerleri.....	35

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde neredeyse tüm iklim kuşaklarında yaşayabilen sığır, insanların doğrudan yararlanmadığı bitkisel ürünleri ve bazı sanayi artıklarını insanların tüketebileceği kaliteli hayvansal proteine dönüştüren en önemli hayvan türüdür (Kumlu 1999; Akman vd. 2005). FAO'nun 2016 yılı verilerine göre sığır, dünya süt üretiminin büyük bir kısmını (% 83), kırmızı et üretiminin de yaklaşık % 32'sini tek başına sağlamaktadır (Anonim 1). TUIK'in 2017 yılı verilerine göre Türkiye' de ise süt üretiminin yaklaşık % 91'i, kırmızı et üretiminin % 88'i sığırdan karşılanmaktadır (Anonim 2). Ayrıca sığır yetiştiriciliğinde işgücü gereksinimi oldukça fazla olduğundan özellikle gelişmekte olan ülkeler için büyük istihdam kaynağıdır. Bu yapıyla sığır ve sığır ürünleri insanların sağlıklı beslenmesi ve ülke ekonomileri için büyük önem taşımaktadır. TUIK 2017 yılı verilerine göre Türkiye'de yaklaşık 16 milyon sığır bulunmaktadır. Sığır varlığımızın % 49'u kültür ırkı, % 41'i kültür ırkı melezi ve % 10'u da yerli ırklardan oluşmaktadır (Anonim 3).

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde ekonomik üretim yapmanın ilk koşulu damızlık değeri yüksek, sağlıklı hayvanlarla çalışılmasıdır. Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplar sağlık sorunlarından kaynaklanmaktadır. Bir hayvanda bir hastalığın gelişmesi bireyin genotipi ve çevrenin karşılıklı etkileşiminin sonucudur. Hastalık, çevresel faktörler ile bireyin genetik altyapısının karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Bu amaçla yetiştiriciler işletmelerinde bir yandan damızlık değeri yüksek sağlıklı hayvanlarla çalışırken bir yandan da çevre koşullarını iyileştirmek zorundadır. Hastalığı önlemek için çevresel faktörlerin iyileştirilmesi, aşılama ve ilaç kullanımının yanı sıra genetik olarak hastalıklara dirençli bireylerin belirlenip bu hayvanlarla çalışılması da önemlidir (Ekim 2010).

Çiftlik hayvanlarında genetik iyileştirme binlerce yıl önce çiftlik hayvanı türlerinin evcilleştirilmesi, değişik iklim ve üretim sistemlerine adaptasyonu ile başlamıştır. 1700'lü yılların sonunda başlayan ırkların geliştirilmesi, 20. yüzyılda hayvan ıslahı ve genetiği biliminin ortaya çıkması ile daha da artmıştır. (Rothchild ve Plastow 2014). Hayvan ıslahı ve genetiğinde ortaya çıkan gelişmeler, yetiştirici tercihlerine göre yüksek verimli ırkların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Geçtiğimiz 30 yılda ise moleküler biyoloji, moleküler genetik ve biyoteknoloji alanında yaşanan hızlı gelişim hayvan ıslahçıları için yeni fırsatlar sunmuştur.

DNA teknolojileri günümüzde birçok alanda olduğu gibi çiftlik hayvanları üretiminde de yoğun şekilde kullanılmaktadır. DNA'nın yapısının belirlenmesinden sonra Restriksiyon Enzimleri ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği keşfedilmiştir. PCR'ın keşfinden bu yana çok sayıda PCR temelli moleküler marker yöntemi geliştirilmiştir. Geçtiğimiz 20 yılda hayvansal üretim alanında en yaygın kullanılan DNA marker yöntemleri arasında PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), RT-PCR (Gerçek Zamanlı PCR), RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Çoğaltılmış Uzunluk Parça Polimorfizmi), DNA Sekans Analizi, Mikrosatellit DNA Analizi ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) gösterilebilir. Son yıllarda ise yeni nesil sekans analizleri ile SNP belirleme, belirlenen bu SNP'lerin çeşitli verimler ve hastalıklarla ilişkilendirilmesi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu ve benzer teknolojiler çiftlik hayvanlarında genetik kaynaklarının korunması programlarında, filogenetik analizlerde, ekonomik önemi olan özelliklerin (döl, et, süt verimi vb.)

seleksiyonla miktar ve kalitesinin artırılmasında, genetik hastalıkların ya da hastalıklara dirençli bireylerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Karlı vd. 2013).

Hayvansal üretimde sağlık koruma çalışmaları, son yıllarda süt endüstrisi ve tüketiciler için giderek artan bir önem kazanmaktadır. Hayvanlarda ölüm oranının artmasına, büyüme oranı ve döl veriminin azalmasına aynı zamanda et ve sütün miktar ve kalitesinin düşmesine yol açan enfeksiyon hastalıkları hayvan yetiştiriciliğinde sıkça karşılaşılan olumsuz bir durumdur. Bu hastalıkların üretim maliyetlerine olan olumsuz etkilerinin yanı sıra antibiyotik gibi ilaçların kullanımlarına sınırlama getiren gıda güvenliği ve hayvan refahı gibi yeni kavramların gelişmesi, sağlık korunma çalışmalarına yeni yaklaşımlar getirmiş ve bağışıklık sistemi, hastalıklara direnç/duyarlılık gibi özelliklerin kalıtımına yönelik çalışmalara ilginin artmasına yol açmıştır (Öner ve Elmacı 2011).

Herhangi bir konakçı tarafından hastalığa karşı verilen tepkinin genetik temelini bilmesi hastalığı kontrol etmede yeni yaklaşımlar sunabilir. Hastalığa karşı dirençli bireylerde ilgili genlerdeki polimorfizmler hızla gelişen moleküler araçlar kullanılarak kolaylıkla tespit edilebilir. Bu genlerdeki polimorfizmler ile hastalık özellikleri arasında yapılan ilişki analizleri sonucu istatistiki açıdan önemli çıkanlar Marker Destekli Seleksiyon (MAS) çalışmalarında aday gen olarak kullanılabilir. Direnç genini taşıyan bireylerin damızlık olarak seçilerek marker destekli seleksiyon programlarında kullanılması hastalıkların kontrol altına alınmasında önemli katkılar sunabilir.

Sığır yetiştiriciliğinde en sık karşılaşılan ve önemli ekonomik kayıplara yol açan hastalıklar arasında Mastitis, Şap (FMD-Foot-and-mouth disease), Brusella (brucellosis) ve Tüberküloz (Tuberculosis) gösterilebilir. Günümüzde bu hastalıklarla ilişkili olduğu belirlenen ve MAS çalışmalarında kullanılabilecek çok sayıda aday gen tanımlanmıştır. Bu genlere örnek olarak CD14 (Cluster of differentiation-14), MBL (Mannose-binding lectin), Toll Like Receptors (TLR1, TLR2, TLR4), Lactoferrin, Interleukin 8, ITGB6, Macrophage protein 1 ya da diğer ismi ile solute carrier 11a1 (Nramp1- SLC11A1) genleri gösterilebilir (Mucha vd. 2009; Wang vd. 2011; Singh vd. 2014; Kumar vd. 2014; Bukhari vd. 2015; Mundhe vd. 2016; Liu vd. 2017).

Bu bağlamda gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışmasında;

- 1-) Türkiye’de yetiştiriciliği en fazla yapılan Siyah Alaca (SA) sığır ırkı ile yerli gen kaynaklarımız olan Boz (B), Yerli Kara (YK) ve Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) sığır ırklarında daha önce mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili olduğu bildirilen bazı genlerdeki polimorfizmlerin araştırılması,
- 2-) Hayvan gen kaynaklarımızdan olan B, YK ve DAK sığır ırklarında genetik yapının CD14, MBL, ITGB6, SLC11A1 ve TLR2 genleri bakımından moleküler olarak tanımlanması,
- 3-) Eğer varsa SA, B, YK ve DAK sığır ırklarında mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili genotiplerin belirlenmesi ve bu genlerin MAS çalışmalarında kullanım olanaklarının tartışılması,

4-) Kötü çevre koşulları ve hastalıklara karşı daha dayanıklı olduğu bilinen yerli sığır ırklarımızda mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına direnç genlerindeki polimorfizmlerin, dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği en çok yapılan SA sığır ırkı ile ve mevcut literatür eşliğinde dünyanın çeşitli bölgelerinde yetiştirilen farklı sığır ırkları ile karşılaştırılması,

5-) Konu hakkında ülkemizdeki literatür eksikliğini giderilmesi,

6-) Hastalıklara dirençle ilişkili lokuslar temelinde çalışılan sığır populasyonları arasındaki filogenetik ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Sığırın Zoolojik Sistemdeki Yeri

Omurgalı, memeli, çift tırnaklı (toynaklı) ve geniş getiren bir hayvan olan sığıra en çok benzeyen hayvan türleri manda ve bizondur. Zoolojik sınıflandırmaya göre bu hayvanlar ile sığırın ayrılma seviyesi oldukça alt düzeylerde (cins düzeyinde). Manda ve bizondan sonra sığıra en yakın tür olan koyun ve keçi sığırdan aile düzeyinde ayrılır. At ve eşek gibi hayvan türlerinin ise sığıra yakınlığı takım düzeyindedir (Kumlu 1999). Sığırın zoolojik sistematikteki yeri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Sığırın zoolojik sistemdeki yeri

Kingdom (Alem)	Animalia	Hayvanlar
Phylum (Şube)	Chordata	Kordalılar (Sırtı İpliklier)
Subphylum (Alt şube)	Vertebrata	Omurgalılar
Classis (Sınıf)	Mammalia	Memeliler
Alt sınıf	Placentalia	Plesantalılar
Ordo (Takım)	Ungulata	Tırnaklılar
Subordo (Alt takım)	Artiodactylae	Çift tırnaklılar
Grup	Ruminantia	Geniş getirenler
Familia (Familiya)	Bovidae	Boş boynuzlular
Genus (Cins)	Bos	Sığırlar (Sığır, manda, bizon)
Subgenus (Alt cins)	Taurina	Gerçek sığırlar
Species (Tür)	Bos taurus	Evcil sığır

2.2. Araştırma Kapsamında Kullanılan Sığır Irkları

2.2.1. Holstein (Siyah Alaca-SA)

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en yaygın olarak yetiştirilen sığır ırkı olan Holstein renklerinden dolayı Siyah Alaca veya Kırmızı Alaca olarak da adlandırılmaktadır. Kuzey Deniz kıyılarından (Hollanda) köken alan Siyah Alaca ırkı Avrupa’da önceleri süt ve et 1960’lardan sonra ağırlıkla süt verimi yönünde ıslah edilmiştir. Ergin canlı ağırlıkları 700-800 kg’a çıkabilen Siyah Alaca ırkının laktasyon süt verimi 7-11 ton, sütündeki yağ oranı ve protein oranları yaklaşık olarak % 3.5, dolayına ulaşmıştır (Kumlu 1999).

Türkiye’ye 1970’li yıllardan sonra giren ve tüm bölgelerde başarı ile yetiştirilen Siyah Alaca ırkı sığırların en yaygın yetiştirildiği bölgeler Batı Anadolu ve Marmara bölgeleridir. Adaptasyon yetenekleri, et ve süt verimi yüksek olan Siyah Alaca ırkı yetiştiriciler tarafından tercih edilmekte ve melezlemelerde kullanılmaktadır.

Günümüzde canlı olarak getirilmese de yurt dışından dondurulmuş sperma ithali halen devam etmektedir (Kumlu 1999; Özhan vd. 2001). Siyah Alacalar dünyanın birçok ülkesinde olduğu gibi Türkiye’de de baskın ırk haline gelmiştir. TUIK 2017 yılı verilerine göre Türkiye’de yaklaşık 16 milyon sığır bulunmaktadır. Türkiye’de yetiştirilen sığır ırları arasında sayısal varlığı en çok olan ırk olan Siyah Alaca ırkıdır. Bu ırk ve melezleri Türkiye sığır varlığının % 80’ini oluşturmaktadır. (Anonim 3).

2.2.2. Yerli Kara (YK)

Türkiye’de yerli ırklar arasında yetiştiriciliği en fazla yapılan ve en büyük popülasyona sahip olan Yerli Kara sığır ırkıdır. Orta Anadolu başta olmak üzere geniş bir yayılma alanı vardır. Ergin canlı ağırlıkları dişilerde 200-300 kg arasında değişirken erkeklerde 300-400 kg olabilir. Laktasyon süt verimleri 500-600 kg, sütteki yağ oranı % 4-5 dolayındadır. Tamamen siyah renkteki Yerli Kara ırkı sığırlarda hem dişi hem de erkeklerde ince yapılı ve ay şeklinde boynuz vardır. Yetersiz bakım, besleme, sert kışlar, kuraklık, hastalık ve zararlılar gibi kötü çevre koşullarına oldukça dayanıklıdır. Yerli Kara sığır ırkı bu özellikleri nedeniyle Orta Anadolu’nun zayıf mera ve otlakları ile Akdeniz ya da Kuzey bölgelerdeki dağlık alanlarda bile rahatlıkla yetiştirilmektedir (Kumlu 1999; Özhan vd. 2001, Anonim 2018b).



Şekil 2. 1. Yerli Kara sığır ırkı (Anonim 4)

2.2.3. Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK)

Adından da anlaşılacağı üzere kırmızı ve kırmızının değişik tonlarında kıl örtüsüne sahip bu ırk, başta Erzurum, Kars ve Ardahan olmak üzere Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yoğun olarak yetiştirilmektedir. Küçük cüsseli olmakla birlikte oldukça güçlü olan bu sığır ırkı kötü çevre koşullarına son derece dayanıklıdır. Erkek ve dişiler boynuzlu olup boynuzlar öne kıvrımlı ve koyu renktedir. Erkeklerde canlı ağırlık 350-450 kg arasında iken dişilerde 250-350 kg aralığındadır. Laktasyon süt verimleri 1000 kg civarında olup, sütteki yağ oranı % 4-5 dolayındadır (Kumlu 1999; Özhan vd. 2001, Anonim 2018b).



Şekil 2. 2. Doğu Anadolu Kırmızısı sığır ırkı (Anonim 4)

2.2.4. Bozırk (B)

Trakya, Marmara ve Batı Anadolu’da yetiştirilen Bozırk sığırlar YK ve DAK sığır ırklarına nispeten daha iri yapıdırlar. Bozırk sığırlar dağlık bölgelerdeki orman içi ya da engebeli arazilerde insan müdahalesi olmadan yaşayabilmektedir. Açık renkli olmakla birlikte kıl rengi açık gümüşiden koyu kül rengine kadar değişir. Açık kahverengi doğan buzağların renkleri büyüdükçe açılmaktadır. İnekler boğalara göre daha açık renklidir. Ergin canlı ağırlık dişilerde 300-400 kg, erkeklerde 450-500 kg civarındadır. Laktasyon süt verimleri 1000-1200, sütteki yağ oranı % 4-5 civarındadır (Kumlu 1999; Özhan vd. 2001, Anonim 4).



Şekil 2. 3. Boz sığır ırkı (Anonim 4)

2.3. Direnç/Duyarlılık Genleri Araştırılan Hastalıklar

2.3.1. Mastitis

Süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açan ve en sık görülen hastalıkların başında gelen Mastitis basit olarak meme bezine patojenik mikroorganizmaların girmesi ve çoğalmasından kaynaklanan meme bezinin iltihaplanması olarak tanımlanabilir. Mastitisin ortaya çıkmasında *Stafilokoklar*, *Streptokoklar*, *Koliformlar* ve *Enterokoklar* gibi bakteriler neden olmakla birlikte, çevre (beslenme, mevsim, sağım koşulları) ve ineğe (ırk, genetik yapı, yaş vb.) ait etkenler hastalığın ortaya çıkışında ve seyrinde önemlidir. Mastitis hastalığının tipik belirtileri arasında memede kızarıklık ve şişme, halsizlik, ateş ve iştah kaybı vardır (Heringstad vd. 2000; Deb vd. 2013, Tanrıbuyurdu 2014). Bunların yanı sıra hastalık boyunca sütteki somatik hücre sayısının (makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler) arttığı gözlemlenir. Somatik hücre sayısı ile klinik Mastitisler arasında pozitif genetik korelasyon olduğu için genetik çalışmaların çoğunda somatik hücre sayısına yoğunlaşılmıştır. Somatik hücre sayısı memedeki bakteriyel durumu tahmin etmede kullanılır (Dolatabady 2014).

Herhangi bir işletmede klinik ve subklinik şeklinde görülen, akut ya da kronik seyirli olabilen mastitislerin genellikle %70'i subklinik mastitistir. Klinik mastitisler, gerek meme dokusunda gerekse sütte gözle görülebilen değişikliklerden anlaşılabilir. Klinik mastitislerde enfekte meme lobu sıcak, gergin ve serttir. Süt üretimi çoğunlukla durmuş ya da azalmıştır. Süt saman renginde sulu bazen de kanlıdır. Pıhtı veya pıhtı parçacıkları içerir. Subklinik mastitislerde genellikle gözle görülebilen belirtiler oluşmaz ve süt normal görünümündedir. Bu nedenle tespit edilmesi genel olarak zor olan subklinik mastitisler somatik hücre sayısından tespit edilebilmeye çalışılır. Subklinik mastitis, mastitisin en önemli formudur. Çünkü süt üretiminde ve kalitesinde düşüşe ve buna bağlı olarak da çok büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca klinik belirtiler göstermeden seyrettiği için yayılması daha kolaydır (Özhan vd. 2001; Savaşan ve Kaya 2004; Tanrıbuyurdu 2014; Darbaz ve Ergene 2015).

