

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI
2014-YL-003**

**MASTİTİSE KARŞI DİRENÇ SAĞLAYAN
LACTOFERRİN GENİ BAKIMINDAN
POLİMORFİZMİN BAZI YERLİ
SIĞIRLARDA ARAŞTIRILMASI**

Semih SEVİM

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Orhan KARACA

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Zootekni Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Semih SEVİM tarafından hazırlanan “Mastitise Karşı Direnç Sağlayan Lactoferrin Geni Bakımından Polimorfizmin Bazı Yerli Sığırlarda Araştırılması” başlıklı tez, 09.01.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Cengiz ELMACI	UÜ
Üye : Prof. Dr. Orhan KARACA	ADÜ
Üye : Prof. Dr. İbrahim CEMAL	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla / /2014 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

09.01.2014

Semih SEVİM

ÖZET
MASTİTİSE KARŞI DİRENÇ SAĞLAYAN LACTOFERRİN
GENİ BAKIMINDAN POLİMORFİZMİN BAZI YERLİ
SIĞIRLARDA ARAŞTIRILMASI

Semih SEVİM

Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Orhan KARACA

2014, 46 sayfa

Bu çalışma, Aydın ilinde yetiştirilen yerli sığırlarda Lactoferrin gen polimorfizminin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. DNA, farklı lokasyonlarda yer alan 6 sürüde bulunan 100 bireyden alınan kan örneklerinden elde edilmiştir. Genotiplerin belirlenmesi için PCR-RFLP metodu kullanılmıştır. Sığır Lactoferrin genine ait 1050 bç'lik bölge PCR ile çoğaltılmış ve ardından *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutulmuştur. *HinfI* enzim kesimi sonucu 635, 480, 180, 120 bç'lik bantlardan oluşan bir karışım elde edilmiştir. Bu çalışmada, daha önce literatürde bahsedilmemiş farklı bant uzunluklarına sahip olan (480, 180 ve 120 bç) ve "C" olarak adlandırılan bir allel tanımlanmıştır. Çalışmada, gen frekansları A ve C allelleri için sırası ile 0.435 ve 0.565, genotip frekansları ise AA, AC ve CC genotipleri için sırası ile 0.17, 0.53 ve 0.30 olarak belirlenmiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda yaygın olarak gözlemlenen B alleli bu çalışmada gözlenmemiştir. Daha somut bilgilerin ortaya konabilmesi amacıyla bu gen bölgesinin DNA dizi analizinin yapılması faydalı olacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular literatüre önemli katkı sağlayacak düzeydedir.

Anahtar sözcükler: Yerli sığır, Lactoferrin geni, PCR-RFLP, *HinfI*

ABSTRACT
INVESTIGATION OF POLYMORPHISM IN SOME NATIVE
CATTLES FOR LACTOFERRIN GENE PROVIDING
RESISTANCE TO MASTITIS

Semih SEVİM

M.Sc. Thesis, Department of Animal Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Orhan KARACA

2014, 46 pages

This study was carried out to determine Lactoferrin gene polymorphism in Native cattle raised in Aydın province. DNA was extracted from 100 individual blood samples collected from cattle raised in 6 flocks at different locations. The PCR-RFLP methods were used to determine genotypes. A 1050 bp DNA fragment within bovine Lactoferrin gene was amplified with PCR and then digested with restriction endonuclease enzyme *Hinf*I. The *Hinf*I digestion produced a mixture containing of 635, 480, 180 and 120 bp. In this study we have detected a new allele as "C" with different fragments (480, 180 and 120 bp) which has not been observed in literature yet. In present study, A and C allele frequencies were identified with 0.435 and 0.565; AA, AC and CC genotype frequencies were identified with 0.17, 0.53 and 0.30, respectively. The B allele of Lactoferrin gene has not been observed. In order to reveal more concrete information, sequencing for the Lactoferrin gene may be useful. Results obtained from this study will provide a significant contribution to the literature.

Key words: Native cattle, Lactoferrin gene, PCR-RFLP, *Hinf*I

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğretim dönemim boyunca her konuda bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, birçok güncel yöntemlere ve çalışmalara yönelik bilgi dağarcığımın genişlemesine büyük katkı sağlayan, ne konuda olursa olsun her zaman büyük yardımını ve desteğini gördüğüm tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Orhan KARACA 'ya,

Tez yazımı ve laboratuvar çalışmalarıyla birlikte bütün Yüksek Lisans döneminde yanımda bulunan ve her zaman sonsuz yardımını gördüğüm, değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim CEMAL ve Öğr. Gör. Dr. Onur YILMAZ 'a,

Tez savunma jürisinde yer alarak değerli eleştirileriyle tezimin şekillenmesinde yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Cengiz ELMACI 'ya,

Laboratuvar çalışmaları boyunca sürekli yanımda olup eksiklikleri her zaman tamamlayıp yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Nezih ATA'ya,

Hayvanlardan kan örneklerinin alınmasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ziraat Mühendisleri Orkun Orhan BAYAR, Zekai ÇOBAN, Kenan ÇAKICI, Buğrahan OCAKLI ve Kemal CANAZ'a,

Ayrıca Yüksek Lisans eğitimim boyunca verdiği destek ve hoşgöründen dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK KURUL KARARI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Sığırlarda Mastitis	4
2.1.1. Mastitis Olgusu	4
2.1.2. Mastitise Neden Olan Faktörler	5
2.1.3. Mastitis ve Somatik Hücre Sayısı Arasındaki İlişki	5
2.1.4. Mastitis Genetiği	6
2.1.5. İskandinav Ülkelerindeki Mastitise Karşı Uygulanan Islah ve Seleksiyon Programları	8
2.2. Mastitise Karşı Direnç Genleri	10
2.2.1. Lizozim	10
2.2.2. Lactoferrin	11
2.2.3. Lactoferrinin Antibakteriyal Aktivitesi	12
2.2.4. Lactoferrinin Antiviral Aktivitesi	13
2.3. Lactoferrin Gen Polimorfizmini Belirlemek İçin PCR-RFLP Yöntemi İle Yapılmış Çalışmalar	14
3. MATERYAL VE METOT	17

3.1. Hayvan Materyali	17
3.2. Metot	18
3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası.....	19
3.2.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	19
3.2.3. PCR ile DNA Çoğaltımı.....	21
3.2.4. RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi).....	22
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
3.2.6. Lactoferrin Genotiplerine Yönelik Değerlendirmeler	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Lactoferrin Genotiplerine İlişkin Gözlemler	27
4.2. Lactoferrin Geni Bakımından Gen ve Genotip Frekansları.....	29
5. SONUÇ	37
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	45

KISALTMALAR

- bç : Baz çifti
- CK : Cengiz KUNDUZ
- DAK : Doğu Anadolu Kırmızısı
- DNA : Deoksiribonükleik asit
- EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit
- EK : Emin KIRLIOĞLU
- GAK : Güneydoğu Anadolu Kırmızısı
- kDA : Kilo Dalton
- LTF : Lactoferrin
- Mİ : Mutlu İNAN
- ND : Neşet DUMAN
- PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
- RE : Restriction Endonuclease (Restiriksiyon Endonükleaz)
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Kısıtlanmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
- SHS : Somatik Hücre Sayısı
- TA : Tuncay ASLAN
- TBE : Tris-Borate-EDTA
- YK : Yalçın KUNDUZ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Aydın İline Ait Yıllara Göre Büyükbaş Hayvan Sayıları	2
Şekil 2.1.Sığır Lactoferrin geninin üç boyutlu yapısı	12
Şekil 2.2. Lactoferrinin Gram (+) ve Gram(-) bakterilere karşı bakteriyostatik etkisi	13
Şekil 2.3. Lactoferinin anti viral etki mekanizması	14
Şekil 3.1.Çalışma materyalini oluşturan hayvanlar.....	18
Şekil 3.2. DNA bant büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA boy markörü.....	25
Şekil 3.3. UV ışığının altında safe view ile boyanmış agaroz jelin görüntüsü....	25
Şekil 4.1. Literatürde belirtilen bant uzunluklarına ait jel görüntüsü.....	27
Şekil 4.2. Çalışma için kullanılan sığırlardan bazılarının jelde oluşan LTF geni A ve C allelleri bakımından genotiplere ait görüntü	27
Şekil 4.3. Lactoferrin Gen Bölgesi.....	28
Şekil 4.4. Genel popülasyonunda LTF genotiplerinin oransal dağılımı.....	29
Şekil 4.5. Farklı bölgeden kan örnekleri toplanan Yerli Sığırlarda LTF geni bakımından genotiplerin oransal dağılımı	30
Şekil 4.6. LTF geni bakımından genotiplerin oransal dağılımı.....	31
Şekil 4.7.Yerli Sığırlar için farklı sürü veya bölgelerden alınan örnekler bakımından gözlenen allel frekanslarının dağılımı	33
Şekil 4.8. Örnekleme yapılan lokasyonlar arasındaki genetik uzaklığa göre çizilmiş dendogram.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye'de Yıllara Göre Sığır Varlığı	1
Çizelge 1.2. Türkiye'de yıllara göre sağılan hayvan sayıları ve üretilen süt miktarı	2
Çizelge 2.1 Bazı çalışmalardan elde edilen Mastitis Kalıtım Derecesi tahminleri.	7
Çizelge 2.2. Bazı çalışmalardan elde edilen Somatik Hücre Sayısı Kalıtım Derecesi tahminleri.	7
Çizelge 2.3. Bazı çalışmalardan elde edilen genetik korelasyon tahminleri	8
Çizelge 3.1. Sığırlara ait kan örneklerinin, sürülere göre dağılımı.	19
Çizelge 3.2. PCR karışımı bileşenlerinin hacim ve sonkonsantrasyonları	21
Çizelge 3.3. Genotiplerin belirlenmesinde kullanılan primerler ve baz dizilimleri.	22
Çizelge 3.4. Primerlere özgün DNA bölgelerinin çoğaltılabilmesi için gerekli olan ısı döngüleyici cihaz programı.	22
Çizelge 3.5. Lactoferrin geninin allellerinin ayrımı için uygulanan restriksiyon işleminin bileşenleri	23
Çizelge 4.1. LTF geni bakımından genotiplerin sayısal dağılımı ve gözlenen genotip frekansları	29
Çizelge 4.2. Farklı yerlerden kan örnekleri toplanan Yerli Sığırlarda LTF geni bakımından genotiplerin dağılımı ve gözlenen genotip frekansları.	30
Çizelge 4.3. LTF geni bakımından genotiplerin sayısal dağılımı ve gözlenen frekanasları	32
Çizelge 4.4. Yerli Sığır için örnekleme yapılan sürü veya lokasyonlar bakımından yapılan değerlendirme ile elde edilen allel frekansları.....	32
Çizelge 4.5. LTF geni bakımından sığır genotiplerine ait gözlenen ve beklenen sayılar ile ki-kare (χ^2) analiz sonuçları.....	34

Çizelge 4.6. Sürüler arası genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri	34
Çizelge 4.7. Örnekleme yapılan lokasyonlar arası genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri	35
Çizelge 4.8. Bazı sığır popülasyonlarında LTF genine ait allel frekansları	36

1. GİRİŞ

Türkiye'de büyükbaş hayvan yetiştiriciliğinin en yoğun faaliyet alanını süt üretimi oluşturmaktadır. Ülkemizde 2002 yılında 9.8 milyon baş olan sığır sayısı % 41 oranında artarak 2012 yılında 13.9 milyon başa yükselmiştir (TÜİK, 2012). Yine TÜİK (Çizelge 1.1) verilerine göre, 2002 yılında 3.58 milyon baş olan Yerli sığır varlığı 10 yıllık süreçte %32 azalarak 2.45 milyon başa gerilemiştir. (TÜİK, 2012). Yıllara göre Türkiye'de ki Sığır sayılarının değişimi Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1.Türkiye'de Yıllara Göre Sığır Varlığı

Yıl	Kültür	Melez	Yerli	Toplam
2002	1.859.786	4.357.549	3.586.163	9.803.498
2003	1.940.506	4.284.890	3.562.706	9.788.102
2004	2.109.393	4.395.090	3.564.863	10.069.346
2005	2.354.957	4.537.998	3.633.485	10.526.440
2006	2.771.818	4.694.197	3.405.349	10.871.364
2007	3.295.678	4.465.350	3.275.725	11.036.753
2008	3.554.585	4.454.647	2.850.710	10.859.942
2009	3.723.583	4.406.041	2.594.334	10.723.958
2010	4.197.890	4.707.188	2.464.722	11.369.800
2011	4.836.547	5.120.621	2.429.169	12.386.337
2012	5.679.484	5.776.028	2.459.400	13.914.912

Türkiye'de süt üretiminin yaklaşık %90'i süt sığırlarından elde edilmektedir. Geriye kalan %10'luk üretimin ise koyun, keçi ve diğer hayvan türlerinden sağlandığı belirtilmektedir (TÜİK, 2012).

