

PAPER DETAILS

TITLE: Türkiye'de Yetistirilen Holstayn ve Bazi Yerli Siger Irklarinda Citrullinemia Allelinin Belirlenmesi

AUTHORS: B AKYÜZ,D BAYRAM,O ERTUGRUL,Km ISCAN

PAGES: 17-21

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/66110>

Türkiye’ de Yetiştirilen Holştayn ve Bazı Yerli Sığır Irklarında Citrullinemia Allelinin Belirlenmesi

Bilal AKYÜZ¹ Davut BAYRAM¹ Okan ERTUĞRUL² Kaan M. İŞCAN¹
¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE
² Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmanın amacı Türkiye’de yetiştirilen Holştaynlarda ve Türkiye yerli sığır ırklarında citrullinemia allelinin bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır. Çalışmanın materyalini, 176 baş Holştayn sığırları ile 10 baş Yerli Kara, 10 baş Boz Irk, 10 baş Güney Anadolu Kırmızısı ve 10 baş Doğu Anadolu Kırmızısı sığırları oluşturmuştur. Hedef bölge PCR ile çoğaltılmış ve pozitif örnekler Avall restriksiyon enzimiyle sindirime tabi tutulmuştur. Avall polimorfizminin varlığı % 3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. İncelenen Holştaynlarda ve yerli sığırlarda citrullinemia taşıyıcısına rastlanılmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Citrullinemia, kalıtsal hastalık, RFLP, sığır

The Detection of Citrullinemia Allele in Holstein and Some Native Turkish Cattle Breeds

Summary: The aim of this study was to investigate whether the citrullinemia allele exists in Holsteins and in Turkish native cattle breeds in Turkey. The material of the study consisted of 176 Holstein cattle and 10 Native Black, 10 Gray Steppe, 10 South Anatolian Red and 10 East Anatolian Red breeds of cattle. The target site was amplified by PCR and positive samples were digested by Avall restriction endonuclease enzyme. Avall polymorphisms were controlled in 3% NuSieve agarose gel electrophoresis. There were no positive results indicating the presence of citrullinemia allele in Holsteins and Turkish native cattle breeds.

Key Words: Cattle, citrullinemia, hereditary disease, RFLP

Giriş

Sığır citrullinemia hastalığı Holştayn ırkı buzağılarda, üre döngüsünde bozulmaya neden olan otozomal çekinik kalıtsal bir hastalıktır (11). Hastalık, üre döngüsünde sitrulinin arginosuccinat’a çevrilmesinin sağlayan argininosuksinat senteaz (ASS) enzim yetmezliği sonucu ortaya çıkar (11). Bu enzim yokluğu amonyağın üreye çevrilmesi aşamasında vücutta amonyaktan daha toksik bir ürün olan sitrulinin birikmesine neden olur (4, 11). Hasta buzağıkların kanlarında, serebrospinal sıvılarında, göz sıvılarında ve beyin dokularında sitrulin konsantrasyonu yüksektir (9). Devamlı kötüleşen nörolojik bulgular görülür ve hasta buzağıklar doğumu takiben bir hafta içinde ölürlür (3, 11). Bu kalıtsal bozukluktan etkilenmiş buzağıklar normal görünüşlü olarak doğarlar. Doğumdan sonraki ikinci günde buzağılarda depresyon, dil çıkarma ve az beslenme gibi belirtiler görünür. Üçüncü günde, bu buzağıkların amaçsız hareket ile önlerindeki herhangi bir engele veya duvara başlarını dayayarak durdukları görülür. Etkilenmiş buzağılarda bulgular 3-5 gün arasında hızla kötüleşir ve buzağılarda

körlük gelişir, hasta buzağıklar kollapsa girerek 12 saat içinde ölürlür. Dennis ve arkadaşları (8) tarafından ASS enzimini kodlayan genin 5. ekzonunda gözlenen C86T transisyon mutasyonunun sığırlarda citrullinemiaya neden olduğu belirlenmiştir (3, 9, 11). Hastalık, Avustralya’ya yüksek süt yağı oranına sahip olduğu için bu ülkede yaygın olarak kullanılmış olan ABD kökenli Linmack Kriss King isimli boğaya ait spermalar ile bulaşmıştır. Avustralya’da 1980’li yıllarda tüm kullanılan suni tohumlama boğalarının %75’inin bu boğa ile akraba oldukları ve bu boğaların %13’ününse citrullinemia taşıyıcısı oldukları bildirilmiştir (5). Daha sonra bu kalıtsal hastalığın ABD, Kanada, İngiltere, Almanya, Hindistan ve Yeni Zelanda’da yetiştirilen Holştaynlarda görüldüğü bildirilmiştir (9, 11).

Kalıtsal hastalıklar tüm evcil hayvanlarda, hayvanın sağlığını ve verimini olumsuz etkiler ya da embriyonik ve fetal ölüme sebep olarak fertilitiyi düşürebilirler (3, 6). Bu nedenle kalıtsal hastalıklar belirlenerek popülasyondan eradike edilmesi ve popülasyonun genetik sağlığının korunması gereklidir. Genetik temeli bilinen bir kalıtsal bozukluk yönünden taşıyıcılar damızlık olarak seçim aşamasında, doğumdan hemen sonra ya da embriyolar da bile yüksek bir doğrulukta belirlenebilir (3). Bu sayede özellikle Holştayn sığır ırkında çekinik kalıtım şekli gösteren bir çok kalıtsal hastalık belirlenmiştir (10).