Mastitis hastalığı süt veriminin düşmesi, sütün kalitesindeki düşmeye bağlı olarak fiyatının düşmesi, sütün kalitesinin bozulmasıyla alınan prim miktarının düşmesi, tedavi giderleri, tedavi süresince sütün atılması, sağımda işgücünün artması, tedavi edilemeyen hayvanların kesime gönderilmesi ile sürü yenileme masraflarının artması gibi nedenlerle süt sığırcılığı işletmelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Tanrıbuyurdu 2014; Mundan vd. 2015). Mastitis nedeniyle ekonomik kaybın % 67'si süt verimindeki düşüşten yaşanmaktadır. Türkiye'de ineklerde mastitis görülme oranının % 30 civarında olduğu, ve mastitis nedeniyle süt verimindeki kaybın % 10 dolayında olduğu bildirilmiştir (Kul vd. 2006; Darbaz ve Ergene 2015).

2.3.2. Şap

Sığır yetiştiriciliğinde ekonomik açıdan önemli bir diğer hastalık olan Şap (Foot-and-mouth disease-FMD) çift tırnaklı hayvanlar için son derece bulaşıcı, viral bir hastalıktır. Hastalığa Picornaviridae familyasının bir üyesi olan ŞAP virüsü (Foot-and-Mouth Disease Virus – FMDV-) neden olur. Hastalığın belirtileri arasında yüksek ateş, ağız, meme ve interdigital bölgelerinde vezikül, bol miktarda salya, tükürük, süt

üretiminde ciddi miktarda azalma vardır. Hasta hayvanlarda süt miktarındaki azalma %30-40 dolayında iken, sütteki yağ oranı bir miktar artar. Genç hayvanlarda ise ani ölümler meydana gelebilir. FMD virüsünün O, A, C, (Güney Afrika) SAT1, SAT2, SAT3 ve Asya 1 olmak üzere yedi alt tipi vardır ve bunlar immünolojik olarak farklı hastalıklara neden olur. Tek iplikçikli pozitif sens RNA genomuna sahip FMD virüsü, kılıfsız, küçük bir virüstür (Özhan vd. 2001; İssi vd. 2010; Singh vd. 2014b; Parajapati vd. 2017).

Şap hastalığı özellikle kültür ırkı genç sığırlarda ani ölümlere neden olması, süt ve et verimindeki azalma, koruyucu ve tedavi amaçlı aşılama giderleri gibi nedenlerle çok ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Şap hastalığına bağlı ekonomik kayıpların tüm dünyada yıllık 6.5-21 milyar dolar arasında olduğu tahmin edilmektedir (İssi vd. 2010; Singh vd. 2014b).

2.3.3. Tüberküloz

Sığırlarda *Mycobacterium bovis*'in neden olduğu tüberküloz (BTB) hastalığı enfeksiyöz, kronik bir solunum hastalığıdır. Sığır yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan hastalık, hayvansal ürünler aracılığıyla insanlara da geçebileceği için dolaylı olarak toplum sağlığı içinde bir tehdittir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde sığır yetiştiricileri ve toplum sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Ekim 2010; Allen vd. 2010; Kadarmideen vd. 2011)

Tüberküloz etkeni olan *M. Bovis* aside dirençli, aerobik, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteridir. Sığırlarda çoğunlukla solunum yoluyla, daha nadir olarak hasta hayvanların sütüyle beslenen buzağılara bulaşırken, insanlara kontamine et ya da süt ürünlerin tüketilmesiyle geçer. Genellikle bakteri akciğere girdiğinde çoğalmaya başlar ve akciğerin yanındaki lenf nodüllerine yayılır. Hastalığın subklinik seyir izlediği için belirlenmesi zordur. Barınaklarda hayvanlara düşen birim alanın artırılması, hijyen koşullarına dikkat edilmesi, kapalı barınakların sürekli havalandırılması, dışarıdan sürüye kontrolsüz hayvan girişinin engellenmesi hastalığın yayılmasını engelleyebilir (Özhan vd. 2001; Özbey vd. 2008).

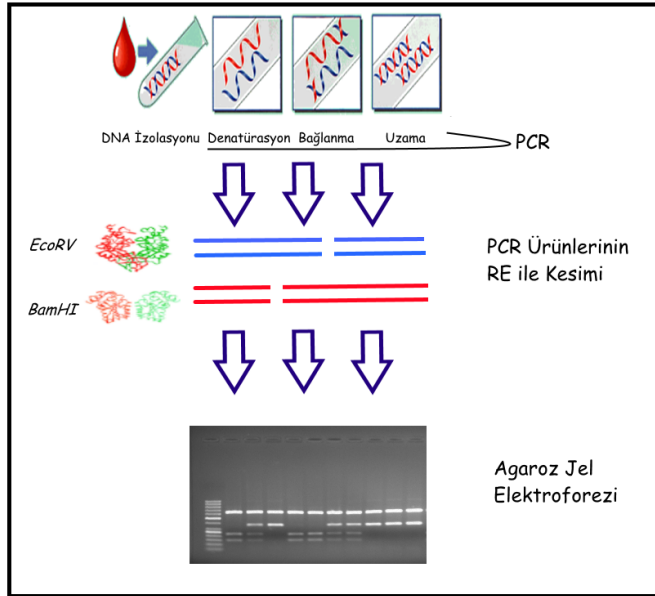
2.4. Araştırmada Kullanılan Moleküler Marker Yöntemleri

Yürütülen çalışma kapsamında, sığırlarda görülen üç farklı hastalığa karşı direnç ile ilişkili farklı genler polimorfizmler (SNP) ile genom üzerinde bulunan bazı tekrarlı bölgelerdeki (mikrosatellit) varyasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Tek nükleotid değişimi sonucu oluşan değişimlerin belirlenmesinde günümüzde en fazla kullanılan yöntem PCR-RFLP yöntemidir. Ancak çeşitli sebeplerle bu yöntemin uygulanamaması durumunda ARMS-PCR ya da AS-PCR gibi yöntemler uygulanabilir. Genom üzerindeki tekrarlı bölgelerin belirlenmesi ise Mikrosatellit DNA marker yöntemi ile yapılmaktadır.

2.4.1. PCR-RFLP yöntemi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu temelinde yapılan Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi [Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)] yöntemi günümüzde varlığı daha önceden sekans analizleri ile tespit edilmiş SNP'lerin

belirlenmesinde en yaygın kullanılan DNA marker yöntemidir. İki aşamadan oluşan yöntemin iki aşamasında nokta mutasyonu sonucu oluşan SNP'ni içeren bölge PCR işlemi ile çoğaltılır. İkinci aşamada mutasyonu da içeren çoğaltılmış PCR ürünleri mutasyonu tanıyan restriksiyon enzimi (RE) ile belli bir süre kesime bırakılır. Kesim işleminden sonra agaroz jel elektroforezinde kesim sonuçlarının bant profillerine bakarak örneklerin mutasyonu taşıyıp taşımadığına karar verilir. PCR-RFLP yönteminin uygulanması genel olarak kolay ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Kullanılan RE'nin yöntemin maliyetini ve işgücü gereksinimini artırmaktadır (Karşı vd. 2008; Karşı 2010; Karşı vd. 2013)

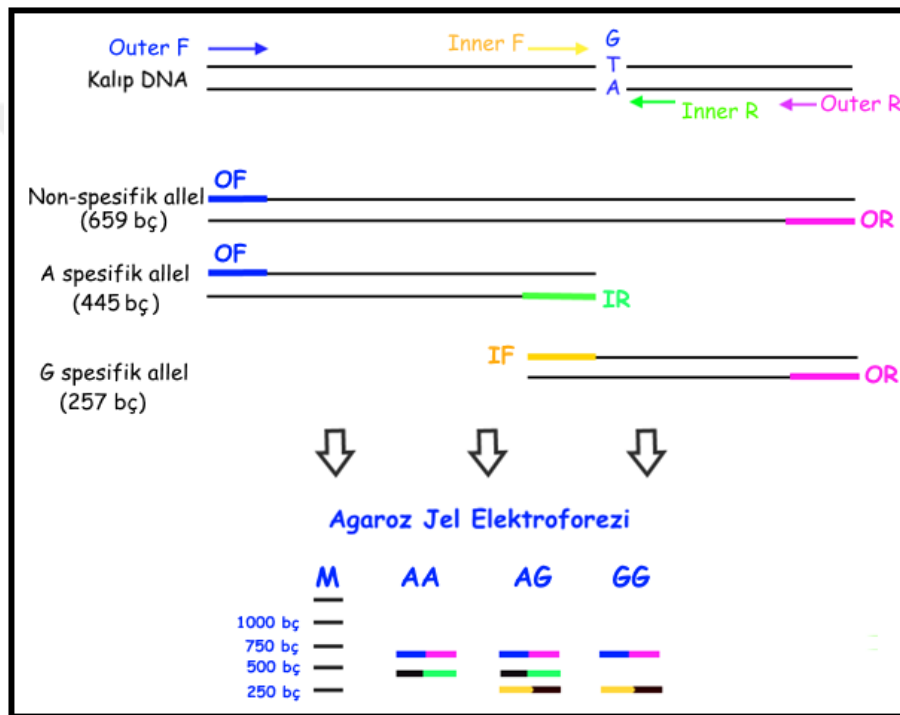


Şekil 2. 4. PCR-RFLP Yöntemi

2.4.2. ARMS-PCR yöntemi

Tetra-primer amplification refractory mutation system–polymerase chain reaction (ARMS–PCR) yöntemi tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesi için basit, ekonomik ve etkili bir metottur. Yöntemde dört farklı primer aynı anda kullanılarak yapılan PCR işlemi jel elektroforezi takip eder. Klasik PCR işleminden tek farkı iki yerine dört primer kullanılmasıdır. Ko-dominant marker yöntemi olan ARMS-PCR işleminde heterozigot veya homozigot, mutant ve normal (yabani tip) aleller tespit edilebilir. İki iç ile iki dış primerin kullanıldığı yöntemde dış primerler ile SNP'in de bulunduğu tüm bölge çoğaltılır. Her iç primer ve bir adet dış primer ile mutant ve normal aleller çoğaltılır. Tüm bu işlemler aynı PCR tüpü içerisinde tek seferde gerçekleştirilir. Sıklıkla karıştırılmasına karşın ARMS-PCR işleminin Allel Spesifik PCR (AS-PCR) işleminden farkı budur. AS-PCR işleminde de hem mutant aleli hem de normal aleli tanıyan primerler kullanılmakta ancak bu primerler aynı revers primer ile ayrı ayrı çoğaltılmaktadır. Yani aynı revers primer ile ayrı tüplerde mutant primer ve normal primer kullanılarak PCR işlemi yapılmaktadır. Kısaca AS-PCR işleminde iki primer ile iki PCR işlemi uygulanmaktadır (Ghanem vd. 2008; Medrano ve Oliveira 2014; Gen ve Ahmed 2018).

ARMS-PCR tekniğinde nokta mutasyonlarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olan PCR-RFLP tekniğinde olduğu gibi enzim gereksinimi dolayısıyla restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi için gereken süreye ihtiyaç yoktur. Bu nedenle PCR-RFLP tekniğine göre oldukça ekonomik ve hızlıdır. AS-PCR işlemine göre ise maliyetler hemen hemen eşit olmakla beraber iş gücü ve zaman gereksinimi ARMS-PCR işleminde daha azdır. Çünkü AS-PCR işleminde sonucu görmek için iki PCR işlemi yapmak gerekirken ARMS-PCR işleminde tek PCR işlemi yeterlidir. Bu üstünlükleri yanı sıra ARMS-PCR işleminde optimizasyon daha zor ve zaman alıcıdır. ARMS PCR işleminde özellikle bağlanma sıcaklıkları ile $MgCl_2$ yoğunluğuna dikkat edilmelidir. Özgün olmayan PCR ürünlerinin engellenmesi için bağlanma sıcaklıkları mümkün olduğunca yükseltilmeli ve ilk 10-15 döngüde kademeli olarak düşürülmelidir (Medrano ve Oliveira 2014; Gen ve Ahmed 2018).



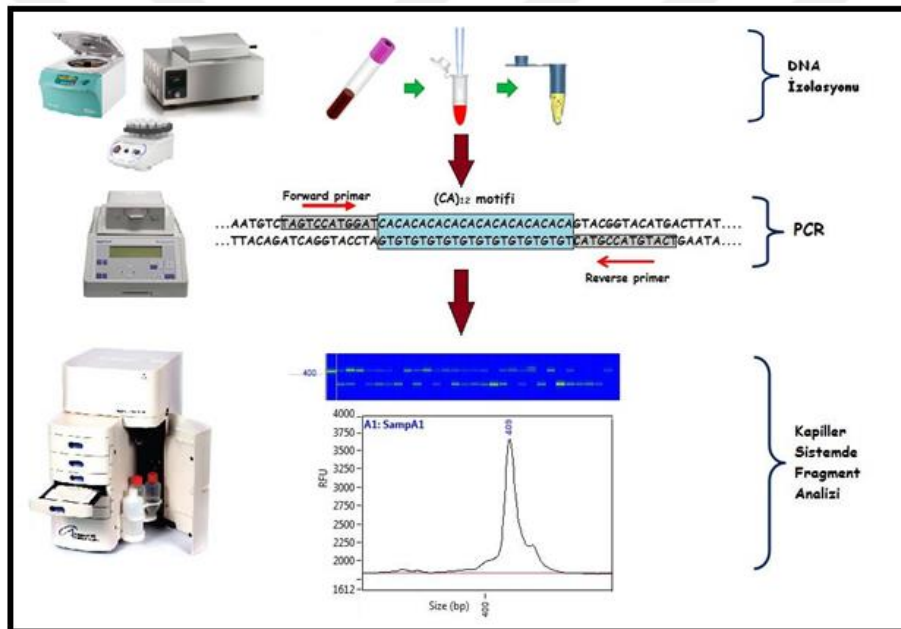
Şekil 2. 5. ARMS-PCR yöntemi

2.4.3. Mikrosatellit DNA marker yöntemi

Mikrosatellitler ökaryotik genomun yaklaşık olarak %3'ünü oluşturan, intron ya da ekzon bölgelerde bulunabilen tekrarlı DNA dizileridir. Genellikle mono (tekli), di (ikili), tri (üçlü), tetra (dörtlü), penta (beşli) ya da hekza (altılı) şekilde değişken sayıda (5-100 arası) tekrar eden DNA parçalarıdır. *Kısa Ardışık Tekrarlar* (Short Tandem Repeats, STR) ya da *Basit Dizi Tekrarları* (Simple Sequence Repeats, SSR) olarak da adlandırılan mikrosatellitler yüksek derecede polimorfik bölgelerdir. Tekrarlı bölgelerde polimorfizmin yüksek olmasının nedeni bu bölgelerdeki mutasyon oranının genomun diğer bölgelerine göre fazla (10^{-3} ile 10^{-4} arasında) olmasıdır. Mikrosatellit marker yöntemi tekrar dizilerinin bulunduğu bölgenin PCR ile çoğaltılmasını ve daha sonra çoğaltılan bölgenin büyüklüklerinin belirlenmesi işlemidir. PCR büyüklüklerinin belirlenmesinde geçmiş yıllarda poliakrilamid jeller kullanılmışken, günümüzde ise

kapiller sistemler yoğun olarak kullanılmaktadır. Kapiller sistemlerin maliyeti poliakrilamid jele göre yüksektir. Ancak uygulamada sağladıkları kolaylıklar ve güvenilirliklerinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir (Arif vd. 2010; Klug vd. 2011; Karşı vd. 2013; Karşı 2015).

Mikrosatellit marker yöntemi geçtiğimiz on yılda çiftlik hayvanlarında genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmaları için genetik varyasyonun belirlenmesinde (Zanetti vd 2010), ırklar ya da akrabalı yetiştirilmiş hatlar arasındaki filogenetik ilişkinin tespitinde (Tadano vd 2012, Ceccobelli vd 2015), MAS çalışmaları için ekonomik önemi olan çeşitli verimler ve bazı hastalıklara direnç lokusların belirlenmesinde (Minvielle vd 2005, Hako Touko vd 2013) ile ebeveyn tespitinde (Özsensoy vd 2014) yoğun olarak kullanılmaktadır. Mikrosatellitlerin tüm genom boyunca bol miktarda dağılmış olmaları ekonomik önemi olan çeşitli verimlerle yada bazı hastalıklara dirençle bağlantılı kantitatif karakter lokuslarının (QTL) belirlenmesinde ve belirlenen bu lokusların aday gen yaklaşımı ile marker destekli seleksiyonda (MAS) kullanılmasına olanak sağlar (Karslı 2015).



Şekil 2. 6. Mikrosatellit DNA marker yöntemi(Karslı 2015)

2.5. Kaynak Taramaları

Sığırlarda çeşitli hastalıklara direnç ya da duyarlılıkla (yatkinlık) ilişkili olduğu tespit edilen ve değişik moleküler yöntemler ile belirlenebilen çok sayıda aday gen vardır. Bu çalışma kapsamında mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilen ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Genetik Laboratuvarı alt yapısının olanak verdiği CD14, MBL, ITGB6, SLC11A1 ve TLR2 gen bölgelerindeki SNP'ler araştırılmıştır.

Sığırlarda mastitis hastalığı için yapılan QTL çalışmalarında, değişik DNA bölgelerindeki varyasyonları ile mastitis direnci ya da duyarlılığıyla ilişkili 15 civarında aday gen tespit edilmiştir. Bu genler arasında CD14, BoLA-DRB3, CXCR2, sığır

laktoferrin geni, MBL geni, TLR4 geni, osteopontin gösterilebilir. Yapılan araştırmalar özellikle CD14, MBL, BoLA-DRB3, IL8RA, TLR4, ve LTF'nin mastitis ile oldukça yüksek derecede ilişkili olduğunu göstermiştir ve bunların sığırlarda mastitis çalışmaları için önemli aday genler olduğu belirtilmiştir. Ayrıca BoLA-DRB3 ve LTF nin mastitis yanı sıra bazı verim özellikleriyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir. BoLA gen kompleksinin mastitis ile ilişkisi incelenirken, bu genin parazit enfeksiyonları, şap hastalığına direnç ve topallıkla ilgili olduğu da raporlanmıştır (Singh vd. 2014b).