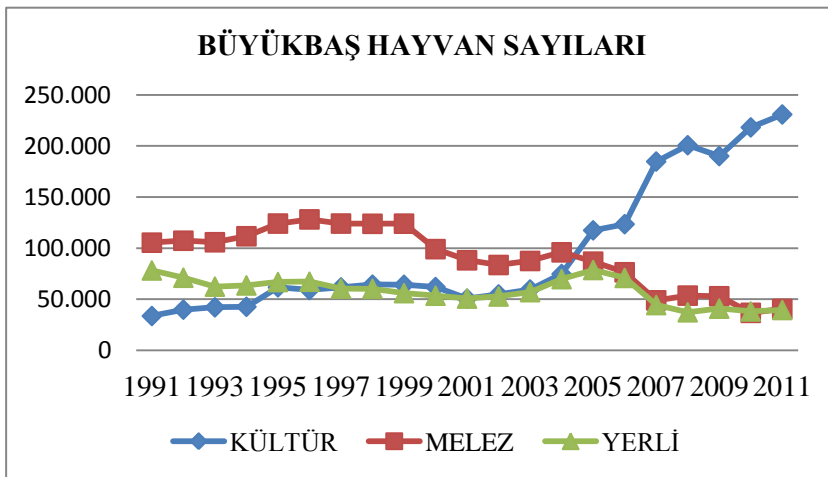
Sığırcılıktan elde edilen gelirlerin büyük bölümünü süt üretimi oluşturmaktadır. Özellikle entansif tarımın uygulandığı ülkelerde ıslah programlarının temel hedefi döl verimi, süt verimi ve kalitesinin arttırılmasıdır. Bu nedenle, entansif tarımın yaygınlaşması ile yerli ırklar ve geleneksel üretim sistemleri ile karlı bir sığırcılık faaliyetinin gerçekleştirilmesi olanaklı değildir. Nitekim Yerli ırklarımızın verim potansiyellerinin kültür ırkı ve kültür ırkı melezi popülasyonlara göre

düşük olması yerli ırkların sayısal azalışının en büyük nedenleri arasında sayılabilir. Ülkemizde yıllara göre sağmal hayvan sayısı ve üretilen süt miktarları Çizelge 1.2 'de verilmiştir (TÜİK, 2012).

Çizelge 1.2. Türkiye’de yıllara göre sağılan hayvan sayıları ve üretilen süt miktarı

Yıl	Sağılan hayvan sayısı (baş)	Süt üretim miktarı (ton)	Sağılan Hayvan Başına Ortalama Süt Üretim Miktarı (Kg)
2002	4.392.568	7.490.634	1.705
2003	5.040.362	9.514.138	1.888
2004	3.875.722	9.609.326	2.479
2005	3.998.097	10.026.202	2.508
2006	4.187.931	10.867.302	2.595
2007	4.229.440	11.279.340	2.667
2008	4.080.243	11.255.176	2.758
2009	4.133.148	11.583.313	2.803
2010	4.384.130	12.418.544	2.847
2011	4.761.142	13.802.428	2.899
2012	5.431.400	15.977.838	2.942

Aydın iline ait yıllara göre Büyükbaş hayvan sayıları Şekil 1.1' de verilmiştir.



Şekil 1.1. Aydın İline Ait Yıllara Göre Büyükbaş Hayvan Sayıları

Aydın ilinde 1991 yılında 33.614 baş olan kültür ırkı sığır sayısı 20 yıllık süreçte %687 artarak 2011 yılında 230.953 başa yükselmiştir. Yine 1991 yılında 78.210 baş olan yerli sığır sayısı 20 yıllık süreçte yaklaşık olarak %51 azalarak 39.500 başa gerilemiştir (TÜİK, 2012). Yerli sığırlardaki bu denli düşüşün nedeni; kültür ırklarıyla et ve süt verimleri bakımından yarışamamaları, entansif tarımın yaygınlaşması sonucu geleneksel üretim sistemlerinin karlı bir hayvancılık faaliyetini gerçekleştirememesinden kaynaklanmaktadır

Mastitis, ineklerde sütün miktarını düşüren, meme bezlerinde mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen, iltihaplı bir meme hastalığı olup halk arasında meme yangısı olarak bilinmektedir. Ülkemizde ineklerde mastitis görülme oranının %30 civarında olduğu ve mastitis nedeniyle süt veriminde yaklaşık %10 oranında azalma meydana geldiği, bunun sonucunda da yıllık ekonomik kaybın milyonlarla ifade edilebileceği bildirilmektedir (Sabuncuoğlu vd., 2003). Lactoferrin geni mastitise karşı direnç gösteren aday genlerden biridir. Lactoferrin sığır genomunda 22.kromozomda bulunan gendir ve her biri birer demir iyonu bağlama özelliğine sahip iki tane globüler lobdan oluşan tek zincirli bir glikoproteindir (Schwerin vd., 1994).

Sığır genomunda Lactoferrin genine yönelik ilk tanımlama Seyfert ve Kühn (1994) tarafından yapılmıştır. PCR-RFLP yöntemine dayalı çalışma sonucunda Holstein-Friesian ırkında Lactoferrin geninin iki farklı alleli (A ve B) saptanmıştır. Daha sonra diğer sığır popülasyonlarında yapılan çalışmalarda da bu allellerin varlığı tespit edilmiştir (Wojdak vd., 2006; Jemmali vd., 2011; Anggraeni vd., 2012; Nanaei vd., 2012; Gürsel vd., 2012). Ancak, bugüne kadar ülkemizdeki sığır ırklarında bu gene yönelik sadece tek bir tanımlama bilgisi haricinde (Gürsel vd., 2012) başka literatüre rastlanmamıştır

Bu çalışma, Aydın'da yetiştirilen yerli sığırlarda Lactoferrin gen polimorfizminin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması amacıyla yapılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sığırlarda Mastitis

2.1.1. Mastitis Olgusu

Meme dokusunun süt yapan bezlerinin, sütün depolanmasını ve dışarı çıkmasını sağlayan kanal ve boşluklarının sebebi ne olursa olsun bütün hastalıklarına mastitis denir. Mastitis meme yangısı yani meme bezinin iltihaplanması olarak bilinmektedir. Memedeki iltihaplanma patojenik mikroorganizmaların meme içine girmesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bütün memeli türlerinde görülse de ekonomik olarak önemli olan çiftlik hayvanlarında özellikle de süt sığırları gibi bol süt veren hayvanlarda büyük önem taşımaktadır (Deveci vd., 1994).

Türkiye’de 2010 yılı verilerine göre yıllık 12.4 milyon ton süt üretilmekte ve bunun %91,69’lık kısmı ineklerden elde edilmektedir (TÜİK, 2010). Günümüzde üretilen süt miktarı kadar süt kalitesi de önem arz etmektedir. Kaliteli sütün ancak sağlıklı hayvanlardan elde edilebileceği yadsınamayacak bir gerçektir. Ülkemizdeki süt sığırlarının % 30’unda mastitis olgusunun gözlemlendiği ve mastitis nedeniyle süt veriminde yaklaşık % 10 civarında azalma meydana geldiği bilinmektedir (Sabuncuoğlu vd., 2003).

Mastitis *Staphylococcus aureus*, *Streptococci spp.* ve *Koliform* türü bakterilerin ortaya çıkardığı bir hastalıktır. Bu bakteriler son derece karmaşık bir hastalık olan mastitisin şekillenmesinde en temel faktörlerdir. Hastalığın ortaya çıkması ile birlikte meme dokusunda çok sayıda fizyolojik değişiklik ve tepkiler gözlemlenebilmektedir (Harmon, 1994). Patojenler *Staphylococcus aureus* gibi bulaşıcı ya da *Escherichia coli* gibi çevresel kaynaklı olabilir. Bulaşıcı patojenlerin yayılması genellikle sağım işlemi sırasında enfeksiyonlu hayvanlarda kullanılan sağım ekipmanları veya dezenfeksiyon kurallarına uymayan sağıcılar yoluyla gerçekleşmektedir. Çevresel kaynaklı patojenler ise yaygın olarak barınak

hijyeni tam olarak sağlanmamış barınaklarda bulunan yataklık, toprak ve gübre gibi ortamlarda bulunmaktadır (Carlen, 2008).

Mastitis, enfeksiyonun şiddetine ve süresine bağlı olarak klinik ve subklinik olarak ikiye ayrılır. Subklinik mastitis, klinik mastitise oranla daha sessiz seyrederek süt üretiminde azalma ile kendini gösterir. Subklinik mastitis ancak süt bileşiminde ki bakteri konsantrasyonu ve sütte bulunan somatik hücrelerin sayımı ile belirlenebilir. Klinik mastitiste ise hastalık sütte renk değişikliği, pıhtı ve şişkin meme yapısı gibi somut bulgularla kendini göstermektedir (Carlen, 2008).

2.1.2. Mastitise Neden Olan Faktörler

Sürü içerisinde mastitis görülme sıklığı, hayvanları çevreleyen ortamda bulunan etken patojenler ve hayvanın hastalığa direnç yeteneği ile bağlantılıdır. Bunun yanı sıra; sağım yöntemi, sağım ekipmanlarının hijyeni, koruyucu sağlık önlemleri, barınak ve yem hijyeni, ırk, yaş, laktasyon dönemi, yetiştirme sistemi ve mevsim mastitisin görülme sıklığını etkileyen en önemli faktörler arasındadır (Barkema vd., 1998; Hagnestam vd., 2007; Nyman, 2007; Carlen, 2008).

2.1.3. Mastitis ve Somatik Hücre Sayısı Arasındaki İlişki

Süt içerisinde bulunan somatik hücreler meme bezini bulaşıcı hastalıklara karşı korumada rol üstlenir. Meme bezlerinde yeterli korumanın gerçekleşmediği durumlarda hızlı bir şekilde bakteri üremesi ve bunun sonucunda da bakteriler tarafından meme dokusu için olumsuz etki yaratacak toksinlerin artışı söz konusudur (Kehrli ve Shuster, 1994).

Sağlıklı bir memedeki süt en az 100.000 adet/ml somatik hücre içermektedir. Bu hücrelerin büyük çoğunluğunu lenfosit ve makrofajlar oluşturmaktadır. Enfekte bir memedeki süt ise 1.000.000 adet/ml'nin üzerinde somatik hücre içermektedir. Bu tip sütlerdeki somatik hücrelerin ağırlıklı olarak nötrofil içerdiği bildirilmektedir (Kehrli ve Shuster, 1994). Somatik hücre sayısı genellikle subklinik mastitisin teşhisinde kullanılmaktadır.

Sütte ≥ 200.000 adet/ml civarındaki somatik hücre sayıları meme içi enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilmekte hayvanda mastitisten şüphelenilmektedir (Schepers, 1997; Carlen, 2008).

2.1.4. Mastitis Genetiği

Çiftlik hayvanlarında verim özellikleri kantitatif kalıtım göstermektedir. Bu özellikler çok sayıda gen tarafından etkilenmekle (poligenik) birlikte çevresel etmenlerden de önemli düzeyde etkilenmektedirler. Mastitis kontrol programları, genellikle çevre önlemleri ve sürü yönetimindeki iyileştirmelerle, hastalığın görülme sıklığını azaltmaya odaklanmıştır.

Genetik parametreler, hayvan ıslahı ve hayvan yetiştiriciliği için son derece önemlidir. Üstün damızlık bireylerin seçilmesinde ve damızlık değeri tahmininde kullanılmaktadır. Ancak bu parametreler, popülasyona özeldir ve zamanla değişebilir. Bu nedenle düzenli olarak yeniden tahmin edilmelidirler (Carlen, 2008). Kalıtım derecesi, popülasyonda bir özelliğe ait mevcut eklemeli genetik varyasyonun fenotipik varyasyondaki payı ile ifade edilmektedir.

Kalıtım derecesi, bir popülasyonda ilgili özellik bakımından iyileştirme yapmak için nasıl bir yol izleneceği konusunda bize fikir vermektedir. Kalıtım derecesi, fenotipik ve genetik korelasyonlar gibi parametreler bir özelliğin ya da özelliklerin genetik bileşenini ölçmede kullanılır. Bu parametreler akrabalar arasındaki korelasyonlar ile fenotipik verilerden tahmin edilmektedir (Rupp ve Didier, 2003).