CD14 (Cluster of Differentiation-14) geni mastitise dayanıklılık için mükemmel aday genlerden birisidir. Bu gen tarafından kodlanan protein doğal bağışıklık sisteminin bileşenidir ve bu protein nükleer faktörlerin (NF)-kB aktivasyonu boyunca hareket eder. Monositlerin hücre membranı üzerinde bol miktarda ve daha az miktarlarda nötrofiller üzerinde bulunur. İki formu vardır, birincisi membrana (zara) bağlı şekilde olan (mCD14) diğeri ise çözülebilir (soluble) (sCD14) formudur. CD14 reseptörlerinin, lipopolisakkarit (LPS), lipoteikoik asit (LTA), araşidonik asit ve vücudun savunma mekanizmasında önemli rol oynayan ve çeşitli serbest haldeki sitokinlere bağlandığı belirlenmiştir. Promotor, 2 ekzon ve 1 introndan oluşan 2630 bp büyüklüğündeki CD14 geni sığır 7. kromozomu (BTA 7) üzerinde haritalanmıştır (Pal vd. 2011, Kumar vd. 2014). CD14 mastitis, treponemiasis, treponemiasis gibi çeşitli hastalıklar üzerindeki rolü için önemli bir molekül olarak kabul edilmiştir (Pal vd. 2011).

Kumar vd. (2014) Hindistan'da yetiştirilen Sahiwal ırkı laktsyondaki 100 sağmal inekte CD14 geni üzerinde yaptıkları çalışmada 6 farklı polimorfik bölge üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar F: CTTCTGTTATAGCCCCTTTCC ve R: CACGATACGTTACGGAGACTGA primerleri ile çoğalttıkları 4 nolu bölgeyi (832 bp) *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesim işleminden sonra üç genotip oluştuğunu (CC, CD ve DD) ve CC genotipindeki hayvanların mastitise daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar Sahiwal ırkında CC, CD ve DD genotip frekanslarını sırasıyla 0.54, 0.23 ve 0.23 olarak bildirmişlerdir.

Selvan vd. (2014) Hindistan Karan Fries (KF) sığırlarında yaptıkları çalışmada CD14 geni üzerindeki 832 bp lik bölgeyi F: CTTCTGTTATAGCCCCTTTCC ve R: CACGATACGTTACGGAGACTGA primerleri ile çoğaltıp *HinfI* restriksiyon enzimi ile RFLP işlemini gerçekleştirmişlerdir. RFLP işlemi sonunda ortaya çıkan CC, CD ve DD genotiplerinin frekanslarını sırasıyla 0.53, 0.36 ve 0.11 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada CC genotipinde bireylerin % 22.27'sinin mastitis etkilenirken, CD ve DD genotipindeki ineklerin ise sırasıyla % 69,44 ve % 60,38'inin mastitisten etkilendiği saptamıştır. Yapılan ki-kare analizine göre Karan Fries (KF) sığırlarında her üç genotipde mastitis görülme oranının istatistiki olarak önemli ($p < 0.05$) olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar sığırlarda CD14 geni için CC genotipini taşıyan hayvanların CD ve DD genotipleri taşıyanlara göre mastitiden daha az etkilendiğini bildirmişlerdir. Mastitis hastalığına dirençte CD14 geni için C alleli D alleleline göre daha fazla istenmektedir.

Selvan vd. (2016) Hindistan Karan Fries (KF) sığırlarında yaptıkları çalışmada CD14 geni üzerinde yaptıkları çalışmada 6 farklı polimorfik bölgeden ikincisini F: ACACACCTGGAGAAGGCAA ve R: TCCAAGGGCTAGTTCCAGAG primerleri ile, dördüncüsünü ise F: CTTCTGTTATAGCCCCTTTCC ve R: CACGATACGTTACGGAGACTGA primerleri ile çoğaltmış ve sırasıyla *Hpy188I* ve

HinfI restriksiyon enzimleri ile kesmişlerdir. 4. bölgedeki RFLP işlemi sonucu oluşan genotiplerden CC genotipini taşıyan hayvanların mastitise daha dirençli olduğunu araştırmacılar daha öncede vurgulanırken 2. bölgedeki RFLP işlemi sonucu oluşan genotipler (AA, AB, BB) ile kombine edilerek incelendiği zaman mastitise en dirençli genotipin AACD olduğu bildirilmiştir. Ancak araştırmacılar çalışmada AACC genotipinin elde edilemediğini belirtmişlerdir.

Mannoz bağlayan lektin (Mannose binding lectin- MBL) doğuştan gelen immün sistemin en önemli bileşenlerinden birisidir. Memelilerin çoğunda MBL'nin, MBL-A ve MBL-C olmak üzere iki formu bulunur ve sırasıyla MBL1 ve MBL2 isimli iki farklı gen tarafından kodlanır. Sığırlarda MBL1 geni 28. (BTA28) kromozom üzerindedir (Yuan vd. 2013). Mastitis ile sütteki somatik hücre sayısı (SHS) ve somatik hücre skoru (SCS) arasındaki yüksek genetik korelasyondan dolayı, SHS süt sığırlarında mastitise dirençli hayvanların seçiminde kullanılır. Sığırlarda MBL1 genindeki polimorfizmler ile sütteki SHS arasında ilişki olduğu bu nedenle bu genin mastitis direncinde aday gen olabileceği bildirilmiştir (Wang vd. 2011; Liu vd. 2011; Yuan vd. 2013).

Wang vd. (2011) Çin yerli sığır ırkları olan Luxi Yellow (38 örnek), Bohai Black (27 örnek) sığırları ile Çin'de yetiştirilen Siyah Alaca (988 örnek) ırkına ait toplam 1053 bireyde yaptıkları çalışmada MBL1 geni üzerinde üç SNP (tek nükleotid polimorfizmi) belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu polimorfizmleri 1. intron üzerinde g.855G>A mutasyonu, 2. ekzon üzerinde g.2651G>A [GTT (Val) > ATT (Ile)] ve g.2686T>C [GCT (Ala) > GCC (Ala)] mutasyonları sonucu oluştuğunu tespit etmiştir. Yapılan istatistik analizler sonucu g.855G>A ya da g.2686T>C polimorfizmlerinin SHS (Somatik Hücre Sayısı) ile aralarında korelasyon olmadığı ancak g.2651G>A ve SHS arasında önemli ilişki bulunduğu ($P < 0.05$) ve bu SNP'in mastitise karşı konakçı direncinde olası rolü olduğu bildirilmiştir. Çalışmada MBL1 geni 2. ekzon üzerindeki 162 bç'lik bölge (2509 ile 2671 bç arası) F: GGTGGCAAATGTTGGCTA ve R: GTCTTCTGAGCATCCTCCA primerleri kullanılarak PCR işlemi ile çoğaltılmış ve PCR ürünleri RFLP işlemi için *StyI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Sonuç olarak oluşan üç genotipten (GG, GA ve AA) AA genotipini taşıyan hayvanların sütündeki somatik hücre sayısı, GG ve GA genotipini taşıyanlara göre önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlara göre GG ve GA genotipindeki hayvanların mastitis hastalığına daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca bu üç SNP'in bir arada düşünülmesi sonucunda oluşan genotiplerden GGC/AAC ile en düşük SHS, AAT/AAT ile en yüksek sütteki protein içeriği, AGC/AGC ile en yüksek 305 günlük süt verimi arasında ilişki olduğu raporlanmıştır. Bu nedenle GGC/AAC, AAT/AAT ve AGC/AGC genotiplerinin süt sığırı yetiştiriciliğinde süt verimi ve mastitis hastalığına dirençte aday gen olarak marker destekli seleksiyonda kullanılabileceği belirtilmiştir.

MBL1 geni üzerindeki bir diğer çalışmada Yuan vd. (2013) intron 1'de c.1252G>A, ekzon 2'de c.2534G>A ve c.2569T>C mutasyonları olmak üzere üç allelik varyant tespit etmişlerdir. c.2534G>A sinonim olmayan bir mutasyondur ve bu mutasyon sonucunda Valin (Val) ile İzolösin (Ile) yer değiştirmektedir. Bu üç mutasyon ile sütteki SCS arasında yapılan korelasyon analizleri sonucunda c.2534G>A mutasyonu ile sütteki SCS arasında önemli korelasyon tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Araştırmacılar MBL1 geni üzerinde 2. ekzonda bulunan c.2534G>A mutasyonunu içeren bölgeyi F: GTATCCTTCTCAAATACAAAAGAC ve R:

CCCCTGTCTCTATGCTAGAC primerleri ile PCR'da ile çoğaltılıp *MaeII* restriksiyon enzimi ile kestiği zaman fragment büyüklüklerine göre GG (194 ve 23) GA (217, 194 ve 23 bç) ve AA (217 bç) genotiplerinin oluştuğunu bildirmişlerdir. MBL1 geni (Ekzon 2; c.2534G>A) üzerinde yapılan PCR-RFLP işlemi sonucu belirlenen üç genotipten (GG, GA, AA) GG genotipli bireylerin sütündeki SCS GA ve AA genotipli bireylerden önemli derecede daha düşüktür ($p<0.05$). Araştırmacılar sonuç olarak GG genotipini taşıyan bireylerin mastitise karşı daha dirençli olduğunu ve MBL1 geninin (Ekzon 2; c.2534G>A) süt sığırları yetiştiriciliğinde MAS için aday gen olarak kullanılabileceğini raporlamışlardır.

Şap hastalığına karşı MAS programlarında en yoğun kullanılan genlerden birisi de integrin beta 6 reseptör genidir. İntegrinler hücreler ya da hücre-dışı matriks proteinleri arasında çeşitli etkileşimlere katılan heterodimerik (α ve β) transmembran yüzey glikoproteinleridir. ITGB6 (integrin beta 6) sığırlarda şap virüsünün konakçısı enfekte etmesine dahil olan önemli reseptör bileşenlerinden birisidir. Sığırlarda 2. kromozom üzerinde bulunan ITGB6 geni 16 ekzondan oluşur (Singh vd. 2014b)

Singh vd. (2014a) Hindistan'da yetiştirilen SA (204 baş) ve Sahiwal (51 baş), Kankrej (48 baş) ve Ongole (38 baş) sığırlarında Integrin Beta 6 reseptör (ITGB6-5'UTR bölgesi 29G>A) geni üzerinde 29. pozisyonundaki bir nokta mutasyonu ile mastitis hastalığı arasındaki ilişkisini araştırmışlardır. ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-PCR) yönteminin kullanıldığı araştırmada OF: 5'-CTTTCCCTAGCCTGCCTTCT-3', OR: 5'-GTTCAATCCCCATCCGTTT-3'; IF: 5'-ATCATGTTGGAGTTGCTCATG-3' ve IR: 5'-GGTAAAGAAGAAAAGCTGTGATT-3' primerleri ile uygulanan PCR işlemi sonucunda üç farklı genotip GG (659 ve 257 bç), GA (659, 445 ve 257 bç), AA (659 ve 445 bç) tespit edilmiştir. Çalışmada SA ırkında GG, GA ve AA genotip frekansları sırasıyla 0.320, 0.611 ve 0.069 olarak, Sahiwal ırkında 0.667, 0.333 ve 0.000 olarak tespit edilmiştir. Kankrej ve Ongole ırklarının ise monomorfik (AA) olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar elde edilen genotipler ile şap hastalığından etkilenen ve etkilenmeyen hayvanlar arasında yaptıkları Pearson ki-kare analizleri sonucu ($p<0.001$) AA genotipli sığırların şap hastalığına daha dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

Singh vd. (2015) sığırlarda şap hastalığına direncini araştırmak için yaptıkları çalışmada *Bos taurus* ve *Bos indicus*'ta ITGB6 receptor genini incelemişlerdir. Bu amaçla Zebu ITGB6 genini sekanslayıp, Zebu ve Taurin türleri arasındaki yapısal farklılıkları belirlemişlerdir. Araştırmacılar ITGB6 reseptör geninde elde edilen SNP'lerden 2145. pozisyonunda T>C [T2145C, TTT: Fenilalanin > TCT: Serin] mutasyonunun şap hastalığı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir ($p<0.01$). Ayrıca bu mutasyonu belirlemek amacıyla ARMS-PCR tekniği geliştirmişlerdir. Çalışmada TGCATAATAAACTCAATAC, OR: ATTCATCAGCCACCTTTTGTG, IF: CAGATTTCTCAAAGGATAGCTT ve IR: CTTGCAGAGAACAGGAAACAG primerleri kullanılarak üç genotipin TT (433 ve 347 bç), TC (433, 347 ve 128 bç), CC (433 ve 128 bç) belirlendiğini ve bunlardan TT genotipine sahip olan hayvanların şap hastalığına karşı daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.01$).

Sığırlarda önemli diğer bir hastalık olan sığır tüberkülozuna (Bovine Tuberculosis-BTB) *Mycobacterium bovis* bakterisi neden olur. Genellikle hayvansal ürünler aracılığıyla insanlara bulaşması ile ölüme kadar gidebilen büyük sağlık

sorunlarına yol açabilir. Bu hastalığın genetik temelini bilmesi ile aday genlerdeki polimorfizmlerin belirlenmesi ile dirençli ya da yatkın hayvanlar tespit edilerek marker destekli seleksiyonda kullanılabilir. SLC11A1 de SLC grubunun proton bağlı metal iyon taşıyıcı olarak adlandırılan 11. ailesinde yer almaktadır. Membran taşıyıcı proteinlerin solute taşıyıcı (SLC) grubu 47 aile şeklinde organize edilmiş 300'den fazla protein içermektedir. SLC11A1 geni Makrofaj Protein 1 (NRAMP1) geni olarak da bilinmektedir. SLC11A1 geninin sığır tüberkülozu ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Ekim 2010, Kadarmideen vd. 2011; Singh vd. 2014b; Liu vd. 2016).

Kadarmideen vd. (2011) sığırlarda SLC11A1 (solute carrier family 11) geninde bulunan tekrarlı bölgedeki polimorfizmlerin tüberküloz hastalığı ile ilişkisini araştırmışlardır. Toplam 211 sığır SLC11A1 aday geni içindeki mikrosatellitler için genotiplenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları ilişki analizleri BTB hastalığı ile SLC11A1 allelleri arasında istatistiki olarak önemli ilişki tespit ettiğini belirtmişlerdir ($p < 0.001$). 211, 215 ve 217 bç büyüklüğündeki mikrosatellit allelleri taşıyan hayvanların BTB hastalığına daha dirençli olduğu raporlanmıştır.

Liu vd. (2017) Çin'de yetiştirilen Siyah Alaca ırkı sığırlarda yaptıkları çalışmada SLC11A1 geni üzerindeki polimorfizmlerin tüberküloz (TB) hastalığı ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmada SLC11A1 geni sekans analizleri sonucunda yedi adet SNP belirlendiği bildirilmiştir. Yapılan regresyon analizleri sonucunda belirlenen bu yedi adet SNP'den üç tanesinin (SNP1, SNP3 ve SNP5) sığırlarda tüberküloza hastalığına karşı direnç ya da yatkınlık ile ilişkisi olduğu raporlamışlardır. Araştırmacılar TB hastalığına direnç ya da duyarlılık ile ilişkili olan bu lokuslardan iki tanesinin (SNP3 ve SNP5) PCR-RFLP tekniğiyle belirlenebileceğini bildirmişlerdir. SLCA11 geni 5411. pozisyonda G>A mutasyonu oluşan polimorfizm [SLC11A1-SNP3 (G5411A)] ile SLCA11 geni 7400. pozisyonda C>G [SLC11A1-SNP5 (C7400G)] mutasyonu ile oluşan polimorfizm PCR-RFLP tekniği ile belirlenmektedir. SLC11A1 (5411 G>A) geni polimorfizmini belirlemek için F: TGAGGATCAGTGAGGGAAAAGA ve R: AAAGTCTTGCATATTCCCAAC primerler ile yapılan PCR işleminde çoğaltılan 998 bç uzunluğundaki PCR ürünleri *MaeII* restriksiyon enzimi ile kesilmektedir. Bu işlem sonucu oluşan genotiplerden (GG, AG ve AA) GG genotipini (631, 226, 141bç) taşıyan hayvanlar tüberküloz hastalığına daha dirençli olmaktadır. Araştırmacılar SA ırkı sığırlarda SLC11A1 (G5411A) geni için GG, AG ve AA genotip frekanslarını sırasıyla hasta hayvanlarda 0.29, 0.46 ve 0.25, sağlıklı hayvanlarda ise 0.72, 0.28 ve 0.00 olarak bildirmişlerdir. SLC11A1 (7400 C>G) geni polimorfizmini belirlemek için F: TGTGCTTCACATCTCCTTCCTA ve R: AGCACATTGAGCAGGTTCGTT primerler ile yapılan PCR işleminin ardından *PstI* restriksiyon enzimi ile kesim işlemi yapılmaktadır. Kesim işlemi sonucu oluşan CG ve GG genotiplerini taşıyan bireylerin CC genotipini taşıyan bireylere göre daha dirençli olduğu raporlanmıştır.

Sığırlarda tüberküloz ile ilişkisi saptanan diğer bir gen ise TLR2 genidir. Toll-like reseptörleri (TLRs) birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteindir. Aynı zamanda adaptif immün cevabın da aktive olmasını sağlayarak konak immünitesinde çok önemli role sahiptirler (Turul ve Ersoy 2004). Toll-like reseptörleri (TLRs) tüberküloz yanı sıra şap ve mastitis hastalıkları ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir (Mucha vd. 2009, Singh vd. 2014b, Sadana vd. 2015). Toll-like reseptörleri (TLRs) 2 ve 4 doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklık sistemini desteklemektedir. TLR4, CD14 reseptörü ile birlikte gram negatif

bakterilere karşı lipoprotein A'nın varlığı algılar, TLR 2 ise gram pozitif bakterilere karşı peptidoglikan ile fagozomların içinde aktiftir (Singh vd. 2014b).