Yapılan çalışmalarda mastitisin kalıtım derecesinin 0,012 ile 0,08 arasında değiştiği bildirilmiştir (Rupp ve Boichard, 1999; Carlen, 2004; Heringstad vd., 2005; Koivula vd., 2005; Van Dorp vd., 1998). Nispeten düşük kalıtım derecesine sahip mastitis için gerçekleştirilecek genetik seleksiyon programlarında doğrudan veya dolaylı seleksiyon kombinasyonunun kullanılması ile daha başarılı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir (Shook, 1989; Carlen, 2008).

Mastitise ilişkin çeşitli çalışmalardan elde edilen kalıtım dereceleri Çizelge 2.1’de, somatik hücre sayısına ait kalıtım dereceleri Çizelge 2.2’de ve genetik korelasyon tahminleri ise Çizelge 2.3’te verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı çalışmalardan elde edilen Mastitis Kalıtım Derecesi tahminleri

Özellik	Kalıtım Derecesi	Populasyon	Referans
Mastitis	0,08	Norveç Sığırı	Heringstad vd., 2005
Mastitis (1. Lak.)	0,03	İsveç Sığırı	Carlen vd., 2004
Mastitis (2. Lak.)	0,012	İsveç Sığırı	Carlen vd., 2004
Mastitis (3.Lak.)	0,012	İsveç Sığırı	Carlen vd., 2004
Mastitis	0,024	Fransız Holstein	Rupp ve Boichard, 1999
Mastitis	0,02	Ayrshire	Koivula vd., 2005
Mastitis	0,04	Siyah Alaca	Van Dorp vd., 1998

Çizelge 2.2. Bazı çalışmalardan elde edilen Somatik Hücre Sayısı Kalıtım Derecesi tahminleri

Kalıtım Derecesi	Populasyon	Referans
0,14	*	Carlen vd., 2004
0,17	Fransız Holstein	Rupp ve Boichard., 1999
0,14(1. Lak.), 0,16(2. Lak.)	Kanada sığırları	Boettcher vd.,1998
0,09(1. Lak.) 0,09(2.Lak)	Ontorio Sığırları	Reents vd.,1995

Çizelge 2.3. Bazı çalışmalardan elde edilen Genetik Korelasyon tahminleri

Özellik	Genetik Korelasyon	Populasyon	Referans
Klinik Mastitis-305 günlük Protein Verimi	0,43	Norveç Sığırı	Heringstad vd., 2005
Klinik Mastitis (1. Lak.)- SHS	0,68	İsveç Sığırı	Carlen vd., 2004
Klinik Mastitis-SHS	0,72	Fransız Holstein	Rupp ve Boichard, 1999
Klinik Mastitis-Süt verimi	0,38-0,56	Ayrshire	Koivula vd., 2005
Klinik Mastitis-305 günlük Süt Verimi	0,15	Holstein	Van Dorp vd., 1998

2.1.5. İskandinav Ülkelerindeki Masitise Karşı Uygulanan İslah ve Seleksiyon Programları

Heringstad vd. (2000)'nin Lindhé (1995)'e atfen bildirdiğine göre İskandinav ülkelerindeki damızlık süt sığırı yetiştiriciliğindeki ıslah hedefleri sağlık ve döl verimi gibi düşük kalıtım derecesine sahip fonksiyonel özellikleri kapsamakta ve boğaların çok sayıda kızlarına dayalı olarak döl testine tabi tutulmasına dayanmaktadır. Örneğin yapay tohumlama boğalarının kızlarının ortalama grup büyüklükleri 1992 yılında Danimarka için 90, Finlandiya için 220, Norveç için 250 ve İsveç için ise 140 olarak bildirilmiştir. Bu ülkelerde süt verimi ve sağlığa yönelik kayıt sistemine yetiştirici katılımı yüksektir. Örneğin 1996 yılında Norveç'te bulunan süt sığırlarının %90 'ı süt kayıt sistemi içerisinde yer almaktadır. Kuzey ülkelerinde kayıt altında olan süt sığırlarının ortalama % 45 'i genç boğalar kullanılarak tohumlanmaktadır. Bu yüzden, süt sığırı popülasyonunun büyük çoğunluğu ıslah programlarında aktiftir. Bunun bir sonucu olarak, bu ülkelerde her yıl kırmızı ırklara ait nispeten çok sayıda genç boğa büyük sayıda kızlarına dayalı olarak döl kontrolüne tabi tutulmaktadır (Heringstad vd., 2000).

Kuzey ülkelerindeki yetiştiricilik sistemlerinin diğer bir özelliği ise yetiştiriciler tarafından sahiplenilen sığır yetiştiriciliği ile ilgili kooperatif organizasyonlarının olması ve böylece sığır yetiştiriciliğine uzun vadeli bakılarak ıslah hedefleri gerçekleştirilmesidir (Heringstad vd., 2000).

Danimarka, Finlandiya, Norveç ve İsveç gibi İskandinav ülkelerinde hem mastitis hem de somatik hücre sayısı ile ilgili bilgilerin kayıt altına alınması, mastitis direncinde farklı yaklaşımlar için kullanılmaktadır. Norveç' de boğaların kızlarından oluşan gruplar sadece mastitis ve mastitis direncinin gelişimi hakkında bilgi içermektedir. Danimarka mastitis için damızlık değer tahmininde ek kaynak olarak somatik hücre sayısını kullanırken, Finlandiya ve İsveç 'de hem mastitis hemde somatik hücre sayısı ıslah hedefi için kullanılmaktadır (Heringstad vd., 2000).

Yetiştiricilikte sadece mastitis bilgisi kullanıldığında, mastitis direncini geliştirmek için tüm biyolojik süreçlerin bileşkesi seçilmelidir. Somatik hücre sayısının yüksek değeri hastalıklı meme için bir gösterge iken düşük bir değer ise mutlaka sağlıklı memenin bir göstergesi olmamaktadır. Islah programlarında mastitis ve somatik hücre sayılarına ait düşük seviyeler arasındaki ilişkinin doğrusallığı hakkında kapsamlı bir inceleme yapıldıktan sonra somatik hücre sayısına güvenildiği bildirilmektedir (Heringstad vd., 2000).

Mastitise karşı direnç, klinik mastitis kayıtları kullanılarak doğrudan seleksiyon ile, genetik olarak mastitis ilişki dolaylı özellikler aracılığıyla veya her ikisinin kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. En sık kullanılan dolaylı seleksiyon ölçütleri somatik hücre sayısı ve tip özellikleri yanı sıra memeden süt sızıntısı ve sağım hızı olmuştur (Harmon, 1994).

Doğrudan seleksiyonda en yaygın yaklaşım genetik değerlendirmede mastitis verilerini kullanarak mastitisi var-yok şeklinde düşünüp verilerin normal dağılışı sergilediği kabul edilip lineer modellere uygulamak olduğu

bildirilmiştir. Eşikli model doğrudan seleksiyon için alternatiftir ve verilerin ikili doğası dikkate alınarak varyans bileşeni ve ıslah tahmini için avantaj olabilmektedir (Heringstad vd., 2000).

Mastitisin kalıtımı İskandinav sağlık kayıt sistemlerindeki verilere dayalı olan çeşitli çalışmalardan tahmin edilmiştir. Geleneksel doğrusal yöntemlerle yapılan kalıtım derecesi tahminlerinde gözlemlenebilir ölçek aralığı 0,001 ile 0,06 arasındadır. Kalıtım derecesinin eşikli karakterlerle yapılan tahminleri ise 0,06 ile 0,12 arasında değişmektedir. Seleksiyonda başarı eklemeli genetik standart sapma ile seleksiyon isabet ve yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Düşük kalıtım derecesine rağmen, özellikle yavru grubu sayısı yüksek olduğunda seleksiyonda isabet ve dolayısıyla potansiyel genetik ilerleme hayli yüksek olabilir (Heringstad vd., 2000).

Somatik hücre sayısına bağlı dolaylı seleksiyonun verimliği de boğanın yavru grubunun büyüklüğü ile ilintilidir. Heringstad vd. (2000)'nin Interbull (1996)'ya atfen bildirdiğine göre Danimarka'da mastitise yönelik damızlık değer tahmin isabetini artırmak için somatik hücre sayısı da ilave bilgi kaynağı olarak çoklu özellik modeline dahil edilmektedir. Yine Heringstad vd. (2000) tarafından değişik kaynaklardan (Eriksson, 1991; Interbull, 1996; Pösö ve Mäntysaari, 1996) bildirdiğine göre Finlandiya ve İsveç'te hem somatik hücre sayısı hem de mastitis için tek özellik bakımından değerlendirme yapılmakta ve sonrasında her ikisi ağırlıklarına göre boğa toplam değer indeksine katılmaktadır.

2.2. Mastitise Karşı Direnç Genleri

2.2.1. Lizozim

Lizozim, bakterilerin hücre duvarını parçalamak suretiyle bakteri hücrelerinin eriyip dağılmasına sebep olur ve bakteriyel enfeksiyon riskini azaltır. Lizozimler kandan üretilirler. Enfeksiyona yatkın memedeki sütte lizozim seviyesinin düşük olduğunu çalışmalar göstermektedir (Rahmani,

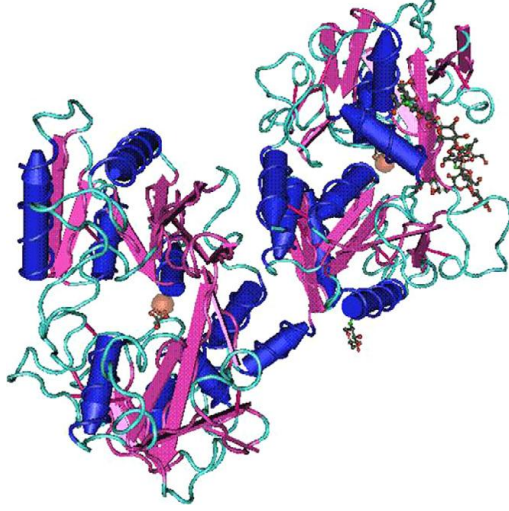
2011). Bu proteinin enfekte olmamış inek sütünde konsantrasyonunu 0,13 mg/100 ml civarındadır. Ancak, enfeksiyon sırasında bu konsantrasyon artar.

2.2.2. Lactoferrin

Lactoferrin, transferrin gen ailesinin demir bağlayan tek zincirli ve 708 amino asitten oluşan bir glikoproteinidir. Demir taşınmasının yanında anti inflamatuvar, antifungal ve antibakteriyel özelliği nedeniyle hayvancılık açısından önemlidir. İlk olarak sığır sütünden 1939 yılında izole edilen Lactoferrin gözyaşı, safra ve tükürük gibi vücut sıvılarında da bulunmaktadır (Avcı, 2007).

Lactoferrin, meme bezi savunma mekanizmasında önemli bir role sahiptir. Sığır Lactoferrin geni mastite karşı direnç açısından süt sığırları için potansiyel bir gendir (Avcı, 2007). Süt içerisinde bulunan Lactoferrin tarafından özellikle meme epitel hücreleri ve nötrofiller salgılanır (Gürsel vd., 2012).

Sağlıklı ineklerin sütünde 0,02-0,2 mg/ml arasında değişen bir düzeyde bulunan Lactoferrin konsantrasyonunun sub-klinik ve klinik mastitis bulgularında 100 kat artışı bildirilmiştir (Kutilla vd., 2003 ; Gürsel vd., 2012). Sığırlarda 22. kromozom ve 17. eksonda bulunan Lactoferrin geni yaklaşık 80 kDa'luk bir molekül ağırlığına sahiptir (Schwerin vd., 1994).

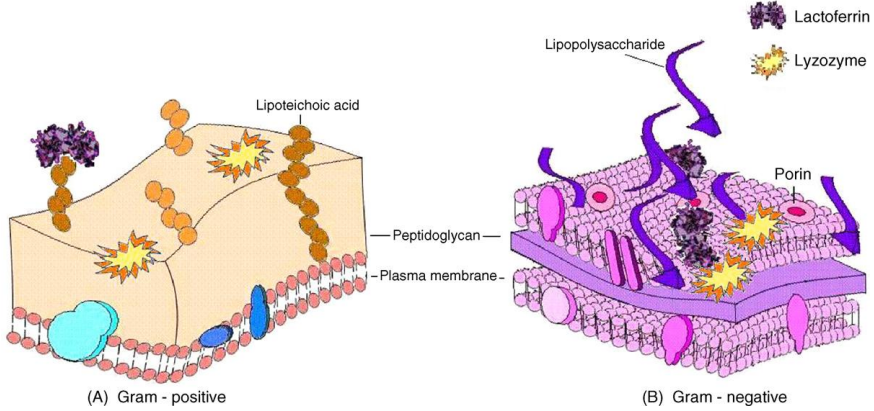


Şekil 2.1.Sığır Lactoferrin geninin üç boyutlu yapısı

2.2.3. Lactoferrinin Antibakteriyal Aktivitesi

Lactoferrin, inek süt ve kolostrumunda bulunan anti mikrobiyal yapıların en baskınıdır. Lactoferrinin savunma sistemindeki rolü iki temel biyokimyasal özelliğinden kaynaklanır. Bunlar son derece güçlü demir bağlama kapasitesi ve diğer moleküllerin yüzeylerine kuvvetlice bağlanabilmesi olarak ifade edilebilir.

Lactoferrin, Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı bakteriyostatik etkiye sahiptir. Lactoferrinin bakteriyostatik aktivitesi iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki bakteriler tarafından demirin kullanılmasını engellemesi diğeri ise Gram (-) bakterilerin dış membranlarından lipopolisakkarit salgınmasına neden olmasıdır (Chavez vd., 2009; Avcı, 2007).



Şekil 2.2. Lactoferrinin Gram (+) ve Gram(-) bakterilere karşı bakteriyostatik etkisi

Bütün patojen mikroorganizmalar büyümeleri için diğer zorunlu elementler gibi demir elementine ihtiyaç duyarlar. Lactoferrin bu zorunlu demir elementini ortamdaki uzaklaştırır ve bakterilerin çoğalmalarını baskılamış olur (Baveye ve ark, 1999). Ortamdaki serbest demiri bağlamak için sideroforlarla yarışarak bakterilerin büyümesini engeller (Avcı, 2007).

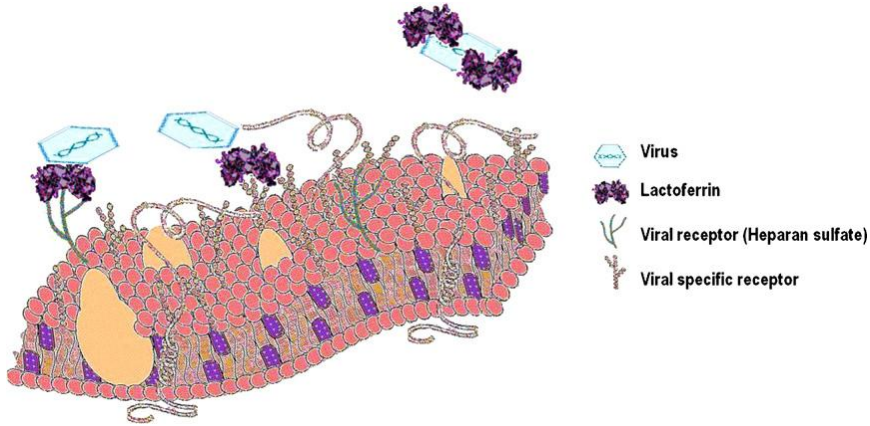
2.2.4. Lactoferrinin Antiviral Aktivitesi

Lactoferrin birçok virüsü doğrudan ya da dolaylı olarak etkisiz kılarken bu etkisini viral reseptörlere bağlanarak gerçekleştirmektedir. Lactoferrin dolaylı olarak viral saldırıya karşı sistemik immün cevabı artırıp virüslerin inaktivasyonuna neden olur ve virüsün sağlıklı hücreleri enfekte etmesini engeller.

Lactoferrin; herpes simpleks, rota virüs, hepatitis C ve insan immün yetmezlik virüsünü de (HIV) içeren çoğu virüsün replikasyonunu engelleyebilmektedir. Bu etkisini fagositler, lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerle direk etkileşimler yoluyla ve viral proteinleri bloke ederek gerçekleştirmektedir (Avcı, 2007).

Lactoferrinin antiviral etkisini tanımlamak için birçok farklı mekanizma önerilmiştir. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kabul edilen hipotez, Lactoferrinin özellikle viral reseptör olan heparan sülfata bağlanıp

glikozaminoglikanı bloke etmesidir. Bağlanan Lactoferrin ve heparan sülfat, virüs ile konak hücre arasındaki ilk teması engelleyip enfeksiyonu önler (Chavez vd., 2009).



Şekil 2.3. Lactoferrinin anti viral etki mekanizması

2.3. Lactoferrin Gen Polimorfizmini Belirlemek İçin PCR-RFLP Yöntemi İle Yapılmış Çalışmalar

Sharifzadeh ve Doosti (2011), yaptıkları çalışmada İran'da yetiştirilen 120 baş Holstein-Friesian ırkında *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu A ve B allel frekanslarını sırası ile %67,74 ve %32,26 olarak; AA, AB ve BB genotip frekansları için ise sırası ile %32,50, %57,50 ve %10 olarak bildirmişlerdir.

Wojdak vd. (2006), Polonya'da yetiştirilen 124 baş Holstein-Friesian ırkında Lactoferrin polimorfizmini araştırdıkları çalışmada *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu gözlemlenen A ve B allel frekanslarını sırası ile %67,74 ve %32,26 olarak AA, AB ve BB genotip frekansları için ise sırası ile %37,90, %59,68 ve %2,42 olarak bildirmişlerdir.

Jemmali vd. (2011), Lactoferrin gen polimorfizminin ortaya konması amacıyla 52 baş Holstein-Friesian ırkında gerçekleştirdikleri çalışmada

HinfI restriksiyon enzimini kullanarak yapılan kesim sonucu sadece A allelinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Zhao vd. (2008), Holstein-Friesian ırkından 120 baş hayvanı iki grup oluşturmuştur. Bu gruplardan ilki sağlıklı hayvanlardan oluşurken (n=60) diğer grup ise (n=60) hastalığı taşıyan hayvanlardan oluşmuştur. PCR-RFLP yöntemi ile Lactoferrin geni promotörünün araştırıldığı bu çalışmada *HinfI* enzimi ile gerçekleştirilen kesim sonucunda A ve B olmak üzere iki allel gözlemlenmiştir. Gözlemlenen A ve B allellerinin frekansları kontrol grubu için sırası ile %78 ve %22 deney grubunda ise sırası ile %17 ve %83 olarak bildirilmiştir. AA, AB ve BB genotiplerinin frekansları kontrol grubunda sırası ile %50, %40 ve %10 deney grubunda ise %15, %23 ve %62 olarak belirlenmiştir.

Anggraeni vd. (2012) tarafından Endonezya'nın farklı bölgelerinde yetiştirilen Holstein-Friesian (89 ♀), Limousin (14 ♂), Angus (5 ♂), Simmental (13 ♂) ve Brahman (5♂) ırklarında toplam 126 baş hayvanda gerçekleştirilen çalışmada *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu A ve B allellerinin gözlemlendiği bildirilmiştir. A ve B allellerinin frekansları Holstein-Friesian ırkında %77 ve %23 Limousin ırkında %79 ve %21, Angus ırkında %50 ve %50, Simmental ırkında %62 ve %38, Brahman ırkında ise %80 ve %20 olarak bildirilmiştir.

Nanaei vd. (2012), 404 baş Holstein-Friesian ırkı hayvanda yaptıkları çalışmada *EcoRI* enzimi ile kesim sonucunda A ve B olmak üzere iki allel belirlemişlerdir. A ve B allellerine ait frekans değerleri sırası ile %80 ve %20 olarak bulunmuştur. Çalışmada AA ve AB genotipleri gözlemlenmesine rağmen BB genotipine rastlanmamıştır. Gözlemlenen AA ve AB genotip frekansları sırası ile %61 ve %39 olmuştur.

Gürsel vd. (2012), Türkiye'de yetiştirilen Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK, 46 baş) ve Güney Anadolu Kırmızısında (GAK, 46 baş) Lactoferrin gen polimorfizmini araştırmışlardır. Çalışmada *EcoRI* enzimi ile kesim sonrasında AA, AB ve BB genotiplerinin gözlemlendiği bildirilmiştir. AA, AB ve BB genotiplerinin frekansları GAK popülasyonunda sırası ile

%23,9, %45,6 ve %30,4; DAK popülasyonunda ise %39,1, 0.47,8 ve %13 olarak elde edilmiştir.

Mastitise karşı direnç sağlayan Lactoferrin geni bakımından yapılan çalışmalar genel olarak irdelendiğinde; ağırlıklı olarak genotipleme üzerine yapıldıkları dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmaların hepsinde A ve B olmak üzere 2 allel ve bunun sonucu olarak AA, AB ve BB olmak üzere 3 genotip belirlenmiştir. Çalışılan popülasyonların farklılığına göre allel ve genotip oranları değişmektedir. Literatür bildirişlerinden sadece birinde ilişkilendirme çalışması yapılmıştır(Zhao, 2008). Eşit sayıda hayvanlardan kontrol ve deney grupları oluşturulup bireyler üzerinde allel ve genotip taraması yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada salma olarak yetiştirilen halk arasında "Kara Sığır" olarak bilinen yerli sığırlar hayvan materyali olarak kullanılmıştır. Et ve süt verimleri kültür ırklarıyla yarışmadığı için, dağlık arazilerinde serbestçe otlamaya bırakılmışlardır ve tüm besin ihtiyacını, özgür bir şekilde otlayarak karşılamaktadır.

Yılın neredeyse 365 günü doğal ortamlarında özgürce otlayan ve yaşayan bu hayvanlara, kış aylarında yoğun kar yağışı, hayvanların kayıt altına alınması amacıyla küpeleme vb. uygulamalar, İlçe Gıda Tarım Hayvancılık Müdürlüğünün yürüttüğü aşılama takvimi ve acil durumlar dışında müdahale edilmemektedir.

Hayatta kalma içgüdüleri, hastalık karşısında dayanıklılıkları, gelişmiş sindirim sistemleri, sağlam yapılı vücutları, güçlü tırnak yapıları, ve coğrafyanın yerel hayvanları olmaları sayesinde kültür ırklarının yapamadığını yaparlar, engebeli arazide gezip otlayarak hayatta kalırlar. Ayrıca hayvan sahipleriyle yapılan görüşmelerde hayvanların tamamen saf oldukları dışarıdan farklı bir ırkın sürüye katılmadığı ve hayvanların doğal aşım la gebe kaldıkları bildirilmiştir.

Hayvan sahiplerinin görevi, ekili arazilere girmelerinin önlenmesi, ve farkına varıldığı zaman hasta hayvanların tedavi edilmesinden ibarettir. Hayvanların doğal hayat döngüsü kendi kontrollerindedir. Konvansiyel hayvancılıkta kullanılan boynuz köreltme, kastrasyon ve erkeklerin sürüden zorla ayrılması gibi yöntemler bu hayvanlar için söz konusu değildir. Dişiler doğal döllenme yoluyla gebe kalır, kendi kendilerine doğururlar. Bu şekilde üreticiye en düşük maliyetle bir ekonomik getiri sağlarlar. Ayrıca hayvan sahipleriyle yapılan görüşmelerde hayvanların tamamen saf oldukları dışarıdan farklı bir ırkın sürüye katılmadığı ve hayvanların doğal aşım la gebe kaldıkları bildirilmiştir.

Araştırmanın hayvan materyalini, Aydın ili Karpuzlu ilçesi Akçakoca ve Akçaabat köyleri ile Merkez Tepecik Köyü ve Ilıca başı mevkiinde bulunan "Yerli Sığır" sürülerinde bulunan toplam 100 baş sığır oluşturmuştur.



Şekil 3.1. Çalışma materyalini oluşturan hayvanlar

3.2. Metot

Çalışma kapsamındaki tüm laboratuvar çalışmaları Prof. Dr. Orhan KARACA tarafından yürütülen ve TÜBİTAK-KAMAG tarafından desteklenen 109G014 nolu ve “Eşme Yöresi Kıvırcık Melezi Koyun Popülasyonu Damızlık Üretim Sürecinin Yetiştirici Koşullarında Yapılandırılması” isimli proje kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalında oluşturulan Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Çalışma kapsamında yer alan Sığırların boyun toplardamarından (*Vena jugularis*) 4.5 ml kan örneği K3 EDTA içeren vakumlu tüplere alınmıştır. Kan örneklerin alınması sırasında sığırların yabani olması ve insanlara alışkın olmamaları dezavantaj oluşturmuştur. Çalışmanın hayvan materyalini oluşturan sığırların örneklendikleri sürüler ve sürülerin buldukları lokasyonlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sığırlara ait kan örneklerinin sürülere göre dağılımı.

İsim	Alındığı Yer	N
Neşet DUMAN	Akçakoca Köyü	16
Cengiz KUNDUZ	Akçaabat Köyü	8
Yalçın KUNDUZ	Akçaabat Köyü	11
Tuncay ASLAN	Akçakoca Köyü	10
Mutlu İNAN	Ilıcabaşı Mevkii	12
Emin KIRLIOĞLU	Tepecik Köyü	43
Toplam		100

Alınan kan örnekleri, DNA izolasyonu basamağına kadar geçen sürenin uzunluğuna bağlı olarak buzdolabı (+4 °C) veya derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Sığırlardan alınan kan örneklerinden DNA ticari izolasyon kiti (Invitrogen DNA izolasyon kiti, Medsantek, İZMİR) kullanılarak izole edilmiştir. DNA izolasyonu üretici firma tarafından tavsiye edilen protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DNA ekstraksiyonunda öncelikle buzdolabı ya da derin dondurucuda bulunan kan örnekleri dışarı çıkarılıp, oda sıcaklığına kadar ısınmaları sağlanmıştır. Sıcak su banyosu 55 °C’ye ayarlanıp ısınması beklenmiştir.