Sadana vd. (2015) bazı Hindistan yerli sığır ırkı olan Sahiwal ve melezlerinde (94 baş) SLCA11 geni üzerinde üç, CARD15 geni üzerinde iki, IFNG ve TLR2 genleri üzerinde birer SNP'in tüberküloza dirençle ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan genlerden sadece TLR2 geninde bulunan SNP'in tüberkülozla ilişkisi belirlenmiştir. Araştırmacılar TLR2 gen bölgesini F: TTAACCTCCATCCCCTCTGG ve R: TAAAGGGACCTGAACCAGG primerleri ile PCR'da çoğalttıktan sonra RFLP işlemi için PCR ürünlerini *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesime bırakmışlardır. RFLP işleminden sonra CC (245 bç), CA (245, 182, 63 bç) ve AA (182, 63 bç) olmak üzere üç genotip tespit etmişlerdir. Hasta ve kontrol gruplarında bu genotiplerin dağılımını yaptıktan sonra AA genotipi ile tüberküloza direnç arasında önemli derecedeki ilişki olduğunu raporlamışlardır ($p<0.05$). Araştırmacılar TLR2 geni için CC, CA ve AA genotip frekanslarını sırasıyla 0.615, 0.125 ve 0.260 olarak bildirmiştir.

Bhaladhare vd. (2016) Hindistanda yetiştirilen bazı yerli sığır ırklarında (245 baş) TLR2 geni üzerindeki 3 SNP ve TLR4 geni üzerindeki 4 SNP'in tüberküloz hastalığına direnç ile ilişkisini inceledikleri çalışmada sadece TLR2 üzerindeki bir SNP'in ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar PCR-RFLP tekniği kullanarak yaptıkları çalışmada TLR2 geni üzerinde 385. pozisyonundaki G>T mutasyonunu belirlemek için PCR'da F: TTAACCTCCATCCCCTCTGG ve R: TAAAGGGACCTGAACCAGG primerlerini kullanmış ve PCR ürünlerini *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesmişlerdir. Sonuç olarak RFLP işleminden sonra CC (245 bç), CA (245, 182, 63 bç) ve AA (182, 63 bç) olmak üzere üç genotip tespit edildiği çalışmada araştırmacılar daha önce Sadana vd. (2015) tarafından elde edilen sonuçlara benzer olarak AA genotipi ile tüberküloza direnç arasında önemli ilişki tespit etmişlerdir ($p<0.01$).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmanın materyalini SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarına ait kanlardan izole edilen DNA'lar oluşturmıştır. SA ırkına ait kan örnekleri (64 baş) Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi süt sığırcılığı işletmesinden, YK ırkına ait kan örnekleri (54 baş) Eskişehir ili Hisarcık ilçesi, Antalya ili İbradı ve Gündoğmuş ilçelerindeki yetiştiricilerden, BI ırkına ait örnekler (48 baş) Balıkesir Dursunbey ilçelerindeki yetiştiricilerden ve DAK ırkına ait örnekler (44 baş) Erzurum Olur ilçesindeki yetiştiricilerden sağlanmıştır.

3.1.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

DNA izolasyonu, PCR, ARMS-PCR ve PCR-RFLP işlemleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Labatuvar bünyesinde DNA izolasyonu (Su banyosu, vorteks, santrifüj, hassas terazi), PCR işlemleri (Thermal Cycler, otomatik pipetler) ve görüntüleme sistemleri (Yatay Elektrophoresis Takımları) mevcuttur. Mikrosatellit lokusların fragment büyüklüklerinin belirlenmesi ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Genetik Laboratuvarı'nda bulunan otomatik kapiller fragment analiz cihazı (Fragment Analyzer – Advanced Analytical Technologies-AATI, Ames, Iowa, USA) kullanılarak yapılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kan örneklerinin alınması

Kan örnekleri hayvanların boyun toplardamarından (*Vena jugularis*) yaklaşık 5 ml olacak şekilde K3 EDTA'lı tüplere alınmıştır. Alınan kan örnekleri en kısa sürede soğuk zincir içerisinde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Genetik laboratuvarına getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Genomik DNA izolasyonu

Yapılan araştırmada genomik DNA molekülünün izolasyonunda Miller vd (1988) tarafından bildirilen DNA izolasyon protokolü laboratuvar koşullarına optimize edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. -20 °C'de muhafaza edilen kan örnekleri çözülene kadar oda sıcaklığında (24–25 °C) bekletilmiştir.
2. Her bir kan örneğinden 50 µl alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüp içine konulmuştur.
3. Örneklerin üzerine 1.000 µl **Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi** (Çizelge 3.2.) ilave edilmiş ve kısa bir süre vorteksle iyice karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Bekletme süresinin sonunda örnekler 3.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.

5. Ependorf tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım (süpernatant) dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan peletlerin (hücre kısmı) rengi gözlenerek peletlerin rengi beyaz olana kadar Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi ile tekrar (ortalama 2-3 defa) muamele edilmiştir.
6. Peletlerin üzerine 1.000 µl **Fizyolojik Tampon Çözeltisi** (Çizelge 3.1.) eklenmiş ve kısa bir süre karıştırılmıştır.
7. Örnekler 3.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.
8. Peletlerin üzerine 600 µl **Lisis TE Tampon Çözeltisi** (Çizelge 3.1.) eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.
9. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl SDS solusyonu ve 5 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 65 °C’de 1,5 saat su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılmıştır.
10. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 200 µl **6M NaCl Çözeltisi** (Çizelge 3.1.) eklenmiş ve 15 dk vorteksle iyice karıştırılmıştır.
11. Örnekler 10.000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine koyulmuştur.
13. Örnekler 10.000 rpm de 5 dk tekrar santrifüj edilmiş ve yine üstte kalan sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine alınmıştır.
14. Örnekler üzerine örnek hacminin iki katı hacimde (yaklaşık 1.000 µl) % 99,9’luk saf etil alkolden (–20 °C’de saklanan) ilave edilmiştir.
15. Etil alkol ilave edildikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 10-15 kez hafifçe karıştırılmıştır.
16. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 10.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.
17. Santrifüj sonunda etil alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletinin üzerine 1.000 µl % 70’lik etil alkol ilave edilerek 10.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir.
18. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde yer alan alkol uzaklaştırılmıştır.
19. Tüp içindeki alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler çeker ocak içinde kurumaya bırakılmıştır.
20. Tamamen kuruyan örnekler üzerine 100 µl **TE Tampon Çözeltisi** (Çizelge 3.1.) ilave edilmiş olup, DNA peletinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 °C’de bekletilmiştir.

21. Genomik DNA izolasyonunun miktar ve saflık kontrollerinin yapılmasında NanoDrop Spektrofotometre'den yararlanılmış ve elde edilen veriler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

22. Örneklerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin tek parça olup olmadıklarının (kırılıp kırılmadığı) kontrolleri % 1'lik agaroz jellerinde yapılmıştır.

Çizelge 3.1. DNA izolasyonu için kullanılan tampon çözeltilerin molaritesi/miktarı ve içerikleri

Tampon Çözelti	Molarite/Miktar	İçerik
Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi	0,32 M 10 mM 5 mM	Sukroz EDTA MgCl ₂
Fizyolojik Tampon Çözeltisi	75 mM 25 mM	NaCl EDTA
Lisis TE Tampon Çözeltisi	500 mM 20 mM 10 Mm	Tris-HCl EDTA NaCl
TE Tampon Çözeltisi	10 mM 1Mm	Tris EDTA
6M NaCl Çözeltisi	3.50 g 10 ml'ye tamamlanır	NaCl Deiyonize H ₂ O

3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması

DNA izolasyon işlemi sonunda DNA miktarlarının belirlenmesinde spektrofotometre kullanılmıştır. DNA miktarları belirlendikten sonra DNA'lar PCR işleminde kullanılmak üzere 50 ng/µl miktarına ayarlanmıştır.

3.2.4. PCR-RFLP, ARMS-PCR ve mikrosatellit analizleri

Kaynak taramaları kısmında da belirtildiği üzere sığırlarda çeşitli hastalıklara direnç ya da yatkınlıkla ilişkili olduğu belirlenen çok sayıda lokus vardır. Yapılan literatür taraması sonucunda sığırlarda mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına dirençle ilgili en çok çalışılan lokuslar incelenmiş ve uygun görülen dokuz lokusun çalışılmasına karar verilmiştir. Bu lokuslar üzerindeki SNP'leri belirlemek için kullanılan yöntem ve primer dizilerine ait bilgiler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2'de görüldüğü üzere mastitis hastalığına direnç ile ilgili genotiplerin belirlenmesinde PCR-RFLP yöntemi, şap hastalığına direnç ile ilgili genotiplerin belirlenmesinde ARMS-PCR yöntemi ve tüberküloz hastalığına direnç ile ilişkili genotiplerin belirlenmesinde ise Mikrosatellit ve PCR-RFLP yöntemleri kullanılmıştır

.Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan yöntemler ve PCR işlemi için primer sekansları

Hastalık	Gen	Yöntem	Primer	Anneling sıcaklığı (°C)	Kaynak
Mastitis	CD14	PCR-RFLP	F: CTTCTGTTATAGCCCCCTTTCC R: CACGATACGTTACGGAGACTGA	60	Kumar vd. 2014
	MBL1Ekzon 2 (2651G>A)	PCR-RFLP	F: GGTGGCAAATGTTGGCTA R: GTCTTCTGAGCATCCTCCA	54	Wang vd.2011
	MBL1Ekzon 2 (2534G>A)	PCR-RFLP	F: GTATCCTTCTCAAATACAAAAGAC R: CCCCTGTCTCTATGCTAGAC	54	Yuan vd. 2013
Şap	ITGB6 5'UTR 29G>A	ARMS-PCR	Outer F: CTTTCCCTAGCCTGCCTTCT Outer R: GTTCAATCCCCATCCGTTT Inner F: ATCATGTTGGAGTTGCTCATG Inner R: GGTAAGAAGAAAAGCTGTGATT	-	Singh vd. 2014a
	ITGB6 (2145T>C)	ARMS-PCR	Outer F: TGCATAATAAACTCAATAC Outer R: ATTCATCAGCCACCTTTTTG Inner F: CAGATTTCTCAAAGGATAGCTT Inner R: CTTGCAGAGAACAGGAAACAG	-	Singh vd. 2015
Tüberküloz	SLC11A1	Mikrosatellit	F: GTGGAATGAGTGGGCACAGT R: TCTCCGTCTGCTGTGCAT	55	Kadarmideen vd. 2011
	SLC11A1 (7400C>G)	PCR-RFLP	F: TGTGCTTCACATCTCCTTCCTA R: AGCACATTGAGCAGGTCGTT	60	Liu vd. 2017
	SLC11A1 (5411G>A)	PCR-RFLP	F: TGAGGATCAGTGAGGGAAAAGA R: AAACCTGCTTGCATATTCCCAAC	58	Liu vd. 2017
	TLR2	PCR-RFLP	F: TTAACCTCCATCCCCTCTGG R: TAAAGGGACCTGAACCAGG	55	Sadana vd. 2015

3.2.5. PCR-RFLP analizleri

Çalışmada CD14, MBL1 (ekzon 2 üzerindeki 2534G>A ve 2651G>A mutasyonları), SLC11A1 (5411G>A ve 7400C>G mutasyonları) ve TLR2 genlerindeki SNP'leri belirlemek için PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen ve üzerlerinde hastalıklarla ilişkili SNP'lerinde bulunduğu gen bölgelerini Çizelge 3.2'de baz dizilimleri verilen primerler ile PCR işlemlerinde çoğaltılmıştır. PCR işleminde kullanılan program ve PCR bileşenleri Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 3. PCR bileşenleri ve programı

PCR Bileşeni	Miktar μ l (1X)	PCR programı	
H ₂ O	16	İlk denatürasyon	95°C de 5 dk
MgCl ₂	4 (2,5 mM/ μ l)	Denatürasyon	95°C de 45 sn
10X buffer	3 (pH:8.5)	Bağlanma	Çizelge 3.2. 45 sn
dNTPs	3 (2,5 mM/ μ l)	Uzama	72 °C de 50 sn
Forward Primer	0.4 (10 pmol/ μ l)	Son uzama	72 °C de 5 dk
Reverse Primer	0.4 (10 pmol/ μ l)		
Taq	0.2 (1 unit)		
DNA	3		

30 döngü

PCR işlemi Thermo Arktik marka Gradient Thermal Cycler kullanılarak yapılmıştır. PCR 0.2 ml'lik PCR tüplerinde toplam hacim 30 μ l (3 μ l DNA + 27 μ l PCR karışımı) olacak şekilde uygulanmıştır.

PCR işleminin başarılı olup olmadığı agaroz jel ile kontrol edilmiştir. PCR işlemi ile çoğaltılan DNA fragmentleri 10 μ l PCR ürünü 1,5 μ l boya olacak şekilde toplam 11,5 μ l hacminde % 1,5' luk agaroz jele yüklenmiş ve 75 V'da 60-90 dk arasında yürütülmüştür. Bu sayede çoğaltıldığı düşünülen farklı büyüklükteki PCR ürünlerinin jelde ayrılması sağlanmış ve bu bantlar görüntüleme cihazında UV ışık altında görünür hale getirilmiştir. İstenilen gen bölgelerinin PCR işleminde başarı ile çoğaltıldığına karar verildikten sonra RFLP için ilgili restriksiyon enzimleri (RE) ile kesim işlemine geçilmiştir.

RFLP işlemi için PCR ürünleri Çizelge 3.4'de verilen restriksiyon enzimleri ile kesime bırakılmıştır. Kesim işlemi için 8 μ l PCR ürünü, 8 μ l H₂O, 1.2 μ l enzim buffer ve 0.3 μ l kesim enzimi olacak şekilde toplam hacim 17.5 μ l olarak kesime bırakılmıştır. Kesim işlemi Thermal Cycler kullanılarak kullanılarak 0.2 ml'lik PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Kesim sıcaklıkları ve kesim süresi üretici firma tarafından ürün kataloglarında belirtilen süre dikkate alınarak yapılmış ve Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 4. RFLP işleminde kullanılan RE ve kesim koşulları

Gen	RE	Marka/Kat. No.	Kesim Süresi	Kesim Sıcaklığı
CD14	<i>HinfI</i>	Thermo / ER0801	3 saat	37 °C
MBL, Ekzon 2 (2651G>A)	<i>StyI</i>	Thermo / ER0411	3 saat	37 °C
MBL, Ekzon 2 (2534G>A)	<i>MaeII</i> (Tail)	Thermo / ER1142	3 saat	65 °C
SLC11A1 (7400C>G)	<i>PstI</i>	Thermo / ER0611	3 saat	37 °C
SLC11A1 (5411G>A)	<i>MaeII</i> (Tail)	Thermo / ER1142	3 saat	65 °C
TLR2	<i>EcoRV</i> (Eco32I)	Thermo / ER0301	3 saat	37 °C

Kesim işleminden sonra kesim ürünlerinin kontrolü yani olası genotiplerin belirlenmesi için tekrar agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Bu işlem için kesim ürünlerinin olası bant büyüklüklerine göre (Çizelge 3.5’de gösterilmiştir) % 2-3 arasında yoğunlukta agaroz jel hazırlanmıştır. 10 µl kesim ürünü ve 1 µl dye olacak şekilde 11 µl olarak jelin kuyucuklarına yüklenen kesim ürünleri, 60 V’da ortalama 120 dk yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda bantların büyüklüklerine bakılarak çalışılan sığır ırklarının ilgili genler için hangi genotipleri taşıdığına karar verilmiştir.

Çizelge 3. 5. PCR ve RFLP işlemleri sonunda olası bant büyüklükleri

Gen	PCR Ürünleri (bp)	Kesim Ürünleri (bp)
CD14	832	CC: 377, 272,183 CD: 377, 272, 225, 183, 47 DD: 377, 225, 183,47
MBL, Ekzon 2 (2651G>A)	162	GG: 162 GA:162, 141, 21 AA: 141,21
MBL, Ekzon 2 (2534G>A)	217	GG: 194,23 GA: 217,194,23 AA: 217
SLC11A1 (7400C>G)	936	GG: 633, 303 CG: 709, 633, 303, 227 CC:709;227
SLC11A1 (5411G>A)	998	GG: 631, 226, 141 AG: 631, 367, 226, 141 AA: 631,367
TLR2	245	CC: 245 CA: 245, 182, 63 AA: 182,63

3.2.6. ARMS-PCR analizleri

Araştırmada şap hastalığı ile ilişkili ITGB6 5'UTR bölgesindeki polimorfizmleri belirlemek için ARMS-PCR işlemi uygulanmıştır. ARMS PCR işleminde kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. ARMS-PCR işlemi için kullanılan PCR programı ve PCR bileşenleri ise Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Kaynak taramaları kısmında ayrıntıları belirtildiği üzere ARMS-PCR işleminde klasik PCR işleminden farklı olarak iki yerine dört primer kullanılmıştır. Ayrıca spesifik olmayan bantların oluşumunun önlenmesi başlangıçta bağlanma sıcaklığı mümkün olduğunca yüksek tutulmuş ve kademeli olarak izleyen döngülerde düşürülmüştür. PCR işleminde bağlanma sıcaklığına 60 °C'de başlanmış ve her döngüde 1 °C düşürülerek 10. döngünün sonunda 50 °C'ye düşürülmüştür. İzleyen 25 döngü 50 °C olarak toplam 35 döngü uygulanmıştır.

Çizelge 3. 6. ARMS-PCR için PCR bileşenleri ve programı

PCR Bileşeni	Miktar (µl)	PCR Programı		
H ₂ O	33.7	İlk Den.	95°C de 5 dk	Her döngüde 1 °C azalacak şekilde toplam 10 döngü uygulanmıştır
MgCl ₂	4	Denatürasyon	94°C de 30 s	
10X	4	Bağlanma	60 °C de 30 s	
dNTPs	3 (2,5 mM/ µl)	Uzama	72 °C de 30 s	
FO	0.5 (10 pmol/µl)	Denatürasyon	94°C de 30 s	50 °C sabit olacak şekilde toplam 25 döngü uygulanmıştır
RO	0.5 (10 pmol/µl)	Bağlanma	50°C de 30 s	
FI	0.5 (10 pmol/µl)	Uzama	72 °C de 30 s	
RI	0.5 (10 pmol/µl)	Son Uzama	72 °C de 5 dk	
Taq	0.3			
DNA	3			

PCR işlemi Thermo Arktik marka Gradient Thermal Cycler kullanılarak yapılmıştır. PCR 0.2 ml'lik PCR tüplerinde toplam hacim 50 µl (3µl DNA + 47µl PCR karışımı) olacak şekilde uygulanmıştır. PCR ürünlerinin kontrolü için % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır.

3.2.7. Mikrosatellit analizleri

Araştırmada tüberküloz hastalığına dirençle ilişkili olduğu bildirilen SLC11A1 genindeki tekrarlı bölgenin büyüklüğünü belirlemek için Çizelge 3.2'de baz dizileri verilen primerler ile PCR işlemi uygulanmıştır. PCR programı ve PCR bileşenleri Çizelge 3.3'de bildirilen değerler ile aynıdır. PCR işleminden sonra PCR ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için Advanced Analytical marka kapiller sistem fragment analiz cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz 2 bç'ne kadar çok hassas ölçümler yapabilmektedir. Ekonomik kayıpları önlemek için örnekleri cihaza yüklemeden önce PCR ürünleri agaroz jelde kontrol edilmiş ve çalışmayan örneklerin PCR'ları tekrarlanmıştır. Fragment analiz cihazında fragment büyüklüklerinin tespitinde Advanced Analytical DNF-900 (35-500 bç) kit kullanılmıştır. Bu kit 35-500 bç aralığında okuma yapabilmektedir. Başka bir ifadeyle bu kitin kullandığı marker 35-500 bç aralığını göstermektedir. Örnekler cihaza 0.2 ml'lik 96'lık PCR plakalarında (Axgen

PCR-96-FLT-C), her kuyucukta tek örnek olacak şekilde yüklenmiştir. Örnekler bir kuyucuğa 3 µl PCR ürünü ve 22 µl dilution buffer olacak şekilde toplam hacim 25 µl olarak cihaza yüklenmiştir.

3.2.8. İstatistik analizler

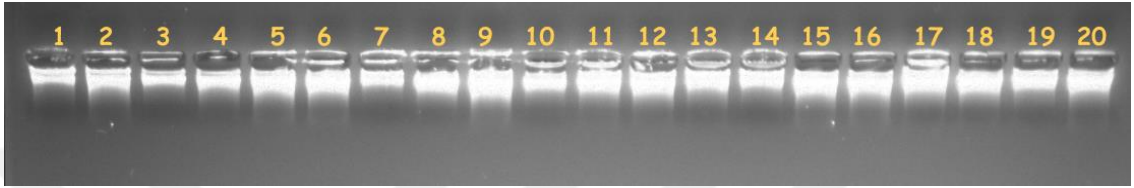
Türkiye’de yetiştirilen dört farklı sığır ırkı popülasyonunda incelenen genler bakımından gen ve genotip frekanslarının belirlenmesinde ayrıca filogenetik ilişkinin incelenmesinde (dendogramın oluşturulmasında) POPGENE (Yeh vd 1997) paket programı kullanılmıştır. Ayrıca her gen için popülasyonlarda Hardy Weinberg dengesinden sapma olup olmadığı ki-kare (χ^2) istatistiği kullanılarak test edilmiştir (Hartl and Clark 1989).



4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyonu

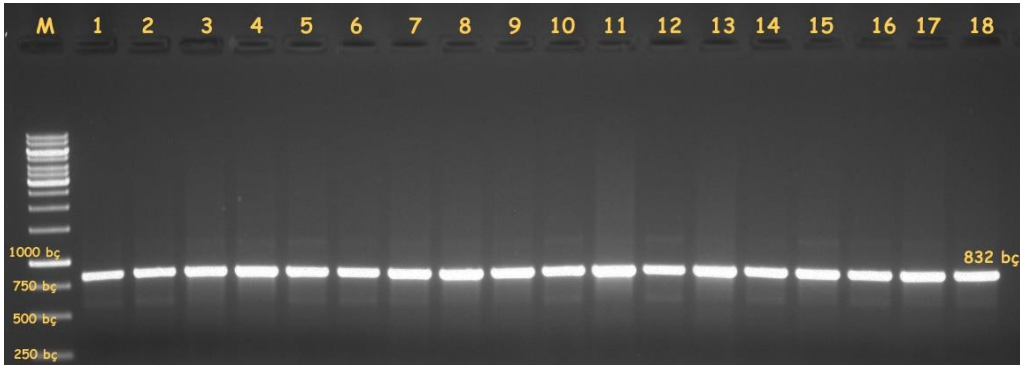
Araştırmada DNA izolasyonu için Miller vd. (1988) tarafından bildirilen protokol laboratuvar koşullarımıza optimize edilerek uygulanmıştır. DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığı % 1'lik agaroz jel kullanılarak kontrol edilmiştir (Şekil 4.1). Agaroz jelde başarılı olduğu görülen örneklerin spektrofotometre ile DNA miktarları belirlenmiş (50-700 ng/μl) ve PCR işleminde kullanılmak üzere 50 ng/μl miktarına seyreltilmiştir.



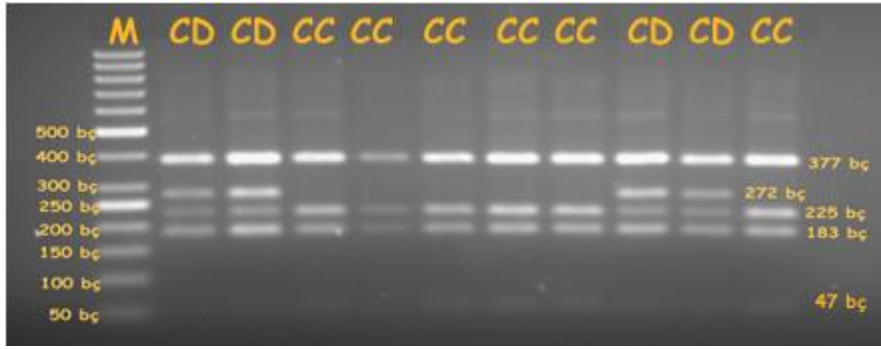
Şekil 4. 1. DNA izolasyonuna ait agaroz jel görüntüsü

4.2. Mastitis Hastalığına Direnç İçin Çalışılan Lokuslar

Çalışmada Mastitis hastalığına direnç ile ilişkili CD14, MBL1 (2651G>A) ve MBL1 (2534 G>A) genlerindeki polimorfizmler PCR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırmada CD14 geni için yapılan PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsünden bir örnek Şekil 4.2'de, PCR ürünlerinin *Hinf*I restriksiyon enzimi ile kesim görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4. 2. Şekil 4.2. CD14 geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü
M: Marker (Thermo 1 kb; Kat. No: SM0311); %1.5'luk agaroz jel



Şekil 4. 3. CD14 geni PCR ürünlerinin *Hin*fI restriksiyon enzimi ile kesilmesi

M: Marker (Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371); %3'lük agaroz jel; CC genotipi: 377,272, 183 bç; CD genotipi: 377, 272, 225, 183 bç; DD genotipi: 372, 225,183, 47 bç

Yapılan çalışmada CD14 geni için hesaplanan allel ve genotip frekansları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. CD14 geni için SA ırkı monomorf (DD genotipi) bulunurken YK, BI ve DAK ırkları polimorfik bulunmuştur. Yerli ırklarda CC genotipine rastlanmazken CD ve DD genotipleri tespit edilmiştir. CD genotip frekansının en düşük olduğu ırkın YK (0.075), en yüksek olduğu ırkın ise BI (0.267) olduğu tespit edilmiştir. En yüksek C alleli frekansı 0.133 ile BI populasyonun da, en yüksek D alleli frekansı 1.000 ile SA ırkında belirlenmiştir.

Çizelge 4. 1. CD14 geni için gen ve genotip frekansları

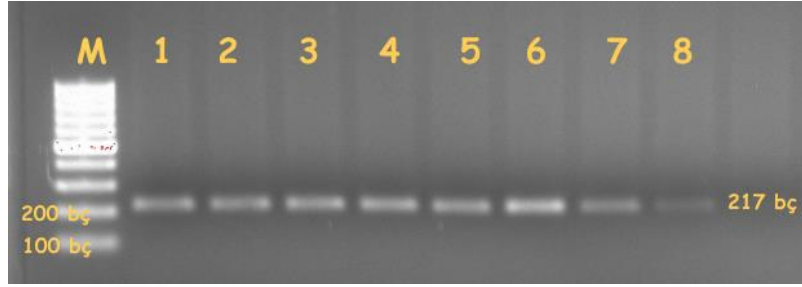
İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		C	D	CC	CD	DD	
SA	61	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	-
YK	53	0.037	0.962	0.000	0.075(4)	0.925 (49)	0.082 ^a
BI	45	0.133	0.867	0.000	0.267(12)	0.733 (33)	1.065 ^a
DAK	44	0.091	0.909	0.000	0.181(8)	0.819 (36)	0.440 ^a

χ^2 0.05;1: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz ($p>0.05$)

Mastitis hastalığı ile ilişkili MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için yapılan PCRişlemine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4'de, PCR ürünlerinin *Mae*II restriksiyon enzimi ile kesim görüntüsü Şekil 4.5'de verilmiştir. MBL1 geni üzerindeki bir diğer bölge (Ekzon 2, 2651 G>A) için elde edilen PCR görüntüsü Şekil 4.6'da, PCR ürünlerinin *Sty*I restriksiyon enzimi ile kesimine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir.

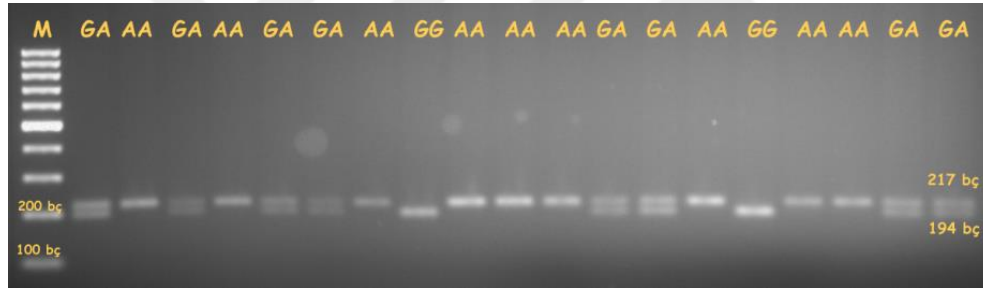
Yürütülen çalışma kapsamında MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için elde edilen gen ve genotip frekansları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çalışmada MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için tüm populasyonların polimorfik olduğu tespit edilmiştir. AA genotip frekansının en yüksek olduğu ırk 0.327 ile SA olurken en düşük olduğu ırk 0.068 ile DAK olmuştur. AG genotipi frekansı en yüksek SA (0.525) ırkında

hesaplanırken en düşük 0.387 ile DAK sığır ırkında hesaplanmıştır. GG genotip frekansı ise en yüksek DAK (0.545) ırkında, en düşük SA (0.148) ırkında hesaplanmıştır. A allelinin en yüksek bulunduğu ırk 0.590 ile SA olurken G allelinin en yüksek bulunduğu ırk 0.738 ile DAK ırkı olmuştur. Yapılan ki-kare testi sonuçlarına göre MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için tüm populasyonların Hardy Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır.



Şekil 4. 4. Şekil 4.4. MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü

M: Marker (Thermo 100 bp; Kat. No: SM0241); %1.5'lik agaroz jel



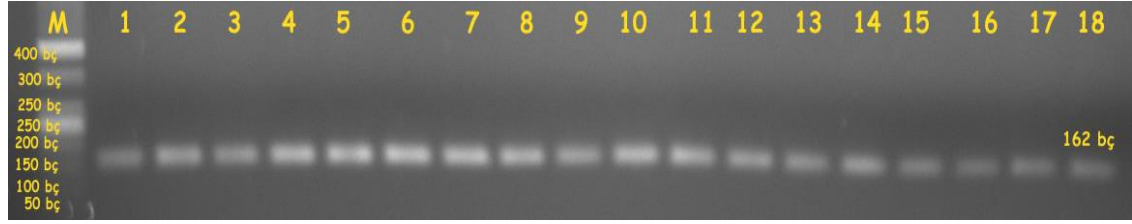
Şekil 4. 5. MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için PCR ürünlerinin MaeII restriksiyon enzimi ile kesilmesi

M: Marker (Thermo 100 bp; Kat. No: SM0241); %2'lik agaroz jel; GG genotipi: 194, 23 bç; GA genotipi: 217, 194, 23 bç; AA genotipi: 217 bç

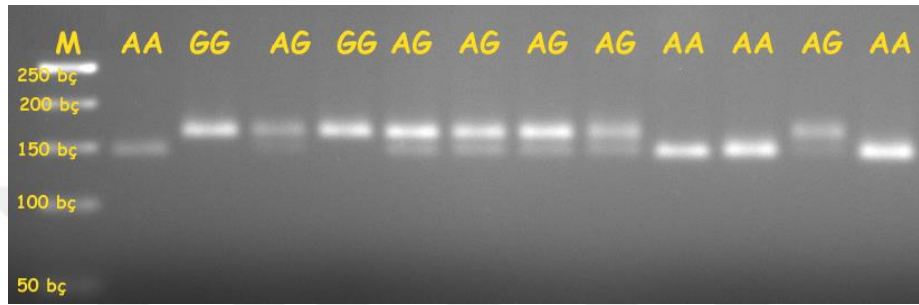
Çizelge 4. 2. MBL1 (Ekzon 2, 2534 G>A) geni için gen ve genotip frekansları

İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		A	G	AA	AG	GG	
SA	61	0.590	0.410	0.327(20)	0.525(32)	0.148(9)	0.434 ^a
YK	54	0.333	0.667	0.093(5)	0.481(26)	0.426(23)	0.375 ^a
BI	37	0.432	0.568	0.216(8)	0.433(16)	0.351(13)	0.524 ^a
DAK	44	0.262	0.738	0.068(3)	0.387(17)	0.545(24)	0.000 ^a

χ^2 0.05;1: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz ($p>0.05$)



Şekil 4. 6. MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü
M: Marker (Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371); %1.5'luk agaroz jel



Şekil 4. 7. MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için PCR ürünlerinin StyI restriksiyon enzimi ile kesilmesi

M: Marker (Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371); %3.5'luk agaroz jel; AA genotipi: 141, 21bp; AG genotipi: 162, 141, 21 bp; GG genotipi: 162 bp

Gerçekleştirilen çalışmada MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için hesaplanan gen ve genotip frekansları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çalışmada MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için AA genotip frekansı en yüksek SA ırkında (0.610) en düşük YK (0.444) ırkında hesaplanmıştır. AG ve GG genotip frekansları en yüksek sırasıyla SA (0.271) ve DAK (0.477) ırklarında, en düşük sırasıyla DAK (0.046) ve SA (0.119) ırklarında hesaplanmıştır. Yapılan ki-kare testi sonuçlarına göre MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için tüm popülasyonların Hardy Weinberg dengesinden saptığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4. 3. MBL1 (Ekzon 2, 2651 G>A) geni için gen ve genotip frekansları

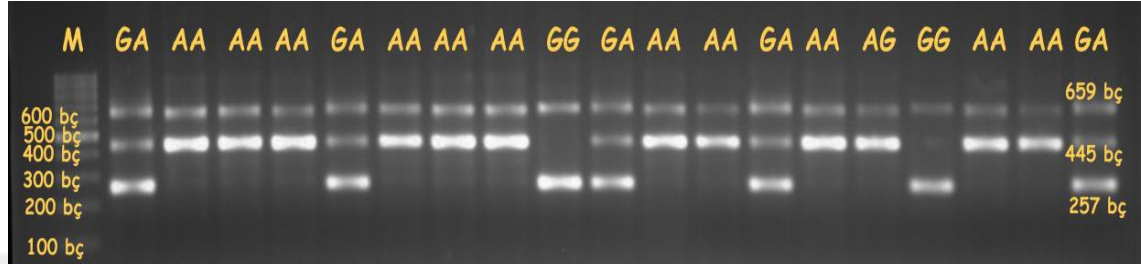
İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		A	G	AA	AG	GG	
SA	59	0.745	0.255	0.610(36)	0.271(16)	0.119(7)	4.787 ^b
YK	54	0.518	0.482	0.444(24)	0.148(8)	0.408(22)	26.709 ^c
BI	48	0.552	0.448	0.458(22)	0.188(9)	0.354(17)	18.504 ^c
DAK	44	0.500	0.500	0.477(21)	0.046(2)	0.477(21)	36.363 ^c

χ^2 0.05;1: 3.84; b: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemli (p<0.05)

χ^2 0.01;1: 6.63; c: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemli (p<0.01)

4.3. Şap Hastalığına Direnç İçin Çalışılan Lokuslar

Araştırmada şap hastalığı ile ilişkili ITGB6 reseptör geni 5'UTR bölgesindeki iki lokus ARMS-PCR tekniği ile incelenmiştir. ITGB6 geni (5'UTR bölgesi 29G>A) üzerinde Singh vd. (2014b) tarafından tanımlanan ilk lokusta elde edilen ARMS-PCR görüntüsü Şekil 4.8'de, Singh vd. (2015) tarafından tanımlanan ITGB6 geni (5'UTR bölgesi 2145T>C) ikinci lokusta elde edilen ARMS-PCR görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.