Steril olan mikro santrifüj tüpüne öncelikle 200 µl kan örneği konmuştur. Üzerine 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNase A eklenmiştir. Karışım homojen

bir hal alana kadar vortex cihazında iyice karıştırılıp oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Karışımın üzerine 200 µl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip tekrar homojen bir hal alması için güçlü bir şekilde vortexlenmiştir. Proteinlerin parçalanması için 55°C'de 10 dk termal blokta inkübasyona bırakılmıştır. Termal bloklardan alınan örneklerin üzerine 200 µl %96-100 etanol eklenip, 5 s homojen bir hal alabilmesi için iyice vortexlenmiştir.

Kit içerisinde yer alan PureLink™ Spin kolonu, toplama tüpünün içine yerleştirilmiştir. Yaklaşık 640 µl olan lizat karışımı, toplama tüpünün içindeki kolona pipetlenmiştir. 10.000 g'de 1 dk süreyle santrifüj edilmiştir.

Toplama tüpleri santrifüj sonrası içindeki sıvı ile birlikte atılıp, kolonlar yeni bir toplama tüpünün içine yerleştirilmiştir. Kolonun içine 500 µl Wash Buffer 1 eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk 10.000 g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünün içindeki sıvı atılıp kolona 500 µl Wash Buffer 2 eklenmiştir. Oda sıcaklığında en yüksek hızda 3 dk santrifüj yapılmıştır.

Daha sonra kolon steril bir 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpünün içine yerleştirilmiştir. Kolon içine 100 µl Elution Buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılmıştır. Oda sıcaklığında en yüksek hızda 3 dk santrifüj uygulanmıştır. Kolon içerisine tekrar 100 µl Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 1 dk inkübasyondan sonra yine oda sıcaklığında en yüksek hızda 3 dk süreyle santrifüj edilerek sonuçta toplam 200 µl elution buffer içinde genomik DNA örneği elde edilmiştir.

Elde edilen DNA örnekleri analizler yapılana dek buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

3.2.3. PCR ile DNA Çoğaltımı

Tüplerdeki toplam hacim 25 µl olacak şekilde 10X PCR buffer, MgCl₂, dNTP karışımı (ATP, GTP, CTP, TTP), ileri (Forward) ve geri (Reverse) olmak üzere iki primer, Taq DNA polimeraz enzimi, genomik DNA ve steril ddH₂O içeren PCR karışımı oluşturulmuştur. Yapılan optimizasyon denemeleri ile PCR karışımını oluşturan bileşenlerin en uygun miktarları belirlenmiştir. Her bir DNA örneği için PCR karışımı katılan bileşenlerin hacim ve son konsantrasyonlarına ait ayrıntılar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR karışımı bileşenlerinin hacim ve son konsantrasyonları.

Bileşen Adı	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon
ddH ₂ O	-	-
10X PCR Buffer	10X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTP Karışımı	2,5 mM	0,25 mM
Forward Primer	100 µM	2,5 µM
Reverse Primer	100 µM	2,5 µM
Taq DNA Polimeraz Enzimi	5 U/µl	1U
Genomik DNA	50 ng/µl	~100ng/µl

Lactoferrin gen polimorfizmine uygun bölgenin çoğaltımı için ileri ve geri olmak üzere sığır genomu dizilimine özgün iki primer sentezletilmiştir (Çizelge 3.3). Primerleri sentezletebilmek için daha önceki literatür çalışmalarına bakılmış Zhao (2008), tarafından yapılan çalışmada ki primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Genotiplerin belirlenmesinde kullanılan primerler ve baz dizilimleri.

Primer isimleri	Primer Baz Dizilimleri (5' -> 3')
LTF F	: CACATTACAAGCAGGATCTTTTGCTG
LTF R	: CTGGCCAATGAGCCCTATATGTGT

PCR aşamasında DNA'nın primer bölgelerinin çoğaltılabilmesi için, hazırlanan PCR karışımı ile birlikte izole edilen genomik DNA'lar 0.2 ml'lik ince cidarlı mikro santrifüj tüpleri içerisinde sıcaklık döngüleyici (ABI Veriti) cihaza koyulmuş ve DNA çoğaltımı yapılmıştır. Sıcaklık döngüleyici de (PCR) primerlere özgü DNA bölgelerinin çoğaltılabilmesi için uygulanan program aşağıda verilen Çizelge 3.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Primerlere özgün DNA bölgelerinin çoğaltılabilmesi için gerekli olan ısı döngüleyici cihaz programı.

Basamak	Sıcaklık	Süre
Ön Ayrım (Pre denaturation)	: 94 °C'de	4 dakika
Ayrım (Denaturation)	: 94 °C'de	30 saniye
Primerlerin Bağlanması (Annealing)	: 60 °C'de	45 saniye
Uzama (Extension)	: 72 °C'de	45 saniye
		} 35 döngü
Son Uzama (Final Extension)	: 72 °C'de	10 dakika
Bekleme	: 4 °C'de	∞

PCR aşaması sonucunda elde edilen çoğaltılmış DNA bölgeleri genotipleme aşaması için restriksiyon enzimleri ile kesilmişlerdir.

3.2.4. RFLP (Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

Lactoferrin geninin A ve B allellerinin ayrımı amacı için yapılan PCR tabanlı DNA çoğaltımı işlemi için bütün bireylerin özgül bölgelerinin çoğaltım işlemi tamamlanmıştır. Çoğaltılan bölgelerin var olup olmadıklarını görebilmek için ürünler agaroz jelde görüntülenmiştir. PCR ile çoğaltım sonrası oluşan bölgelerin uzunluklarının bütün bireyler için eşit

olmasından dolayı bireyler arası bir ayırım yapmak mümkün olamamaktadır. Dolayısı ile ayırım yapabilmek için çoğalttığımız bölgelerin bu bölgelere özgül kesim (restriksiyon) enzimleri ile işleme tabi tutulması gerekmektedir. A ve B allellerinin ayırımını yapabilmek için *Hinf*I (Fermentas, Litvanya) enziminden faydalanılmıştır.

Restriksiyon enzimleri ile kesim aşamasında PCR tüpleri içerisinde bulunan ve gene özgül çoğaltılmış DNA parçaları içeren 25 µl hacmindeki PCR ürünü üzerine Çizelge 3.5'te verilen ve restriksiyon enzimini de içeren bileşenler eklenmiştir. PCR ürünü ve restriksiyon enzimi ile birlikte karışımı bulunan tüpler 37 °C'de en az 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.5. Lactoferrin geninin allellerinin ayırımı için uygulanan restiriksiyon işleminin bileşenleri

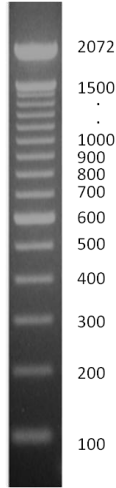
Bileşenler	1 örnek için (µl)
ddH ₂ O	2
10X Buffer Tango	2
<i>Hinf</i> I enzimi (10U/µl)	1
Toplam	5

Genin A ve B allellerinin ayırımına yönelik primer çiftleri ile çoğaltılan 1050 bç uzunluğundaki PCR ürünü DNA fragmanlarının restiriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda; Literatürde belirtilen "B" alleleline rastlanmamıştır. Fakat aynı bölgede "C" alleli olduğu düşünülen 480, 180 ve 120 bç uzunluğunda üç bant tespit edilmiştir. Homozigot AA alleli için 635 bç uzunluğunda bir bant, kesimi gerçekleşmiş homozigot CC bireyi için yaklaşık 480, 180 ve 120 bç uzunluğunda üç bant ve heterozigot AC alleleline sahip bireyler içinde 635, 480, 180 ve 120 bç uzunluğunda dört bant oluşmaktadır. Restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası oluşan bu DNA parçalarının ayrıştırılıp gözlemlenebilmesinde bir sonraki aşamayı elektroforez oluşturmaktadır.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

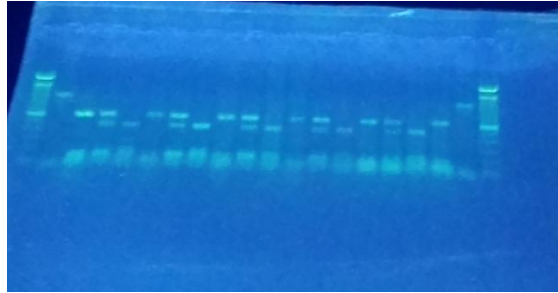
PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA bölgelerinin baz uzunluklarına göre ayırt edilebilmesi için agaroz jel elektroforezinden faydalanmıştır. DNA parçalarının ayrımı için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Bu jeli hazırlayabilmek için 2 gr agaroz hassas terazide tartılıp, ısıya dayanıklı bir şişe içine pH'sı 8.3'e ayarlanmış 100 ml 0.5X TBE çözeltisi eklenerek mikro dalga fırında kaynatılmıştır. Jel kaynarken arada fırından çıkarılarak içindeki agarozun tamamen çözüldüğünü görebilmek için birkaç defa kontrol edilmiştir.

Tamamen içindeki agaroz çözüldüğünde (homojen bir hal aldığıında) fırından çıkarılıp 50-60 °C arası sıcaklığa kadar soğutulmuştur. Bu sıcaklığa ulaştıktan sonra cam şişenin içine, etidyum bromid türevi boyama işlemi yapan safe view eklenmiştir. Artık tamamen hazırlanan agaroz jel, isminden de anlaşılacağı gibi jel halini alabilmesi için son hazırlık olan içine PCR-RFLP ürünlerinin yükleneceği kuyucukların oluşmasını sağlayacak tarakların takılı olduğu yatay elektroforez küvetine dökülerek katılması beklenmiştir. Katılan jelden taraklar kuyucukları bozmayacak kadar özenli bir şekilde çıkartılmıştır. Son olarak daha önceden hazırlanan 0.5X TBE çözeltisi elektroforez tankına dökülüp, elektroforez küveti içerisindeki hazırlanan jel tanka küvetle birlikte yerleştirilmiştir. Çıkartılan taraklar sayesinde oluşan kuyucuklara 10 µl PCR-RFLP içine 2µl yükleme boyası (6X Loading Dye) karışımı olacak şekilde elde edilen ürünler yüklenmiştir. Jelin ilk kuyucuğuna oluşacak bantları doğru yorumlayabilmek için gerekli olan 100bp DNA boy markörü (İnvitrogen, 100 bp) yüklenmiştir.



Şekil 3.2. DNA bant büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA boy markörü

Yükleme işlemi bittikten sonra elektroforez tankını, elektroforez güç kaynağına bağlayıp, örnekler agaroz jelde 65 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonunda agaroz jel UV ışığın altında görüntülenip fotoğraflanmıştır (Vilber Lourmat). Bu görüntüleme sonucunda bireyler için genotip tayini yapılmıştır.



Şekil 3.3. UV ışığının altında safe view ile boyanmış agaroz jelin görüntüsü

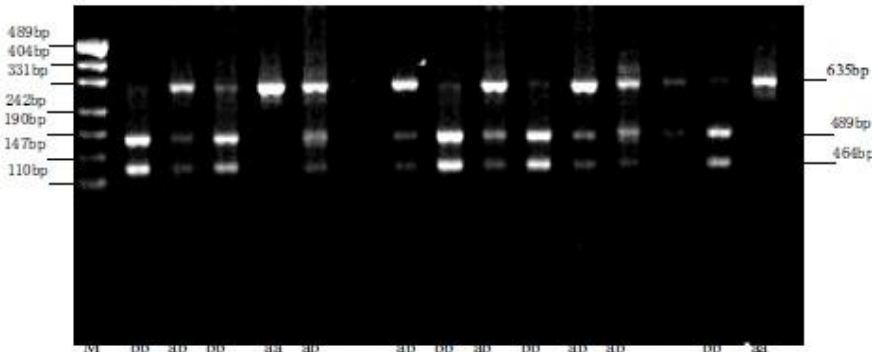
3.2.6. Lactoferrin Genotiplerine Yönelik Değerlendirmeler

Jel fotoğraflarından her bireye ait genotip belirlenip not edildikten sonra Lactoferrin genetik varyantları bakımından gen ve genotip frekansları direkt sayım yöntemi ile belirlenmiştir. Gen ve genotip frekansları 6 işletme için ayrı ayrı hesaplanmakla birlikte popülasyonun tamamı için de hesaplanmıştır. Ayrıca işletmelerin veya popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığını kontrol etmek üzere ki-kare (χ^2) testinden faydalanılmıştır. Tüm hesaplamalar ve χ^2 analizleri için PopGene32 programı (Yeh vd., 1997) kullanılmıştır.

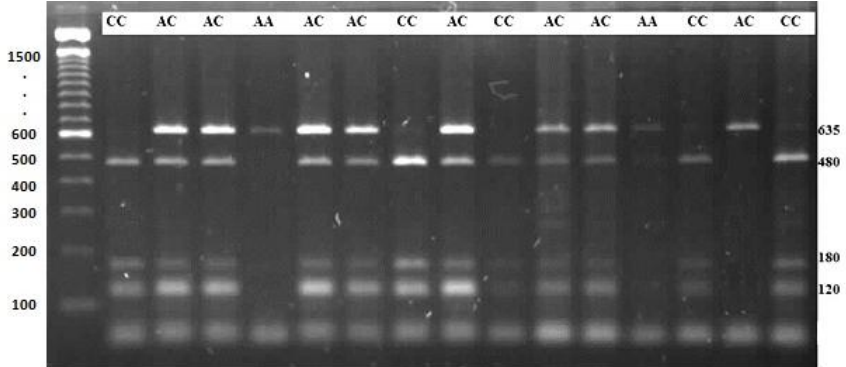
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Lactoferrin Genotiplerine İlişkin Gözlemler

PCR-RFLP sonucu oluşan bantlar safe wiew ile boyanmış agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde fotoğraflanmıştır



Şekil 4.1. Literatürde belirtilen bant uzunluklarına ait jel görüntüsü



Şekil 4.2. Çalışma için kullanılan sığırlardan bazılarının jelde oluşan LTF geni A ve C allelleri bakımından genotiplere ait görüntü

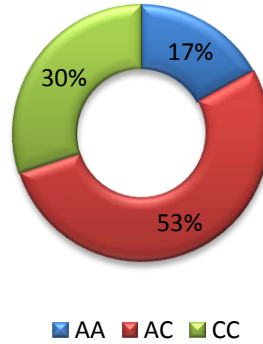
Lactoferrin gen polimorfizminin belirleyebilmek için yapılan, genin A ve B allellerinin ayırımına yönelik primer çiftleri ile çoğaltılan 1050 bp uzunluğundaki PCR ürünü DNA fragmanlarının restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda; B alleleline rastlanmamıştır. Yapılan literatür çalışmalarında BB alleli için 489 ve 464 bp uzunluğunda iki bant gözlenmektedir. Fakat aynı bölgede 480, 180 ve 120 bp uzunluğunda üç bant gözlenmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında bu bantta dair hiçbir bilgiye rastlanmamıştır. Bu bantın "C" alleli olabileceği düşünülmektedir. Belirtilen AA alleli için 635 bp uzunluğunda tek bant, CC alleli için yaklaşık 480, 180 ve 120 bp uzunluğunda üç bant ve AC alleleline sahip bireyler içinde 635, 480, 180 ve 120 bp uzunluğunda dört bant oluşmaktadır. Lactoferrin gen bölgesi Şekil 4.3.'te verilmiştir (Anonim, 2013)

CACATTACAAGCAGGATCTTTGCTGCCCTCCTGTCCCTCCAACAGACTGGTTCCAAATAGGAAAAGGAGTACGTCAAGGCTGTATATTGTCACCCTGCTTATTTAACTCTATGCAGAGTACATCATGAGAAACGCTGGGCTGGAAGAAGCACAAGCTGG↓AATCAAGATTGCCAGGAGAAATATCAGTAACCTCAGATATGCAGATGACACCACCCTTATGGCAGAAAGTGAAGAACTAAAGAGCCTCTTGATGAAAGTTAAAGAGGAGAGTGAAAAAGTTGGCTTAAAGCTCAACATTGAGAAAACTAAGATCATGGCATCTGATCCCATCACTTCATGGCAAATAGATGGGAAACAGTGGCTGACTGTATTTTTCTGGGCTCCAAATCACTGCAGATGGTGATTGCAGCCATGAAATTTAAAGATGCTTACTCTTGGAAGGAAAGCTATGGCCAACCTACACAGCATATTGAAAAGCAGAGACATTACTTTGCCAACAAAGGTTTCATCTAGTCAAGGCTATGGTTTTCCAGTGGTCATGCATGGATGTGAGAGTTAGACTATAAAGAAAGCTGAGCGCCAAAGAATTGATGCTTTTGAAGTGTGGTGTGGAGAAG↓ACTCTTGAG↓AGTCCCTTGGACTGCAAGGAGGTCACCCAGTCCATCCTAAAGGAGATCAGTCTGGGTGTTTCATGGGAAGGACTGATGTTGAAGCTGAAACTCCAATACTTTGGCCACCTGATGCGAAGAGCTG↓ACTCATTGGAAGAGCCCTGATGCTGGAAAGATTGAAGGCAGGAGGAGAAGGGACGACAGAGGATGAGTTGGTTGGATGGCATCACCCACTCGATGGATCTGGGTTTGTGG↓ACTCCGGAGTTGGTGTGGACAGGGAGGCTGGTGTGCTGCGTTTCATGGAATTGCAAAG↓AGTCAGACACGACTGAGGACTGAACTGAACTGTCCCTCCTCATTCACTCATCCATTCAACCAATGTTAATCATTAAAGTCCCGGCACACATATAGGGCTCATTGGCCAG

Şekil 4.3.Lactoferrin Gen Bölgesi

4.2. Lactoferrin Geni Bakımından Gen ve Genotip Frekansları

Toplam 100 baş sığırın oluşturduğu iki farklı genotipe ait popülasyonda Lactoferrin genotiplerinin dağılımı Şekil 4.4'te verilmiştir. Genel popülasyonda AA, AC ve CC genotiplerinin görünme sıklıkları sırası ile %17, %53 ve %30 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. Genel popülasyonunda LTF genotiplerinin oransal dağılımı

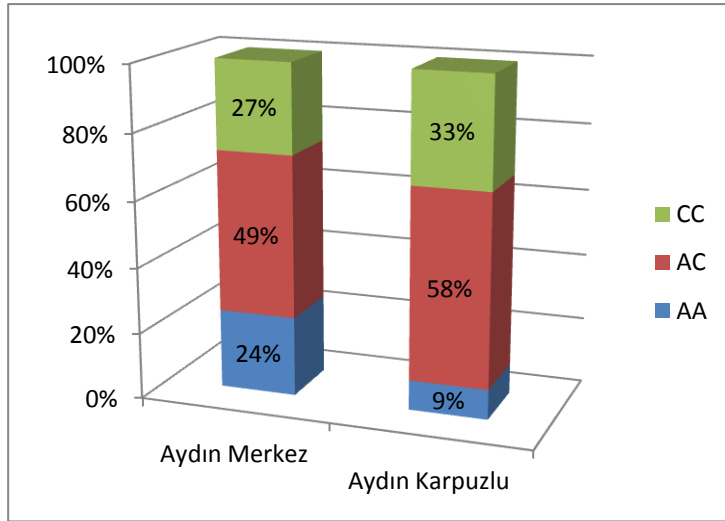
Lactoferrin geni bakımından Yerli Sığırlarda genotiplerin sayısal dağılımları ve gözlenen frekansları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda her üç genotip gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.1. LTF geni bakımından genotiplerinin sayısal dağılımı ve gözlenen genotip frekansları

İrk/Genotip	n	LTF Genotiplerinin Sayısal Dağılımı			LTF Genotiplerinin Gözlenen Frekansları		
		AA	AC	CC	AA	AC	CC
Yerli Sığır	100	17	53	30	0,17	0,53	0,30

Farklı yerlerden kan örnekleri toplanan Yerli Sığırlara ait popülasyonda Lactoferrin genotiplerinin dağılımı Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2' de verilmiştir. Aydın Karpuzlu'da en yüksek görülme sıklığı AC genotipine (%58) ait olurken, CC genotipli bireylerin oranı %33 , AA genotipli bireylerin oranı ise %9 olarak tespit edilmiştir. Aydın Merkez'de AA genotipli bireylerin

oranı %24, AC genotipli bireylerin oranı %49 ve CC genotipli bireylerin oranı ise %27 olarak tespit edilmiştir. Genotiplerin gözlenen frekansları AA, AC ve CC için sırası ile; Aydın Merkezde bulunan yetiştiricilerin Yerli Sığır sürülerinden toplanan 55 örnekte, 0,24, 0,49 ve 0,27 olarak, Aydın Karpuzlu da bulunan yetiştiricilerden toplanan 45 örnekte, 0,09, 0,58 ve 0,33 olarak belirlenmiştir.



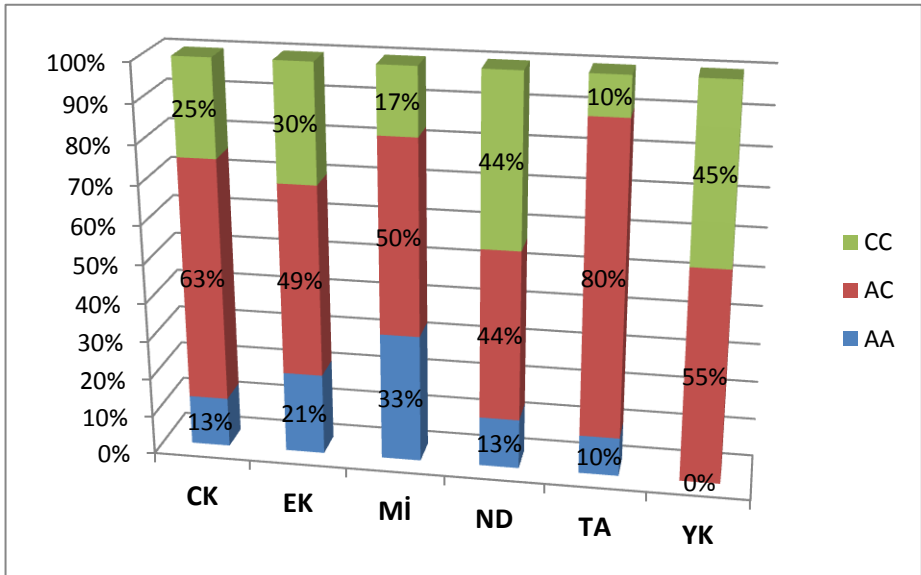
Şekil 4.5. Farklı bölgeden kan örnekleri toplanan Yerli Sığırlarda LTF geni bakımından genotiplerin oransal dağılımı

Çizelge 4.2. Farklı yerlerden kan örnekleri toplanan Yerli Sığırlarda LTF geni bakımından genotiplerin dağılımı ve gözlenen genotip frekansları.