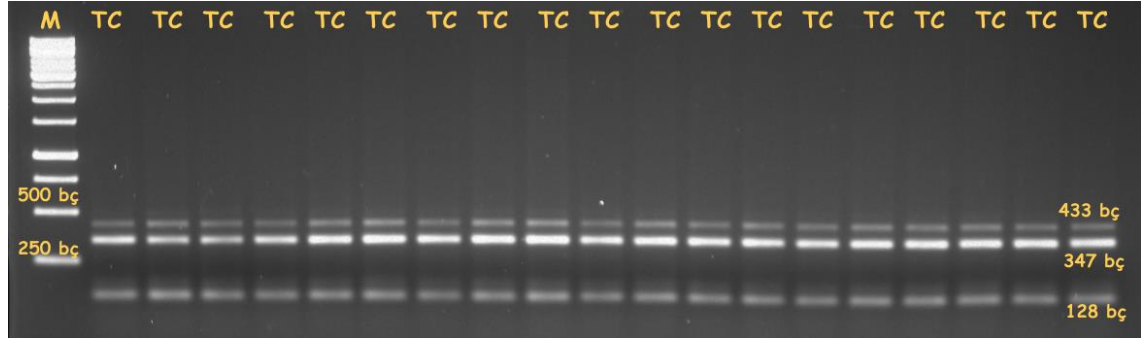
Şekil 4. 8. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi 29G>A) geni için ARMS-PCR görüntüsü
M: Marker (Thermo 100 bp; Kat. No: SM0241); %1.5'luk agaroz jel; GG genotipi: 659, 257 bç; GA genotipi: 659, 445, 257 bç; AA genotipi: 659, 445 bç

Araştırmada ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi 29G>A) geni için elde edilen gen ve genotip frekansları Çizelge 4.4'de verilmiştir. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi 29G>A) geni için çalışılan tüm sığır ırklarının polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada GG, GA ve AA genotiplerine ait en düşük frekanslar sırasıyla BI (0.063), SA (0.361) ve DAK (0.250) ırklarında bulunurken en yüksek frekanslar sırasıyla SA (0.213), DAK (0.545) ve BI-YK (0.500) ırklarında bulunmuştur. G allelinin frekansı 0.281 (BI) ile 0.477 (DAK) aralığında değişirken A alelinin frekansı 0.523 (DAK) ile 0.719 (BI) aralığında değişmiştir. Tüm tüm populasyonlarda ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi 29G>A) geni için Hardy-Weinberg dengesinden sapma olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 4. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi, 29G>A) geni için gen ve genotip frekansları

İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		G	A	GG	GA	AA	
SA	61	0.393	0.607	0.213(13)	0.361(22)	0.426(26)	3.643 ^a
YK	54	0.296	0.704	0.093(5)	0.407(22)	0.500(27)	0.029 ^a
BI	48	0.281	0.719	0.063(3)	0.437(21)	0.500(24)	0.324 ^a
DAK	44	0.477	0.523	0.205(9)	0.545(24)	0.250(11)	0.382 ^a

χ^2 0.05;1: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz ($p>0.05$)



Şekil 4. 9. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi (2145T>C) geni için ARMS-PCR görüntüsü
M: Marker (Thermo 1kb; Kat. No: SM0311); %2'lik agaroz jel; TT genotipi: 433, 347 bç; TC genotipi: 433, 347, 128 bç; CC genotipi: 433, 128 bç

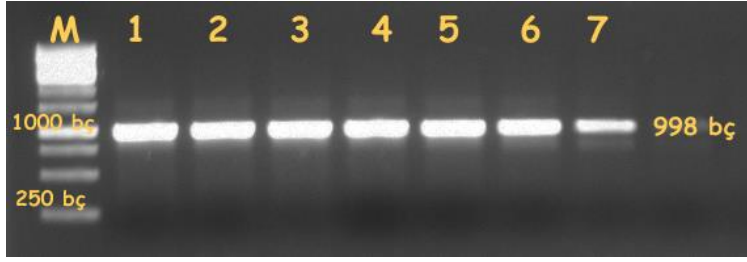
Yürütülen araştırmada ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi, 2145T>C) geni için çalışılan tüm sığır ırklarının monomorf (TC) olduğu tespit edilmiştir. Bu ırklarda ilgili gen için varyasyon tespit edilememiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4. 5. ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi, 2145T>C) geni için gen ve genotip frekansları

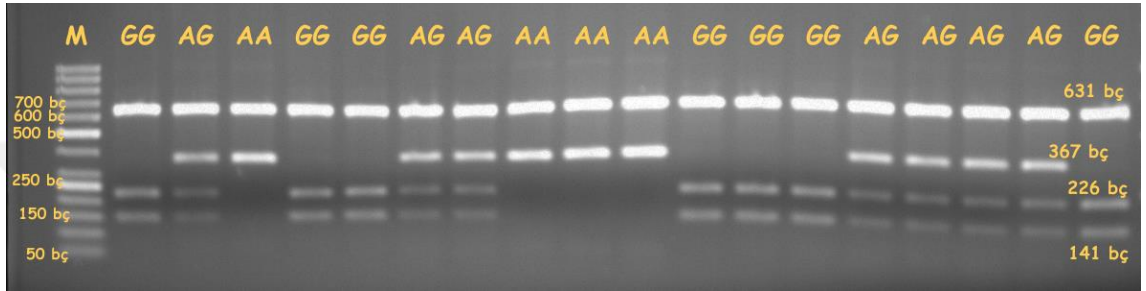
İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		T	C	TT	TC	C	
SA	62	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	-
YK	54	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	-
BI	48	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	-
DAK	44	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	-

4.4. Tüberküloz Hastalığına Direnç İçin Çalışılan Lokuslar

Yapılan araştırma kapsamında Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan dört sığır ırkında tüberküloz hastalığına direnç ile ilişkili biri mikrosatellit olmak üzere dört lokus araştırılmıştır. SLC11A1 geni (5411G>A) geni için elde edilen PCR görüntüsü Şekil 4.10'da, elde edilen PCR ürünlerinin *MaeII* restriksiyon enzimi ile kesim görüntüsü ise Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4. 10. SLC11A1 (5411G>A) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü
M: Marker (Thermo 1kb; Kat. No: SM0311); %1'lik agaroz jel



Şekil 4. 11. SLC11A1 (5411G>A) geni için PCR ürünlerinin MaeII restriksiyon enzimi ile kesilmesi
M: Marker (Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371); %3'lük agaroz jel; GG genotipi: 631,226,141bp; AG genotipi: 631, 367, 226, 141 bp; AA genotipi: 631, 367 bp

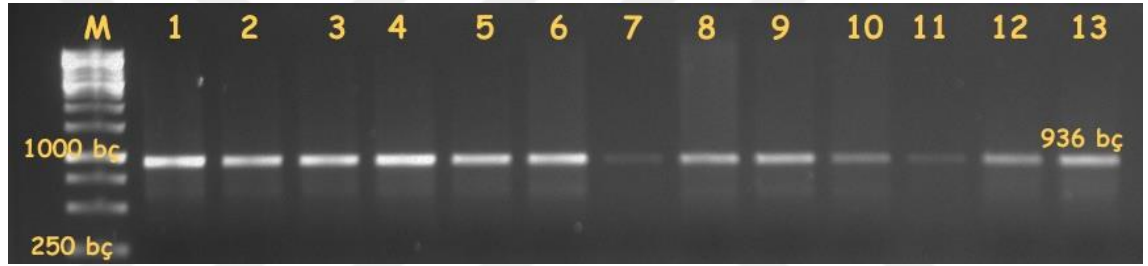
Yapılan PCR-RFLP işlemi sonucunda SLC11A1 (5411G>A) geni için tüm populasyonların polimorfik olduğu anlaşılmıştır. DAK sığır ırkında AA genotipi gözlenmezken diğer populasyonlarda her üç genotip de belirlenmiştir. SLC11A1 (5411G>A) geni için elde edilen gen ve genotip frekansları Çizelge 4.6'da verilmiştir. En yüksek GG genotip frekansı DAK (0.682) belirlenirken en düşük BI (0.423) populasyonunda hesaplanmıştır. GA genotip frekansının en yüksek olduğu ırk BI (0.467) olurken en düşük olduğu ırk SA (0.288) olmuştur. AA genotipinin frekansının 0.074 (YK) ile 0.111 (BI) aralığında değiştiği hesaplanmıştır. G allelinin frekansı en yüksek DAK (0.841) sığır ırkında hesaplanırken A allelinin frekansı en yüksek BI (0.345) sığır ırkında hesaplanmıştır. Ki-kare testi sonuçlarına göre SLC11A1 (5411G>A) geni için tüm populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4. 6. SLC11A1 (5411G>A) geni için gen ve genotip frekansları

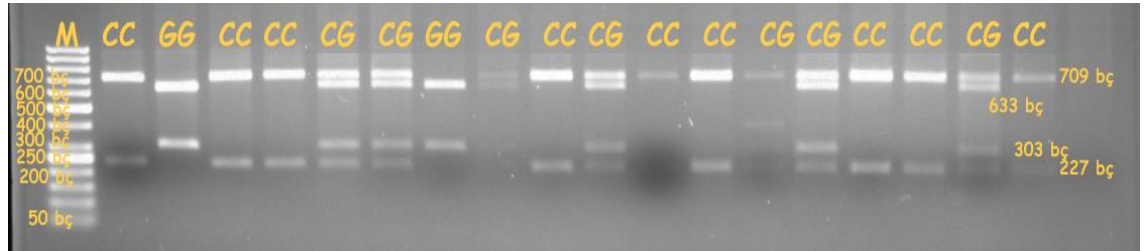
İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		G	A	GG	GA	AA	
SA	59	0.788	0.212	0.644(38)	0.288(17)	0.068(4)	1.111 ^a
YK	54	0.731	0.269	0.537(29)	0.389(21)	0.074(4)	0.005 ^a
BI	45	0.655	0.345	0.423(19)	0.467(21)	0.111(5)	0.050 ^a
DAK	44	0.841	0.159	0.682(30)	0.318(14)	0.000	1.575 ^a

χ^2 0.05;1: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz (p>0.05)

SLC11A1 geni (7400C>G) geni için elde edilen PCR görüntüsü Şekil 4.12’de, elde edilen PCR ürünlerinin *Pst*I restriksiyon enzimi ile kesim görüntüsü ise Şekil 4.13’de verilmiştir. Yapılan PCR-RFLP analizi sonuçlarına göre SLC11A1 geni (7400C>G) geni için çalışılan dört sığır ırkı da polimorfik bulunmuştur.



Şekil 4. 12. SLC11A1 (7400C>G) geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü
M: Marker (Thermo 1kb; Kat. No: SM0311); %1’lik agaroz jel



Şekil 4. 13. SLC11A1 (7400C>G) geni için PCR ürünlerinin *Pst*I restriksiyon enzimi ile kesilmesi

M: Marker (Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371); %3’lük agaroz jel; GG genotipi: 633, 303 bç; CG genotipi: 709, 633, 303, 227 bç; CC genotipi: 709, , 227 bç

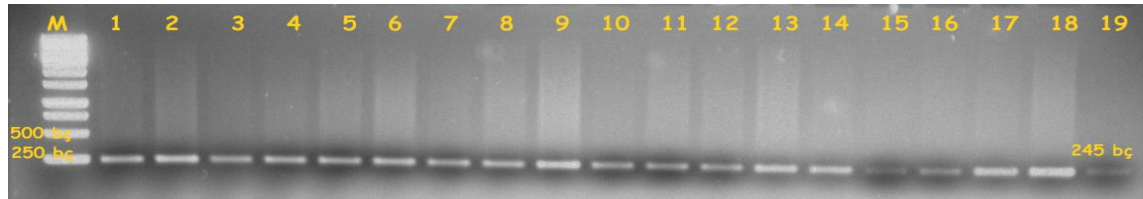
Çalışmada SLC11A1 geni (7400C>G) geninde elde edilen gen ve genotip frekansları Çizelge 4.7’de verilmiştir. PCR-RFLP analizleri sonucunda GG genotipi sadece SA popülasyonunda (0.050) belirlenirken diğer popülasyonlarda tespit edilememiştir. GC ve CC genotip frekanslarının en yüksek olduğu ırklar sırasıyla BI (0.569) ve DAK (0.682) popülasyonları olmuştur. . GC ve CC genotip frekansları en düşük olarak ise sırasıyla SA (0.305) ve BI (0.431) popülasyonlarında hesaplanmıştır. Ki-kare testi sonuçlarına göre SLC11A1 (7400G>A) geni için YK ve BI popülasyonlarının Hardy-Weinberg dengesinden saparken, SA ve DAK popülasyonlarının dengede olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4. 7. SLC11A1 (7400G>A) geni için gen ve genotip frekansları

İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		G	C	GG	GC	CC	
SA	59	0.203	0.797	0.050(3)	0.305(18)	0.645(38)	0.201 ^a
YK	53	0.245	0.755	0.000	0.491(26)	0.509(27)	5.598 ^b
BI	44	0.284	0.716	0.000	0.569(25)	0.431(19)	6.929 ^c
DAK	44	0.159	0.841	0.000	0.318(14)	0.682(30)	1.575 ^a

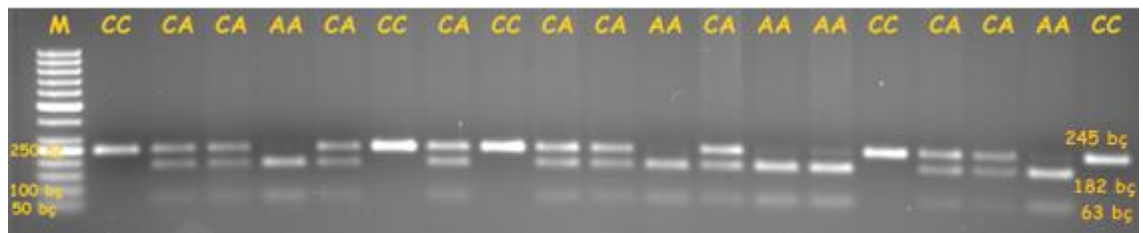
χ^2 0.05;1: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz ($p>0.05$), b: Hardy-Weinberg dengesinden önemli ($p<0.05$), χ^2 0.01;1: 6.63; c: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemli ($p<0.01$)

TLR2 geni için elde edilen PCR görüntüsü Şekil 4.14’de, elde edilen PCR ürünlerinin *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesim görüntüsü ise Şekil 4.15’de verilmiştir. Çalışma elde edilen sonuçlardan çalışılan tüm popülasyonları TLR2 geni polimorfik olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4. 14. TLR2 geni için PCR işlemine ait agaroz jel görüntüsü

M: Marker (Thermo 1kb; Kat. No: SM0311); %1’lik agaroz jel



Şekil 4. 15. TLR2 geni için PCR ürünlerinin *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilmesi
M: Marker (Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371); %3’lük agaroz jel; CC genotipi: 245 bp; CA genotipi: 245,182,63 bp; AA genotipi: 182,63 bp

Çalışılan dört sığır ırkında C allelinin frekansı 0.287 (SA) ile 0.557 (DAK) aralığında değişirken, A allelinin frekansı 0.443 (DAK) ile 0.713 (SA) aralığında değişmektedir. CC genotipinin frekansı en yüksek YK (0.315) ırkında belirlenirken en düşük SA (0.093) tespit edilmiştir. CA ve AA genotip frekansları sırasıyla en yüksek DAK (0.659) ve BI (0.468) populasyonlarında, en düşük olarak sırasıyla SA (0.389) ve DAK (0.114) ırklarında hesaplanmıştır. TLR2 geni için DAK populasyonunun Hardy Weinberg dengesinden saptığı, diğer üç populasyonun ise dengede olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8).

Çizelge 4. 8. TLR2 geni için gen ve genotip frekansları

İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			χ^2
		C	A	CC	CA	AA	
SA	54	0.287	0.713	0.093(5)	0.389(21)	0.518(28)	0.134 ^a
YK	54	0.546	0.454	0.315(17)	0.462(25)	0.223(12)	0.235 ^a
BI	47	0.383	0.617	0.149(7)	0.468(22)	0.383(18)	0.004 ^a
DAK	44	0.557	0.443	0.227(10)	0.659(29)	0.114(5)	4.950 ^b

χ^2 0.05;1: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz ($p>0.05$), b: Hardy-Weinberg dengesinden önemli ($p<0.05$).