Bölgeler	n	LTF Genotiplerinin Sayısal Dağılımı			LTF Genotiplerinin Gözlenen Frekansları		
		AA	AC	CC	AA	AC	CC
Aydın Merkez	55	13	27	15	0,24	0,49	0,27
Aydın Karpuzlu	45	4	26	15	0,09	0,58	0,33
Genel	100	17	53	30	0,17	0,53	0,30

Altı sürüden oluşan Yerli Sığır ırkına ait popülasyonda Lactoferrin genotiplerinin dağılım ve gözlenen frekansları Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3'te özetlenmiştir. CK, EK, Mİ, ND, TA sürülerinde her üç genotip gözlenirken,

YK sürüsünde AA genotipine rastlanamamıştır. Genotiplerin gözlenen frekansları AA, AC ve CC için sırası ile; CK sürüsünden toplanan 8 örnekte, 0,13, 0,63 ve 0,25 olarak, EK sürüsünden toplanan 43 örnekte, 0,21, 0,49 ve 0,30 olarak, Mİ sürüsünden toplanan 12 örnekte, 0,33, 0,50 ve 0,17 olarak, ND sürüsünden toplanan 16 örnekte, 0,13, 0,44 ve 0,44 olarak, TA sürüsünden toplanan 10 örnekte, 0,10, 0,80 ve 0,10 olarak, YK sürüsünden toplanan 11 örnekte, 0, 0,55 ve 0,45 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. LTF geni bakımından genotiplerin sürülere göre oransal dağılımı

Çizelge 4.3. LTF geni bakımından genotiplerin sürülere göre sayısal dağılımı ve gözlenen frekansları

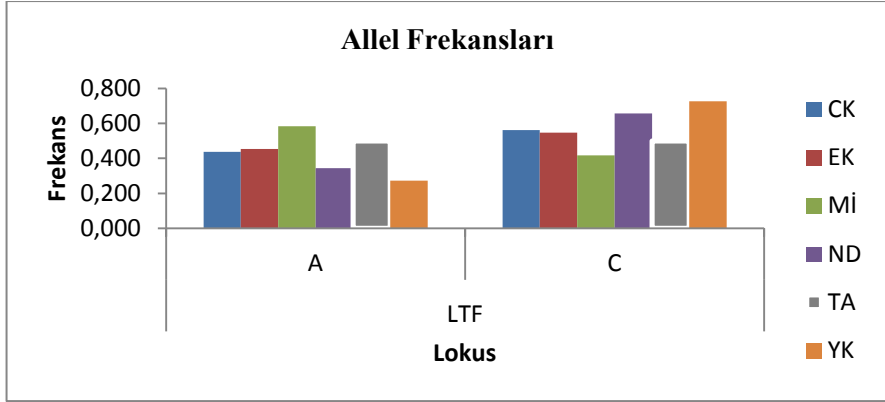
Yetiştiriciler	n	LTF Genotiplerinin Sayısal Dağılımı			LTF Genotiplerinin Gözlenen Frekansları		
		AA	AC	CC	AA	AC	CC
CK	8	1	5	2	0,13	0,63	0,25
EK	43	9	21	13	0,21	0,49	0,30
Mİ	12	4	6	2	0,33	0,50	0,17
ND	16	2	7	7	0,13	0,44	0,44
TA	10	1	8	1	0,10	0,80	0,10
YK	11	0	6	5	0	0,55	0,45
Genel	100	17	53	30	0,17	0,53	0,30

Yerli Sığır için örnekleme yapılan sürü veya lokasyonlar bakımından yapılan değerlendirme ile elde edilen allel frekansları Çizelge 4.4’de özetlenmiştir. A alleli bakımından en yüksek frekans Mİ ait sürüde gözlenmiştir. Yetiştirici sürüsünden örneklenen 12 baş sığırdan 4 başında AA, 6 başında ise AC genotipi gözlenmiştir. CC genotipine ise 2 baş sığırdan rastlanmıştır. A alleli YK ait sürüde rastlanmamıştır. C alleli bakımından en yüksek frekans YK ait sürüde gözlenmiştir. Yetiştirici sürüsünden örneklenen 11 baş sığırdan 6 başında AC, 5 başında ise CC genotipi gözlenmiştir. AC genotipine sahip heterozigot bireylerin oranının homozigot genotiplere oranla daha yüksek sayıda olduğu dikkati çekmektedir.

Çizelge 4.4. Yerli Sığır için örnekleme yapılan sürü veya lokasyonlar bakımından yapılan değerlendirme ile elde edilen allel frekansları

Lokus	Allel	CK	EK	Mİ	ND	TA	YK	Karpuzlu	Merkez	Genel
LTF	A	0,438	0,583	0,583	0,344	0,500	0,273	0,378	0,482	0,435
	C	0,563	0,417	0,417	0,656	0,500	0,727	0,622	0,512	0,565

En yüksek A alleli Mİ ait sürüde bulunurken, en düşük A alleli, sadece 6 baş heterozigot AC hayvanı bulunan, Yerli Sığır yetiştiricisi YK sürüsünde tespit edilmiştir. A ve C allellerinin bulunma frekanslarına göre çizilmiş grafik Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Yerli Sığırlar için farklı sürü veya bölgelerden alınan örnekler bakımından gözlenen allel frekanslarının dağılımı

Gözlenen ve beklenen genotip sayıları ile Hardy-Weinberg dengesine yönelik ki-kare (χ^2) analiz sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir. Yapılan ki-kare analiz sonucunda Aydın Karpuzlu (45 baş) ve Aydın Merkez (55 baş) olmak üzere her iki lokasyona göre yapılan değerlendirmede örneklemin Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, bütün popülasyona ait verileri kapsayan analiz sonucunda ve işletmelere göre ayrı ayrı yapılan değerlendirmede popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.5. LTF geni bakımından sığır genotiplerine ait gözlenen ve beklenen sayılar ile ki-kare (χ^2) analiz sonuçları.

Örneklenen Yerler	n	Gözlenen Sayılar			Beklenen Sayılar			χ^2	P
		AA	AC	CC	AA	AC	CC		
Aydın-Karpuzlu	45	4	26	15	6,422	21,156	17,422	2,36	0,125
Aydın-Merkez	55	13	27	15	12,768	27,464	14,768	0,016	0,900
CK	8	1	5	2	1,531	3,938	2,531	0,583	0,445
EK	43	9	21	13	8,843	21,314	12,843	0,009	0,923
Mİ	12	4	6	2	4,083	5,833	2,083	0,01	0,921
ND	16	2	7	7	1,891	7,219	6,891	0,015	0,904
TA	10	1	8	1	2,5	5	2,5	3,6	0,058
YK	11	0	6	5	0,818	4,364	5,818	1,547	0,214
GENEL TOPLAM	100	17	53	30	18,923	49,155	31,923	0,612	0,434

Lactoferrin A ve C allellerinin frekanslarına göre tüm sürüleri kapsayan analizde elde edilen genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Bir lokus bakımından hesaplanan genetik yakınlık ve genetik uzaklık değerleri ile çok sağlıklı bir değerlendirme yapabilmek olanaklı olmamasına karşın ek bir bilgi kaynağı olarak dikkate alınmıştır. Sürüler arasındaki genetik benzerlik değerleri 0,9995 ile 0,9495 arasında sıralanmıştır. Sürüler arasındaki genetik uzaklıklar ise 0,005 ile 0,0518 arasında sıralanmıştır.

Çizelge 4.6. Sürüler arası genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri

	CK	EK	Mİ	ND	TA	YK
CK	***	0,9946	0,9992	0,9923	0,9973	0,9770
EK	0,0054	***	0,9895	0,9740	0,9995	0,9495
Mİ	0,0008	0,0106	***	0,9965	0,9935	0,9849
ND	0,0078	0,0263	0,0035	***	0,9806	0,9959
TA	0,0027	0,0005	0,0065	0,0196	***	0,9588
YK	0,0233	0,0518	0,0152	0,0041	0,0421	***

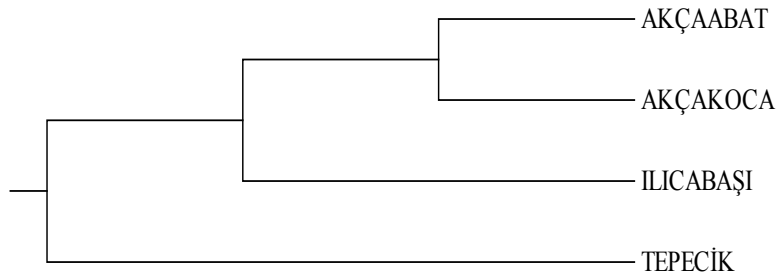
Lactoferrin A ve C allellerinin frekanslarına göre örnekleme yapılan lokasyonları kapsayan analizde ise elde edilen genetik benzerlik (köşegen

üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Sürüler arasındaki genetik benzerlik değerleri 0,9933 ile 0,8911 arasında sıralanmıştır. Sürüler arasındaki genetik uzaklıklar ise 0,0047 ile 0,1153 arasında sıralanmıştır.

Çizelge 4.7.Örnekleme yapılan lokasyonlar arası genetik benzerlik (köşegen üstü) ve genetik uzaklık (köşegen altı) değerleri

	Akçaabat	Akçakoca	Ilcabaşı	Tepecik
Akçaabat	***	0,9933	0,8911	0,9774
Akçakoca	0,0067	***	0,9376	0,9953
Ilcabaşı	0,1153	0,0644	***	0,9669
Tepecik	0,0229	0,0047	0,0336	***

Belirlenen genetik uzaklıklara göre çizilen dendogram Şekil 4.8’de verilmiştir. Çizdirilen dendograma göre Akçaabat ile Akçakoca’da bulunan sürüler arasında benzerliğin daha fazla olduğu bulunmuştur. Tepecik’de bulunan sürü diğer bütün sürülere benzerlik bakımından en uzak sürü olarak gözlemlenmektedir. Ancak, sadece 1 lokusa dayalı hesaplanan genetik uzaklıklara ait dendogram çizildiğinden çok sağlıklı bir değerlendirme yapmak zordur. Etkin bir değerlendirme yapabilmek için çok sayıda lokusa ait genotip bilgilerinin dikkate alınması gerekir.



Şekil 4.8. Örnekleme yapılan lokasyonlar arasındaki genetik uzaklığa göre çizilmiş dendogram

Yapılan literatür taraması sonucu bazı sığır popülasyonlarında LTF geninin A ve B allelleri için belirlenen allel frekansları Çizelge 4.8’de

özetlenmiştir. İncelenen ırkların tamamında A alleli B allele göre oldukça yüksek frekans sergilemiştir. Hatta kimi ırklarda A alleli bakımından sabitlenme olmuştur. Bu bilgiler ile karşılaştırıldığında Yerli Sığır ırkında A alleli için belirlenen frekanslar Holstein ırkı (Zhao vd., 2008) dışındaki tüm sığır ırklarından daha düşük bulunmuştur. Yerli Sığır ırkında A alleli için elde edilen frekans (0,435) literatürdeki tüm sığır ırkları için elde edilen frekanslardan daha düşük gözlenmiştir.

Çizelge 4.8. Bazı sığır popülasyonlarında LTF genine ait allel frekansları

Irklar	Kaynak	N	LTF		Enzim
			A	B	
Holstein-Friesian	Sharifzadeh ve Doostri., 2011	160	0.68	0.32	<i>EcoRI</i>
Holstein-Friesian	Wojdak vd., 2006	124	0.68	0.32	<i>EcoRI</i>
Holstein-Friesian	Jemmali vd., 2011	52	1.00	*	<i>HinfI</i>
Holstein-Friesian	Zhao vd., 2008	60	0.17	0.83	<i>HinfI</i>
Holstein-Friesian	Anggraeni vd., 2012	89	0.77	0.23	<i>EcoRI</i>
Limousin	Anggraeni vd., 2012	14	0.79	0.21	<i>EcoRI</i>
Angus	Anggraeni vd., 2012	5	0.50	0.50	<i>EcoRI</i>
Simmental	Anggraeni vd., 2012	13	0.62	0.38	<i>EcoRI</i>
Brahman	Anggraeni vd., 2012	5	0.80	0.20	<i>EcoRI</i>
Holstein-Friesian	Nanaei vd., 2012	404	0.80	0.20	<i>EcoRI</i>
DAK	Gürsel vd., 2012	46	0.47	0.53	<i>EcoRI</i>
GAK	Gürsel vd., 2012	46	0.63	0.37	<i>EcoRI</i>

5. SONUÇ

Bu çalışmada, yerli gen kaynağı olan Yerli Sığırlarımızda Mastitise karşı direnç sağlayan Lactoferrin geni bakımından var olan polimorfizm PCR-RFLP metodu kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışma kapsamında halk arasında "Kara Sığır" olarak bilinen sığırlar materyal olarak kullanılmıştır. 4 farklı lokasyondan (Akçakoca, Akçaabat, Ilıcabaşı ve Tepecik) toplam 100 baş hayvandan kan örneği alınmıştır. Sürüler arası genetik benzerlik ve farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma ile elde edilen sonuçları aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür:

Yapılan PCR-RFLP yönteminden sonra ulaşılan sonuçlarda: LTF geninin PCR-RFLP metodu ve *Hinf*I enzimiyle kesimi gerçekleştirilmesi ile belirlendiği Yerli Sığır için frekansı düşük olan AA genotipi, diğer çalışmalarla paralellik sergilemektedir (Zhao vd., 2008). Literatürde sıkça rastlanan "B" alleleline bu çalışmada rastlanmamıştır. Fakat aynı bölgede 480, 180 ve 120 bp farklı üç bant gözlenmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında bu bant dair hiçbir bilgiye rastlanmamıştır. Bu bantın "C" alleli olduğu düşünülmektedir.

Lactoferrin geni bakımından bulunan AA, AC ve CC beklenen genotip frekansları sırası ile, 0.17, 0.53 ve 0.30, olarak tespit edilmiştir.

Lactoferrin geni bakımından LTF A ve LTF C allellerinin bulunma frekansları sırası ile; yetiştiricilerinden toplanan örnek popülasyon için Aydın Merkez'de , 0.482 ve 0.512, Aydın Karpuzlu'da 0.378 ve 0.622, CK sürüsünde, 0.438 ve 0.563, EK sürüsünde, 0.583 ve 0.417, Mİ sürüsünde, 0.583 ve 0.417, ND sürüsünde, 0.344 ve 0.656, TA sürüsünde, 0.500 ve 0.500 ve YK isimli yetiştiricinin sürüsünde 0.273 ve 0.727 olarak bulunmuştur. Toplam 100 baş olan Yerli Sığır ırkı örnekleminde ise LTF A ve LTF C allellerinin bulunma frekansları 0.482 ve 0.512 olarak bulunmuştur.

Sürüler arası LTF A ve LTF C allellerinin frekanslarına göre tüm sürüleri kapsayan analizde elde edilen genetik benzerlik 0.9995 ile 0.9495 arasında sıralanmıştır. Sürüler arasındaki genetik uzaklıklar ise 0.005 ile 0.0518 arasında sıralanmıştır. Örneklerin alındığı lokasyonları kapsayan analizde

ise genetik benzerlik 0.9953 ile 0.8911 arasında, genetik uzaklıklar ise 0.0047 ile 0.1153 arasında sıralanmıştır. Bu sıralanan genetik uzaklıklara göre, Akçaabat ve Akçaova'da ki sürüler genetik olarak birbirine yakın, Tepecik deki sürü en uzak sürü olarak belirlenmiştir.

Son yıllarda hayvan ithallerinin artması, ülkemizde genetik çeşitliliğin azalması ve kaybolması tehlikesini doğurmuştur. Yerli ırkların kültür ırklarıyla verim yönünden yarışmaması ve ekonomik beklentilerin karşılanmaması sonucu her geçen gün sayılarının azaldığı bilinmektedir. Kültür ırklarına göre daha kanaatkar olan yerli ırklarımızın korunması ile ıslah çalışmalarına temel oluşturacak genetik çeşitlilik kaybedilmeden, melez üstünlüğünden yararlanılabilecektir.

Türkiye'de sığır popülasyonlarında Lactoferrin gen polimorfizmine yönelik DNA düzeyinde sadece bir çalışma bulunmaktadır (Gürsel vd., 2012). Yapılan araştırmada Lactoferrin bakımından gen polimorfizminin olduğu görülmüştür. Lactoferrin lokusunda LTF A ve LTF C olmak üzere 2 allel saptanmış olup, Literatürde bulunan B alleline yapılan çalışmada rastlanmamıştır. Belirlenen allellerden en yaygın olanı C allelidir. Bu çalışma referans bir çalışma olarak kabul edilip kimi yerli ırklar üzerinde başka çalışmalar da yapılabilecektir.

Araştırmacılar Lactoferrin gen polimorfizmi üzerine yoğunlaştıkça, sadece *Hin*I ve *Eco*RI enzimi ile değil aynı zamanda *S*tyI enzimiyle de farklı alleller belirlenmektedir (Chopra vd., 2013). Bu gen polimorfizmi ortaya konulduktan sonra daha ileriki dönemlerde bu enzimlerle de denemeler yapılabilecektir.

Günümüzde genotiplerin tespitinde DNA analizleri daha hızlı sonuç alınması bakımından genotip tayininin büyük oranda yerini almıştır. DNA analizleri ile proteinleri kodlayan genlerin allelleri tespit edilebilmektedir.

Bu çalışma sadece Yerli Sığırların Lactoferrin gen polimorfizminin olup olmadığını ortaya koyabilmek için yapılmıştır. Daha ileriki dönemlerde yapılacak çalışmalarda bulunan allel ve genotip frekansları ile, Yerli sığırlarda süt verim kayıtları tutularak bu gen polimorfizmi olduğunda bahsi geçen sığırlarda mastitise karşı direnç özelliklerin önemlilik dereceleri ilişkilendirilebilecektir.

Daha ileriki çalışmalarda genotiplere göre Lactoferrin lokusu için elde edilen bilgiler Yerli sığırlar için referans olarak kullanılabilir. İleriki yıllarda yapılacak benzer çalışmalar için karşılaştırma yapma ve geçen süreçteki gen ve genotip frekanslarındaki değişimi ortaya koyma ve koruma etkinliklerini buna göre yönlendirme şansı tanıyacaktır.

Bu alışma sonrasında diğer Yerli Sığır ırklarımızda da Lactoferrin genine ait polimorfizmin ortaya konmasında ve özellikle mastitise karşı direnç özelliklerinin genotiplere göre değişiminin ortaya konmasında yarar vardır. Ayrıca, gene ait bölgenin DNA dizi analizi ile incelenmesi ırklarımıza özgü farklılıkların olup olmadığını da açık bir şekilde ortaya koyacaktır.

Ayrıca Yerli Sığırlarımızdaki mevcut bazı genler ilerleyen yıllarda karşılaşılacak sorunların çözümünde bize yol gösterebilecektir. Bu yüzden gelecek nesillere bırakılacak genetik bir miras olması nedeni ile bu hayvanlar korunmalıdır.

KAYNAKLAR

- Anggraeni, A., Mumpunie, G.E., Misrianti, R., Sumantri, C. 2012. Genetic polymorphism of the lactoferrin gene in dairy and beef cattles at national artificial insemination and embryo transfer stations. **JITV**, 17(4): 251-257.
- Anonim 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY319306.2>. [Erişim Tarihi: 15.10.2013].
- Avcı, G. 2007. Laktoferrinin biyolojik özellikleri ve hastalıklarla ilişkisi. **Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 7(1): 23-34.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **J. Dairy Sci.**, 81: 411-419.
- Baveye, S., Ellass, E., Mazurier, J., Spik, G., Legrand, D. 1999. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 37(3): 281-28.
- Boettcher, P.J., Dekkers, J.C., Kolstad, B.W. 1998. Development of an udder health index for sire selection based on somatic cell score, udder conformation, and milking speed. **J. Dairy Sci.**, 81: 1157-1168.
- Carlen, E., Strandberg, E., Roth, A. 2004. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, 87: 3062-3070.
- Carlen, E. 2008. Genetic Evaluation of Clinical Mastitis in Dairy Cattle. Swedish University of Agricultural Sciences. Doctoral Thesis, Uppsala, Sweden.
- Chavez, G.S.A., Gallegos, A.S., Cruz, R.Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 33: 301.e1-301.e8.
- Deveci, H., Apaydın, A. M., Kalkan, C., Öcal, H. 1994. Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. 1. Baskı, Fırat Üniversitesi Basımevi, Elazığ.

- Gürsel, E.F., Akış, I., Ateş, A., Yardibi, H., Hoştürk, T.G., Öztapak, K. 2012. EcoRI polymorphism in intron 6 of the bovine lactoferrin gene in south anatolian red and east anatolian red cattle breeds. **J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.**, 39 (2): 183-188.
- Hagnestam, C., Emanuelson, U., Berglund, B. 2007. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. **J. Dairy Sci.**, 90: 2260-2270.
- Harmon, R.J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts **J. Dairy Sci.**, 77: 2103-2112.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., 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.
- Heringstad, B., Chang, Y.M., Gianola, D., Klemetsdal, G. 2005. Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three lactations of Norwegian Red cows. **J. Dairy Sci.**, 88: 3273-3281.
- Jemmali, B., Kamoun, M., Ksouri, M., Rekik, B., Mhirsi, S. 2011. PCR-RFLP analysis of genetic polymorphism of the lactoferrin gene in Tunisian imported Holsteins. **Wayamba Journal of Animal Science**, ISSN: 2012-578X: P170-P173
- Kehrli, M.E., Shuster, D.E. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **J. Dairy Sci.**, 77: 619-627.
- Koivula, M., Mäntysaari, E.A., Negussie, E., Serenius, T. 2005. Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. **J. Dairy Sci.**, 88: 827-833.
- Kutila, T., Pyörälä, S., Saloniemi, H., Kaartinen, L. 2003. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 44: 35-42.
- Nanaei, H.A., Edriss, M.A., Mahyari, S.A., Rahmani, H.R., Tabatabaei, B.E.S. 2012. Lactoferrin gene polymorphism of holstein cows in isfahan province. **Annals of Biological Research**, 3 (5):2365-2367.

- Nyman, A.K. 2007. Epidemiological Studies of Risk Factors for Bovine Mastitis. Swedish University of Agricultural Sciences. Doctoral Thesis. Uppsala, Sweden. Electronic version available at <http://epsilon.slu.se/eng>
- Rahmani, F. S. 2011. Studies on Bovine Lactoferrin Gene and Its Association With Mastitis In Cattle. Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University. Doctoral Thesis. Bidar, India.
- Reents, R., Jamrozik, J., Schaeffer, L.R., Dekkers, J.C. 1995. Estimation of genetic parameters for test day records of somatic cell score. **J. Dairy Sci.**, 78: 2847-2857.
- Rupp, R., Boichard, D. 1999. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits and milking ease in first lactation Holsteins. **J. Dairy Sci.**, 82: 2198-2204.
- Rupp, R., Boichard, D. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. **Veterinary Research**, 34: 671-688.
- Sabuncuoğlu, N., Çolak, A., Akbulut, Ö., Tüzemen, N., Bayram, B. 2003. Siyah Alaca ve Esmer ineklerde CMT skoru ile bazı süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. **Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 34 (2): 139-143.
- Schepers, A.J., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B.M., Hanekamp, W.J.A. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **J. Dairy Sci.**, 80: 1833-1840.
- Schwerin, M., Toldo, S.S., Eggen, A., Brunner, R., Seyfert, H.M., Fries, R. 1994. The bovine lactoferrin gene (LTF) maps to chromosome 22 and syntenic group U12. **Mamm. Gen.**, 5(8): 486-489.
- Seyfert, H.M., C, Kuhn. 1994. Characterization of a first bovine Lactoferrin gene variant, based on an EcoRI polymorphism. **Anim. Genet.**25: 24-25.
- Sharifzadeh, A., Doosti, A. 2011. Study of lactoferrin gene polymorphism in iranian holstein cattle using PCR-RFLP technique. **Global Vet.**, 6: 530-536.
- Shook, G.E. 1989. Selection for disease resistance. **J. Dairy Sci.**, 72: 1349-1362.

TÜİK, 2010. <http://www.tuik.gov.tr>, [Erişim Tarihi: 17.10.2013].

TÜİK, 2012. <http://www.tuik.gov.tr>, [Erişim Tarihi: 27.10.2013].

Van Dorp, T.E., Dekkers, J.C.M., Martin, S.W., Noordhuizen, J.P.T.M. 1998. Genetic parameters of health disorders and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered holstein cows. **J. Dairy Sci.**, 81: 2264-2270.

Zhao, C.H., Gao-Ming, H.E., Yan-Liang, W., Zhao-Xia, Z. 2008. Polymorphism analysis of the promoter of cow lactoferrin gene with PCR-RFLP and its correlation with subclinical mastitis. **Acta Agriculturae Slovenica**, 92 (2): 185-187.

Wojdak, M. K., Kmiec, M., Ziemac, J. 2006. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. **Vet. Med.**, 51: 14-20.

Yeh, F.C., Yang, R.-C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.-H., Mao, J.X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. In, University of Alberta, Canada (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/Pop32.exe>)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Semih SEVİM
Doğum Yeri ve Tarihi : Nazilli-28/11/1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

1. Yılmaz, O., Cemal, İ., Karaca, O., Ata, N., **Sevim, S.**, Öztürk, M. 2013. Genetic Diversity of Karya and Çine Çaparı Sheep. Scientific Papers Series D. Animal Science, LVI: 31-35. ISSN 2285-5750

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

1. Yılmaz, O., Cemal, İ., Karaca, O., **Sevim, S.**, Öztürk, M., Ata, N., 2013. Calpastatin Gene Polymorphism in Turkish Sheep Breeds. International Scientific Conference (BALNIMALCON- 2013): Challenges of the Balkan Animal Industry and the Role of Science and Cooperation. Namık Kemal University Tekirdağ – Turkey.
2. **Sevim, S.**, Yılmaz, O., Karaca, O., Cemal, I., 2012. Mastitis Resistance Genes in Dairy Cattle. International Animal Science

Congress of Turkish and Relatives Communities, September 11-13, 2012. Suleyman Demirel University, Isparta-Turkey, p. 151.

3. Yılmaz, O., Karaca, O., İnce, D., Cemal, İ., Yaralı, E., Varol, M., **Sevim S.**, 2013. Nomadic Sheep Breeding and the Role of Sheep Breeding Program in Western Anatolia. 8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Eylül, Çanakkale, pp:263. (Poster-Özet)

Katıldığı Projeler:

DEVAM EDENLER

1. Cemal, İ., Yılmaz, O., Karaca, O., Ata, N., **Sevim, S.** (ZRF-13009). Kıl Keçilerinde Genetik Çeşitliliğin Mikrosatellit Gen Belirteçleri ile Tanımlanması. ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Kurulu 2013-2015.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :Adnan Menderes Üniversitesi (Tübitak Bursiyeri)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : semihsevim@windowslive.com

Telefon Numarası :0506-349-22-40