Çalışmada SLC11A1 geni üzerinde tekrarlı bölgedeki polimorfizmler mikrosatellit marker yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen allel frekansları ve bazı tanımlayıcı istatistikler Çizelge 4.9’da gösterilmiştir. Çalışmada en düşük allel sayısı (4) DAK populasyonunda, en yüksek (8) ise SA populasyonunda tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 9. SLC11A1 geni üzerinde mikrosatellit marker analizi sonucu elde edilen allel frekansları

Allel	SA	YK	BI	DAK	Özgün Allel
201	0.020	0.000	0.000	0.000	SA
203	0.030	0.000	0.000	0.000	SA
205	0.098	0.160	0.418	0.523	
207	0.206	0.000	0.000	0.000	SA
209	0.245	0.230	0.427	0.204	
211	0.156	0.470	0.107	0.182	
213	0.000	0.050	0.012	0.091	
215	0.137	0.070	0.036	0.000	
217	0.108	0.020	0.000	0.000	
Na	8	6	5	4	
Ne	5.939	3.255	2.701	2.806	
Ho	0.745	0.520	0.761	0.909	
He	0.840	0.699	0.637	0.651	

Na: Gözlenen allel sayısı, Ne: Etkili allel sayısı, H_0 : Gözlenen heterozigotluk H_E : Beklenen heterozigotluk

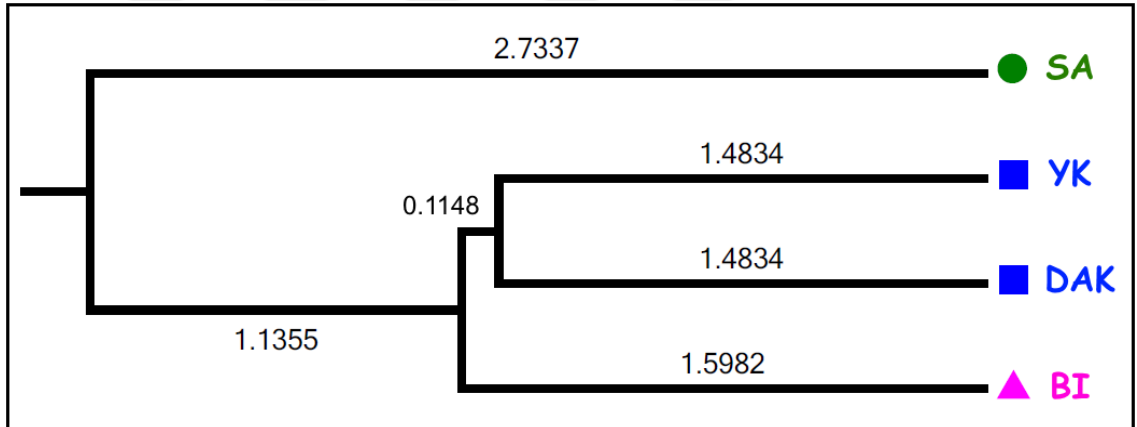
4.5. Hastalıklara Dirençle İlişkili Lokuslar Üzerinden Filogenetik İlişki

Çalışılan lokusların bir arada değerlendirilmesi tespit edilen Nei (1978)'nin genetik mesafe değerlerinden (Çizelge 4.10) yararlanılarak oluşturulan UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) dendogramı Şekil 4.16'da, verilmiştir. UPGMA dendogramı sonuçlarına göre ırklar genetik kökenlerine uygun olarak iki kümede toplanmıştır. Birinci kümede SA ırkı yer alırken ikinci kümede DAK, YK ve BI ırkları yer almıştır. İkinci kümede yer alan gruplardan YK ve DAK populasyonları genetik olarak birbirine BI ırkına göre daha yakındır.

Çizelge 4.10. Dokuz lokusta elde edilen genetik mesafe ve genetik benzerlik değerleri

I	SA	YK	B	DAK
SA	***	0.948	0.957	0.926
YK	0.054	***	0.965	0.967
B	0.044	0.035	***	0.963
DAK	0.077	0.033	0.037	***

Nei'nin genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik mesafe (köşegen altı) değerleri



Şekil 4. 16. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan dört farklı sığır ırkında hastalıklara direnç lokusları üzerinden oluşturulan UPGMA dendogramı

5. TARTIŞMA

Sığırlarda CD14 geni üzerinde 4. bölgede bir nokta mutasyonu sonucu oluşan SNP'nin PCR-RFLP analizi ile belirlenmesi sonucu oluşan genotiplerden (CC, CD ve DD), CC genotipini taşıyan hayvanların mastitise karşı daha dirençli olduğu ve mastitise dirençte C allelinin istenen allel olduğu değişik araştırma grupları tarafından raporlanmıştır (Kumar vd. 2014; Selvan vd. 2014). Bu çalışmada SA ırkı sığırlarda CD14 istenilen genotip (CC) ya da istenilen allel (C) tespit edilememiştir. Yerli sığır ırklarımız olan BI, YK ve DAK sığır ırkında ise yine CC genotipi tespit edilemezken SA ırkından farklı olarak CD genotipi dolayısıyla C alleli tespit edilmiştir. YK, BI ve DAK sığır ırklarında tespit edilen C allelin frekansları (sırasıyla 0.037, 0.133 ve 0.091), Kumar vd. (2014) tarafından Sahiwal sığır ırkında (0.65), Selvan vd. (2014) tarafından Karan Fries ırkında (0.29) bildirilen değerlerden düşüktür.

Yaptığımız çalışmada SA ırkının CD14 geni için monomorf (DD genotipi) çıkmasının nedeni örneklerin tek bir işletmeden alınması ya da örnek sayısının (64) yetersiz olması olarak düşünülebilir. SA ırkına ait örnekler daha önce Materyal kısmında belirtildiği üzere Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi süt sığırcılığı işletmesinden alınmıştır. Ancak bu işletmedeki hayvanlar çok kısa bir zaman önce (2 yıl) üç farklı ilde on dolayında farklı işletmeden toplanmıştır. Örnek sayısının ise yapılan benzer çalışmalarla kıyaslandığında oldukça yeterli olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmada CD14 geni için elde edilen sonuçların SA ırkındaki gerçek durumu yansıttığı düşünülmektedir. YK, BI ve DAK gibi Türkiye yerli sığır ırklarında ise CC genotipi olmasa da C allelinin olduğu ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu bulunmuştur.

Yürütülen çalışmada MBL1 (Ekzon 2; 2534 G>A) geni için çalışılan tüm ırklar polimorfik bulunmuştur. Mastitis hastalığına dirençli olan GG genotipinin frekansının SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında sırasıyla 0.148, 0.426, 0.351 ve 0.545 olduğu, G allel frekanslarının ise sırasıyla 0.410, 0.667, 0.568 ve 0.738 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Yuan vd. (2013) Çin'de yetiştirilen Siyah Alaca, Sanhe ve Simental ırklarında GG genotipinin frekansını sırasıyla 0.542, 0.378 ve 0.479 olarak, G allelinin frekanslarını ise 0.633, 0.544 ve 0.620 olarak bildirmiştir. Bizim DAK sığır ırkında elde ettiğimiz gen ve genotip frekansları değeri Yuan vd. (2013) tarafından üç farklı ırkta bildirilen değerlerden yüksek iken, SA ırkında bulduğumuz değerler daha düşüktür. BI ve YK sığır ırklarında elde ettiğimiz değerler ise Yuan vd. (2013) tarafından bildirilen değerler ile benzerlik göstermektedir. MBL1 (Ekzon 2; 2534 G>A) geni için mastitise direnç genotipi olan GG ile, istenilen allel olan G'nin frekansının Türkiye'de yetiştirilen SA ırkı sığırlarda yerli sığır ırkları olan YK, BI ve DAK'na göre düşük olmakla birlikte yeterli seviyede olduğu anlaşılmaktadır. Yerli sığır ırklarının kültür ırkı olan SA ırkına göre daha kötü çevre ve bakım koşullarında yetiştirilmesinden kaynaklı uzun yıllar içerisinde mastitise karşı daha fazla direnç kazandığı düşünülmektedir.

Wang vd. (2011) MBL1 (Ekzon 2; 2651 G>A) geninde elde edilen genotipler (AA, AG, GG) ile mastitise direnç arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmada AG ve GG genotipini taşıyan bireylerin sütündeki somatik hücre sayısının AA genotipini taşıyanlara göre önemli derecede ($p<0.05$) düşük olduğunu raporlamışlardır. Araştırmacılar AG ve GG genotipindeki hayvanların mastitise daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada duyarlılık ile ilişkili olduğu bildirilen AA genotipinin SA,

YK, BI ve DAK sığır ırklarındaki frekansları sırasıyla 0.610, 0.444, 0.458 ve 0.500 olarak belirlenmiştir. Bu değerler Wang vd (2011) tarafından Çin Holsteinlarında bildirilen değerden (0.15) oldukça yüksektir. Bu çalışmada yerli sığır ırklarımızda MBL1 (Ekzon 2; 2651 G>A) geninde mastitise direnç genotipleri olan AA ve AG genotiplerinin frekansı SA ırkına yüksek bulunmuştur.

Şap hastalığına direnç için araştırılan ITGB6 reseptör (5'UTR bölgesi 29G>A) geni için çalışılan tüm ırklar polimorfik bulunmuştur. Şap hastalığına daha dirençli olan genotip AA ve istenilen allel A tüm ırklarda gösterilmiştir. Bu çalışmada SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında A allelinin frekansları sırasıyla 0.607, 0.704, 0.719 ve 0.523 Singh vd. (2014a) tarafından Hindistan'da yetiştirilen SA ırkında elde edilen A allel frekansı (0.626) ile uyum gösterirken, Sahiwal (0.833), Kankrej (1.000) ve Ongole (1.000) sığır ırklarında bildirilen değerlerden düşüktür. Singh vd. (2014a) tarafından yapılan çalışmada Sahiwal, Kankrej ve Ongole sığır ırklarında A allel frekansının aynı çalışmada SA ırkına ve bizim çalışmamızdaki dört farklı sığır ırkına göre yüksek çıkması aslında normaldir. Çünkü Sahiwal, Kankrej ve Ongole sığır ırklarının genetik kökeni *Bos Indicus* (Zebu) iken diğer ırkların genetik kökeni *Bos Taurus*'dur (Taurine). *Bos Indicus*'un şap hastalığına *Bos Taurus*'a göre daha dayanıklı olduğu bilinmektedir (Singh vd. 2014a; Singh vd. 2015).

Şap hastalığına dirençle ilişkili olan ITGB6 reseptör genindeki bir diğer mutasyon (2145 T>C) için Türkiye'de yetiştirilen SA, YK, BI ve DAK sığır ırkları monomorf (TC) bulunmuştur. Şap hastalığına dirençli TT genotipi SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında gösterilememiştir (Çizelge 4.4.). Singh vd. (2015) tarafından Hindistan'da yetiştirilen SA X Sahiwal melezi hayvanlarda TT genotipinin olması Sahiwal ırkının *Bos Indicus* (Zebu) genetik orjinli olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevcut çalışmada ise kullanılan dört ırkın genetik kökeni *Bos Taurus*'dur.

Yapılan çalışmada SLC11A1 (5411 G>A) geninde tüberküloz hastalığına dirençle ilişkili olduğu belirlenen için GG genotipinin frekansı SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında sırasıyla 0.644, 0.537, 0.423 ve 0.682 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler Liu vd. (2017) tarafından Çin'de yetiştiriciliği yapılan SA ırkında bildirilen tüberküloz hastası bireylerden (0.29) yüksek iken sağlıklı bireylerde bildirilen değerden (0.72) biraz daha düşüktür. DAK sığır ırkında GG ve AG genotip frekansları 0.682 ve 0.318 olarak tespit edilmiş, duyarlı genotip olan AA'ya rastlanmamıştır. Bu değerler Liu vd. (2017) SA ırkı sağlıklı bireylerde elde edilen genotip frekanslarına (GG: 0.72; AG: 0.28 ve AA: 0.00) oldukça benzemektedir. Çalışılan tüm ırkların ilgili gen için Hardy-Weinberg dengesinde olduğu popülasyonlarda yeterli genetik varyasyonun olduğuna işaret etmektedir. SLC11A1 (7400 G>A) geni için ise durum biraz farklıdır. Bu gen için tüberküloza direnç genotipi olan CG ve GG genotiplerinden, GG genotipine yerli ırklarda (YK, BI ve DAK) rastlanmamıştır. GG genotipi SA ırkında tespit edilmiş olsa da frekansı çok düşüktür (0.050). Bu değer Liu vd. (2017) tarafından Çin'de yetiştirilen SA ırkında bildirilen değerden oldukça düşüktür. Türkiye'de yetiştirilen dört farklı sığır ırkında tüberküloz hastalığına direnç için SLC11A1 (7400 G>A) geninde belirlenen GG genotip frekansları her ne kadar düşük olsa da ikinci direnç genotipi olan CG'nin frekansları orta düzeydedir. SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında CG genotipinin frekansı sırasıyla 0.305, 0.491, 0.569 ve 0.318 olarak tespit edilmiştir. Ancak burada YK ve BI popülasyonlarının ilgili gen bakımından Hardy-Weinberg

dengeinden sapması yeterli genetik varyasyonun olmadığını düşündürmektedir. Bunun altında yatan nedenlerin bu ırkların sayısındaki hızlı düşüş ya da yanlış örnekleme olabileceği düşünülmektedir.

Çalışılan sığır ırklarında tüberküloz hastalığı ile ilişkili çalışılan bir diğer gen olan TLR2 için tüm ırklar polimorfik bulunmuştur. SA, YK ve BI Hardy-Weinberg dengesinde iken DAK populasyonu TLR2 geni için Hardy-Weinberg dengesinden sapmıştır. Tüberküloza dirençli AA genotipinin frekansı SA, YK, BI ve DAK populasyonlarında sırasıyla 0.518, 0.223, 0.383 ve 0.114 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler Sadana vd. (2015) tarafından Hindistan yerli sığır ırkı olan Sahiwal ırkında bildirilen değer (0.260) ile karşılaştırıldığında SA ırkında bizim elde ettiğimiz değerin çok daha yüksek olduğu YK, BI ve DAK ırklarında ise çok fazla fark olmadığı gözükmemektedir. SA ırkında elde ettiğimiz değer yerli sığır ırklarımızda elde ettiğimiz değerden çok daha yüksektir.

Bhaladhare vd. (2016) Hindistan'da yetiştirilen yerli sığır ırklarında (245 örnek) TLR2 geni için CC, CA ve AA genotip frekanslarını sırasıyla 0.651, 0.269 ve 0.080 olarak bildirmiştir. Tüberküloza dayanıklı genotip olan AA genotipi için bizim SA, YK, BI ve DAK sığırlarında bulduğumuz değerler sırasıyla 0.518, 0.223, 0.383 ve 0.114 olmuştur. Bu değerler Bhaladhare vd. (2016) tarafından bildirilen değerden (0.080) oldukça yüksektir. Bunun altında yatan nedenin bu sığır ırklarının genetik kökenleri olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda kullanılan sığır ırkları *Bos Taurus*'dan köken alırken Bhaladhare vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada kullanılan hayvanlar *Bos Indicus*'dan köken almaktadır.

Kadarmideen vd. (2011) sığırlarda SLC11A1 (solute carrier family 11) geninde bulunan tekrarlı bölgedeki mikrosatellit yöntemi ile incelemiş ve 211, 213, 215 ve 217 bç uzunluğundaki dört allel elde etmişlerdir. Bu allellerden 211, 215 ve 217 bç uzunluğundaki allelleri taşıyan hayvanların BTB hastalığına daha dirençli olduğu raporlanmıştır ($p < 0.001$). Gerçekleştirilen bu yüksek lisans çalışmasında çalışılan dört ırkta elde edilen allel ve frekansları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Kadarmideen vd. (2011) yaptıkları çalışmada allel genişliğini 211-217 bç aralığında tespit ederken biz SA ırkında 201-217 bç, YK ırkında 205-217 aralığında, BI ırkında 205-215 aralığında ve DAK ırkında 205-213 bç aralığında belirledik. Bizim çalışmamızda Kadarmideen vd. (2011) tarafından tespit edilen dört allelden farklı allellerde tespit edilmiştir. Mikrosatellit marker yönteminde fragment büyüklüklerinin belirlenmesi oldukça hassas bir işlemdir. Aradaki farklılıklar değişik cihazlarda okuma yapılmasından kaynaklı olabilir. Kadarmideen vd. (2011) yaptıkları çalışmada poliakrilamid jel kullanırken biz bu çalışmada kapiller sistem kullandık. Kapiller sistemler poliakrilamid jele göre daha hassas sonuçlar vermektedir. Ancak her iki çalışma arasında farklı allellerin bulunması çalışmaları birbiriyle kıyaslamayı engellemektedir. Bizim çalışmamızda dayanıklı alleller olan 211, 215 ve 217 bç uzunluğundaki alleller tespit edilmiş olsada farklı allellerin de tespit edilmiş olması direnç ya da duyarlılık genotiplerinin tespitinde kesin yorumlar yapılmasını engellemektedir. Bu nedenle bu lokus sadece filogenetik ilişkinin belirlenmesine dahil edilmiştir.

6. SONUÇLAR

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında ulaşılan sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1-) Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan SA, YK, B ve DAK sığır ırklarından CD14 geni için direnç genotipi olan CC tespit edilememiştir. Ancak YK, BI ve DAK ırklarında mastitis hastalığı için CD14 geninde istenilen C alleli düşük frekanslarda da olsa belirlenmiştir. YK, BI ve DAK populasyonlarında bu allelin varlığı ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu bulunmuştur. Türkiye’de mastitis hastalığı için yapılacak MAS çalışmalarında CD14 geni SA ırkı için uygun değilken YK, BI ve DAK sığır ırklarında kullanılabilir.

2-) Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarından CD14 geni için direnç genotipi olan CC tespit edilememiştir. Ancak YK, BI ve DAK ırklarında mastitis hastalığı için CD14 geninde istenilen C alleli düşük frekanslarda da olsa belirlenmiştir. YK, BI ve DAK populasyonlarında bu allelin varlığı ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gösterilmiştir. Türkiye’de mastitis hastalığı için yapılacak MAS çalışmalarında CD14 geni SA ırkı için uygun değilken YK, BI ve DAK sığır ırklarında kullanılabilir.

3-) Çalışılan dört sığır ırkında MBL1 (Ekzon 2; 2651 G>A) geni için mastitise direnç genotipleri olan AG ve GG değişik frekanslarda tespit edilmiştir. Ancak bu gen için populasyonlar Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Bu nedenle bu gen MAS çalışmalarında kullanılırken daha dikkatli olunmalıdır. MBL1(Ekzon 2; 2651 G>A) geni için mastitise dirençli genotipler olan AG ve GG nin toplam frekansı üç yerli ırkta SA ırkından yüksektir.

4-) CD14, MBL1 (Ekzon 2; 2534 G>A) ve MBL1(Ekzon 2; 2651 G>A) genleri nin üçünde de dayanıklı genotiplerin frekansları yerli sığır ırklarında SA ırkına oranla daha fazladır. Dolayısıyla mevcut literatür dikkate alındığında yerli sığır ırklarının SA ırkına göre mastitise daha dirençli olduğu söylenebilir.

5-) ITGB6 reseptör (5’UTR bölgesi, 29G>A) geninde ARM-PCR işlemi sonucu belirlenen ve şap hastalığına daha dirençli olan AA genotipi, gerek SA ırkında gerek yerli ırklarımız olan YK, BI ve DAK ırklarında yaygın genotip olmuştur. Ayrıca tüm populasyonlar Hardy-Weinberg dengesindedir. Bu sonuçlar şap hastalığı için yapılacak MAS çalışmaları için ITGB6 reseptör (5’UTR bölgesi, 29G>A) geninin çok kullanışlı bir aday gen olduğunu göstermektedir. Bu gen dört sığır ırkında da şap için MAS programlarına dahil edilebilir. Bu gen bakımından dayanıklı genotip olan AA’nın frekansı B ve YK ırklarında SA ve DAK ırklarına göre daha yüksektir.

6-) ITGB6 reseptör genindeki bir diğer mutasyon (2145 T>C) için çalışılan dört ırkta dirençli genotip olan TT genotipi tespit edilememiştir. ITGB6 reseptör (2145 T>C) geni için SA, YK, B ve DAK sığır ırkları monomoftur (TC). Bu genin adı geçen sığır ırklarında MAS çalışmalarında kullanılması uygun değildir.

7-) SLC11A1 (5411 G>A) geninde tüberküloz hastalığına dirençli genotip olan GG genotipinin SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında yeterli düzeyde bulunduğu ve populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gösterilmiştir. Bu gen SA, YK, B ve DAK sığır ırklarında tüberküloz hastalığına direnç için MAS programlarına dahil edilebilir. Bu gen için direnç genotipi olan GG'nin frekansı SA ve DAK ırklarında benzerken B ve YK ırklarında bunlara göre daha düşüktür. SLC11A1 (7400G>A) geni için ise çalışılan sığır ırklarından YK, B ve DAK ırklarında direnç genotiplerinden GG tespit edilememiş SA ırkında ise frekansı çok düşük (0.05) bulunmuştur. Diğer direnç genotipi olan CG ise tüm sığır ırklarında tespit edilirken yerli ırklarda SA ırkına göre biraz daha yüksek bulunmuştur. SLC11A1 (7400G>A) geni için YK ve BI populasyonları Hardy-Weinberg dengesinde değildir. Çalışılan ırklarda bu gen için yeterli genetik varyasyonun olmadığı anlaşılmaktadır. SLC11A1 (7400G>A) geni SA ve DAK ırklarında MAS programlarına dahil edilebilir.

8-) Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan SA, YK, B ve DAK sığır ırklarında TLR2 geni için tüberküloz hastalığına direnç ile ilişkili AA genotipi bulunmuştur. AA genotipinin frekansı SA ırkında yerli sığır ırklarımızdan YK, BI ve DAK ırklarına göre daha yüksek olmakla birlikte MAS çalışmalarında kullanılabilecek düzeydedir. TLR2 geni SLC11A1 (5411 G>A) geninden sonra tüberküloz hastalığına direnç için MAS programlarında kullanılabilecek bir ikinci gen olarak düşünülebilir. SA ırkında TLR2 geni için tüberküloz hastalığına direnç genotipi olan AA'nın frekansı yerli sığır ırklarından yüksektir.

9-) Mastitis, şap ve tüberküloz hastalıklarına direnç ile ilişkili lokuslar üzerinden oluşturulan filogenetik ağaç çalışılan populasyonları genetik kökenlerine uygun olarak iki kümeye ayırmıştır. Birinci kümede SA ırkı yer alırken ikinci kümede yerli ırklarımız olan YK, B ve DAK sığır ırkları yer almıştır. Hastalıklara direnç lokuslarının ırkların genetik ayrımı için son derece uygun olduğu görülmektedir. Aynı genetik kökenden gelen ya da uzun süre aynı coğrafyayı paylaşan bireyler hastalıklara karşı benzer dirençleri geliştirmektedir. Mikrosatellit lokuslar ya da çok yeni nesil sekans analizlerine göre oluşturulan filogenetik analizler hat veya ekotip gibi alt seviyeler için daha ayrıntılı bilgiler sağlayabilir. Ancak bu yöntemler çok pahalı, daha fazla teknik altyapı ve iş gücü gerektirir. Sığırlarda ırk ayrımı için hastalıklara direnç lokusları, ekonomik ve hızlı oluşu, laboratuvar ve istatistik analizleri daha kolay olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Akman, N., Özkütük, K., Kumlu, S. ve Yener, S.M. 2005. Türkiye'de Sığır Yetiştiriciliği ve Sığır Yetiştiriciliğinin Geleceği. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, ss 741-764, 3-7 Ocak, Ankara
- Allen, A.R., Minozzi, G., Glass, E.J., Skuce, R.A., McDowell, S.W.J., Woolliams, J.A. and Bishop, S.C. 2010. Bovine tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility. *Proceedings of the Royal Society B*, 277(1695): 2737–2745.
- Anonim 1: FAO, FAOSTAT, Livestock Primary. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL> [Son Erişim Tarihi: 02.05.2018]
- Anonim 2: Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK), http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002, [Son erişim Tarihi: 30. 04. 2018]
- Anonim 3: Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK), <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> [Son Erişim Tarihi: 02. 05. 2018]
- Anonim 4: T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları, 2009, Ankara, <https://www.tarim.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Katalog%20T%C3%BCrk%C3%A7e.pdf> [Son Erişim Tarihi: 30. 04. 2018]
- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., AL-Farhan, A.H., AL-Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., Al-Sadoon, M., and Shobrak, M. 2010. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International J Molecular Science*, 11: 2079–2096.
- Bhaladhare, A., Sharma, D., Kumar, A., Sonwane, A., Chauhan, A., Singh, R., Kumar, P., Yadav, R., Baqir, M., Bhushan, B. and Prakash, O. 2016. Single nucleotide polymorphism in toll-like reseptor genes and case control association studies with bovine tuberculosis. *Veterinary Word*, 9: 458-464.
- Bukhari, S., Das, A.K., Kumar, N., Raghuwanshi, P., Taggar, R.K., Chakraborty, D., Kumar, D., Vohra. V. and Gupta, P. 2015. Genetic polymorphism of promoter region of lactoferrin gene and its association with mastitis resistance in Jersey crossbred cattle. *Indian Journal of Animal Research*, 49: 165-167.
- Ceccobelli, S., Karşlı, T., Dı Lorenzo, P., Marozzi, G., Landı, V., Sartı, F.M., Sabbioni, A. and Lasagna, E. 2015. Genetic diversity of Cornigliese sheep breed using STR markers. *Small Ruminant Research*, 123: 62–69.
- Darbaz, İ. ve Ergene, O. 2015. Sürü meme sağlığı yönetiminde somatik hücre sayısının önemi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12 (3): 203-210.
- Deb, R., Kumar, A., Chakraborty, S., Verma, A.K., Tiwari, R., Dhama, K., Singh, U. and Kumar, S. 2013. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: A review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16: 1653–1661.
- Dolatabady, M.M. 2014. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of bovine *Interleukin 8* gene and its association with milk production traits and

- somatic cell score of Holstein cattle in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*.12 (3): 36-41.
- Ekim, B. 2010. Türkiye yerli sığır ırklarında doğal dirençlilik ilişkili makrofaj protein 1 (NRAMP1)’ gen polimorfizminin araştırılması. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ANKARA, 66s.
- Ekim, B. 2010. Türkiye yerli sığır ırklarında doğal dirençlilik ilişkili makrofaj protein 1 (NRAMP1)’ gen polimorfizminin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 66s.
- Gen, M. and Ahmed, H.I., 2018. Amplification Refractory Mutation System (ARMS). <http://grcpk.com/wp-content/uploads/2014/10/7.-ARMS.pdf> [Son Erişim Tarihi: 02.05.2018]
- Ghanem, M.E., Akita, M., Suzuki, T., Kasuga, A. and Nishibori, M. 2008. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. *Animal Reproduction Science*, 103: 348-354.
- Hako-Touko, B.A. et al. 2013. The major histocompatibility complex b (MHC-B) and QTL microsatellite alleles of favorable effect on antibody response against the Newcastle disease. *International J Genetic Research*, 1 (1): 1-8.
- Hartl, D.L. and Clark, A.G. 1989. Principles of Population Genetics. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp.37
- Heringstad, B., Klemetsdal, G. and Ruane J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*, 64: 95–106.
- İssi, M., Kandemir, F.M., Başbuğ, O., Gül, Y. ve Özdemir, N. 2010. Şap Hastalıklı Besi Sığırlarında Salya ve Eritrosit Arginaz Aktiviteleri. *YYU Van Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(2): 91-93.
- Kadarmideen, H.N., Ali, A.A., Thomson, P.C., Müller, B. and Zinsstag J. 2011. Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Animal Genetics*, 42: 656–658
- Karlı, T. 2010. Türkiye koyun ırklarında BMPR-IB (Booroola) geninde Fecb allel varlığının PCR-RFLP yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 72s
- Karlı, T. 2015. Ankara tavukçuluk araştırma istasyonunda bulunan kahverengi yumurtacı saf hatlarda genetik varyasyonun mikrosatellit markerler kullanılarak belirlenmesi. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 138s.
- Karlı, T., Balcıoğlu, M.S. ve Alkan, S. 2008. Sığırlarda otozomal resesif kalıtım gösteren bazı genetik hastalıklar ve moleküler tanısı. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 18(1): 32-39
- Karlı, T., Karabağ, K. ve Balcıoğlu, M.S. 2013. Çiftlik hayvanlarında DNA teknolojileri ve biyoteknoloji kullanımı. İç Anadolu Bölgesi 1. Tarım ve Gıda Kongresi. Cilt III (Hayvansal Üretim), 46-52, 2-4 Ekim, Niğde.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. 2011. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 677s.

- Kul, E., Erdem, H. ve Atasever, S. 2006. Süt sığırlarında farklı meme özelliklerinin mastitis ve süt somatik hücre sayısı üzerine etkileri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (3): 350-356.
- Kumar, V., Gupta, I.D., Verma, A., Rajesh, Kumar, S. and Chaudhari, M.V. 2014. CD14 Gene Polymorphism Using Hinf I Restriction Enzyme and Its Association with Mastitis in Sahiwal Cattle. *Indian Journal of Animal Research*, 48 (1) : 11-13.
- Kumlu, S. 1999. Damızlık ve Kasaplık Sığır Yetiştirme. Setma Matbaacılık, Ders Kitabı, Ankara. ISBN: 975-96864-0-6. 166s.
- Liu, J., Ju, Z., Li, Q., Huang, J., Li, R., Li, J., Ma, L., Zhong, J. and Wang, C. 2011. Mannose-binding lectin 1 haplotypes influence serum MBL-A concentration, complement activity, and milk production traits in Chinese Holstein cattle. *Immunogenetics*, 63: 727-742.
- Liu, K., Zhang, B., Teng, Z., Wang, Z., Wang, Y., Dong, G., Xu, C., Qin, B., Song, C., Chai, J., Li, Y., Shi, X., Shu, X. and Zhang, Y. 2017. Association between SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Chinese Holstein cattle. *Tuberculosis*, 103: 10-15.
- Medrano, R.F.V. and Oliveira, C.A. 2014. Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR technique development. *Molecular Biotechnology*, 56: 599-608.
- Minvielle, F., Kayang, B.B., Inoue-Murayama, M., Miva, M., Vignal, A., Gourichon, D., Neau, A., Monvoisin, J.L. and Ito, S. 2005. Microsatellite mapping of QTL affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail. *BMC Genomics*, 6 (87):1-9
- Miller, S., Dykes, D., Plesky, H.A. 1988. Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215
- Mucha, R., Bhide M.R., Chakurkar E.B., Novak M., Mikula I. 2009. Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128: 381-388.
- Muhaghegh-Dolatabady, M. 2014. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of bovine Interleukin 8 gene and its association with milk production traits and somatic cell score of Holstein cattle in Iran. *Iran Journal of Biotechnology*, 12 (3): 1016.
- Mundan, D., Meral, B.A., Demir, A. Ve Doğaner, M. 2015. Süt sığırı işletmelerinde sütteki toplam bakteri ve somatik hücre sayısının ekonomik açıdan değerlendirilmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4 (2): 84-89.
- Mundhe, U.T., Das, D.N., Gandhi, R.S. and Soumya, N.P. 2016. Molecular characterisation of toll like receptors 2 gene and its association with somatic cell count in deoni cattle. *Journal of Cell and Tissue Research*, 16 (2): 5649-5654.
- Öner, Y. ve Elmacı, C. 2011. Sığırlarda BoLA-DRB3 Geni Polimorfizmi. *Hayvansal Üretim*, 52(1): 67-74.
- Özbey, G., Kalender, H ve Muz A. 2008. Sığır Tüberkülozu'nun Epidemiyolojisi ve Teşhisi. *Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22(5): 307-314.

- Özhan, M., Tüzemen, N. Ve Yanar, M. 2001. Büyükbaş Hayvan Yetiştirme. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Ders Kitabı, Erzurum, 604s.
- Özşensoy, Y., Kurar, E., Doğan, M., Bulut, Z., Nizamlioğlu, M., Işık, A., Çamlıdağ, A. and Altunok, V. 2014. Genetic characterization of Turkish cattle breeds by microsatellite markers: usefulness for parentage testing. *Kafkas Univerisitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20 (4): 521-526.
- Pal, A., Sharma, A., Bhattacharya, T.K., Chatterjee, P.N. and Chakravarty, A.K., 2011. Molecular characterization and SNP detection of CD14 gene of crossbred cattle. *Mol. Biology International*, 507346.
- Parajapati, B.M., Gupta, J.P., Pandey, D.P., Parmar, G.A. and Chaudhari, J.D. 2017. Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. *Veterinary Word*, 10: 112-120
- Rothchild, M.F. and Plastow, G.S. 2014. Applications of genomics to improve livestock in the developing world. *Livestock Science*, 166: 76-83
- Sadana T., Singh R.V., Singh S.V., Saxena V.K., Sharma D., Singh P.K., Kumar N., Gupta S., Chaubey K.K., Jayaraman S., Tiwari R., Dhama K., Bhatia A.s., Sohal J.S. 2015. Single nucleotide polymorphism of SLC11A1, CARD15, IFNG and TLR2 genes and their association with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in native Indian cattle population. *Indian Journal of Biotechnology*, 14: 469-475
- Savaşan, S. ve Kaya, O. 2004. Sığır mastitislerinde Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin filtrasyon-boyama yöntemi ile çabuk tanısı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 51: 29-34.
- Selvan, A.S., Gupta, I.D., Verma, A., Chaudhari, M.V. and Kumar V. Cluster of differentiation 14 gene polymorphism and its association with incidence of clinical mastitis in Karan fries cattle. *Veterinary World*, 7 (12): 1037-1040.
- Selvan, A.S., Gupta, I.D., Verma, A., Chaudhari, M.V. and Magotra A. 2016. Molecular characterization and combined genotype association study of bovine cluster of differentiation 14 gene with clinical mastitis in crossbred dairy cattle. *Veterinary World*, 9 (1): 680-684.
- Singh, R., Deb, R., Singh, U., Alex, R., Kumar, S., Chakraborti, S., Sharma, S., Sengar, G. and Singh, R. 2014a. Development of a tetra-primer ARMS PCR-based assay for detection of a novel single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the bovine ITGB6 receptor gene associated with foot-and-mouth disease susceptibility in cattle. *Archive of Virology*, 159: 3385–3389.
- Singh, R., Deb, R., Singh, U., Raja, T.V., Alex, R., Kumar, S., Chakraborti, S., Alyethodi, R.R., Sharma, S. and Sengar, G. 2015. Heterozygosity at the SNP (rs136500299) of ITGB6 receptor gene possibly influences the susceptibility among crossbred bull to foot and mouth disease infection. *Virus Disease*, 26 (1-2): 48–54.
- Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R.R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K. and Sharma, A. 2014b. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6: 49-58.

- Tadano, R., Nakamura, A. and Kino, K. 2012. Analysis of genetic divergence between closely related lines of chickens. *Poultry Science* 91: 327–333.
- Tanrıbuyurdu, E. 2014. Sığır mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında biofilm oluşumu ve antibiyotiklere dirençliliğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 47s.
- Turul, T. ve Ersoy, F. 2004. Dostu düşmanı ayıran bir doğal immünite bileşeni: tool like reseptörler. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35: 114-118.
- Wang, C., Liu, M., Li, Q., Ju, Z., Huang, J., Li, J., Wang, H. and Zhong, J. 2011. Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 139: 229–236.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1997. POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Yuan, Z., Li, J., Li, J., Gao, X. and Xu, S. 2013. SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene. *Molecular Biology Reports*, 40: 7–12.
- Zanetti, E., Marchi, D.E., Dalvit, C. and Cassandro, M. 2010. Genetic characterization of local Italian breeds of chickens undergoing in situ conservation. *Poultry Science*, 89: 420–427.

ÖZGEÇMİŞ

FERİT KARAYEL

feritkarayel@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2018	Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2008-2013	Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Mühendis	Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı
2014-Devam Ediyor	Söğüt İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Bilecik

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Karlı, T. ve Karayel, F. 2018. Detection of Polymorphism in ITGB6 Receptor Gene Associated with Foot-and-Mouth Disease of Raised Some Cattle Breeds in Turkey Using ARMS-PCR Method. International Agricultural Congress, 9-12 May 2018, Van, TURKEY