Geliş Tarihi/Submission Date : 18.09.2009
Kabul Tarihi/Accepted Date : 09.03.2009

* Bu araştırma EÜBAP- VA-07-04 no’lu proje ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Süt sığırı yetiştiriciliğinde suni tohumlama yöntemi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, en iyi verim özelliklerine sahip oldukları belirlenmiş az sayıda boğanın damızlık olarak kullanılmasına olanak vermektedir. Fakat bu yöntem ırk içince genetik havuzun daralmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da damızlık olarak en yaygın kullanılan hayvanlar arasında ki akrabalık derecesi artarak, üretimi olumsuz yönde etkileyen sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD), üridin monofosfat sentez yetmezliği (DUMPS), citrullinemia ve kongenital vertabral malformasyon (CVM) gibi kalıtsal hastalıklar tüm dünyaya yayılmıştır (1, 2, 5).

Yetiştirme programlarında kalıtsal çekinik kusurların kontrol edilmesi ve popülasyondan eradike edilmesi için fenotipik olarak normal görünen taşıyıcı bireylerin belirlenerek sürüden uzaklaştırılması çok önemlidir. Bu durum özellikle suni tohumlama ve embriyo nakli gibi üstün verimli bir veya birkaç damızlığın yoğun olarak kullanıldığı entansif yetiştiricilikte çok daha önemlidir. Holştayn yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olan BLAD, DUMPS ve CVM gibi kalıtsal bozukluklar tüm dünyada kızlarının üstün verimlerinden dolayı suni tohumlamada en yaygın kullanılan bir boğadan yayılmıştır. Bu nedenle ekonomik verimlilik açısından öncelikle Türkiye’de yetiştirilen kültür ırkı sığırların verimi olumsuz etkileyen kalıtsal kusurlar yönünden genetik yapılarının belirlenmesi gerekmektedir. Daha sonra Türkiye’de yetiştirilen ve ülkenin genetik zenginliğini oluşturan yerli sığır ırklarının da bu kalıtsal kusurlar yönünden genetik yapılarının belirlenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Çünkü ırka özgü olduğu düşünülen bir çok kalıtsal bozukluk için yerli gen kaynakları incelenmemiştir.

Daha önce yine Türkiye’de yetiştirilen Holştaynlarda, bu ırk için önemli verim kayıplarına neden olan kalıtsal hastalıklardan BLAD ve DUMPS aranmış ve bu hastalıklardan sadece BLAD’a neden olan mutant allelin varlığı tespit edilmiştir (2, 7). Ancak Türkiye’de yetiştirilen Holştayn’larda citrullinemia hakkında bir araştırma yoktur. Bu çalışma ile Türkiye’de yetiştirilen Holştayn ırkı sığırlar ve Türkiye yerli sığır ırklarında kalıtsal citrullinemia hastalığına neden olan mutant allelin varlığı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini, Damızlık Sığır Yetiştiriciler Merkez Birliğinden ve Kayseri ve yöresinden temin edilen 176 baş Holştayn ırkı sığır, 10 baş Yerli Kara (YK), 10 baş Güney Anadolu Kırmızısı (GAK), 10 baş Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ve 10 baş Boz ırk (BI), kontrol grubu olarak da daha önce citrullinemia hastalığının kalıtsal varlığının

saptanmadığı (6), Damızlık Sığır Yetiştiriciler Merkez Birliğinden temin edilen Simmental ırkı sığırlardan 20 baş olmak üzere toplam 236 baş hayvan oluşturmuştur. Çalışmada kullanılan Holştayn ve Simmental ırkı hayvanlardan DNA izole etmek için EDTA’lı tüplerle *Vena jugularis*’ten alınan kan kullanılmıştır. Yerli ırklarda ise daha önce yapılan bir çalışmadan kalan DNA örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada DNA izolasyonu için fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Citrullinemiaya neden olan sığır karyotipinin 11. kromozomunda bulunan ASS geninin beşinci eksonundaki mutant alleli belirlemek için yapılacak polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) primer olarak forward: 5’ GGC CAG GGA CCG TGT TCA TTG AGG ACA TC 3’; reverse: 5’ TTC CTG GGA CCC CGT GAG ACA CAT ACT TG 3’ kullanılmıştır. PCR karışımı, her primerden 0,4 pM, 1 X PCR tampon solüsyonu, 25 µM MgCl₂, 200 µM dNTP ve 1 U Taq DNA polimeraz konularak hazırlanan karışım siteril ddH₂O ile 25 µl’ye tamamlanmış ve karışım üzerine 100 ng genomik DNA’dan 1 µl ilave edilerek toplam hacim 28 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu, hazırlanan karışım ısı düzenleme aletinde 94 °C’de 3 dk tutulduktan sonra bir döngüsü 94 °C’de 30 sn, 55 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde 40 döngü, son döngüyü takiben tüpler 72 °C’de 10 dk tutularak yapılmıştır. Elde edilen ürünler 45 dk. 80 volt elektrik gerilimi uygulanarak % 2 lik agaroz jel, elektroforezi ile ayrılmıştır. Elektroforezde 185 baz çifti (bp) uzunluğunda bantların görüldüğü PCR ürünleri, Avall restriksiyon enzimi (Fermentas®) ile kesilerek restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (RFLP) için kullanılmıştır. Bu işlem, her bir örnek için toplam hacmi 25 µl olarak (Avall 1 µl, 1 X Bufer R 3 µl, ddH₂O 16 µl, 5 µl PCR ürünü) hazırlanan karışım ısı düzenleme aletinde 37 °C de 2 saat tutulmuştur. Avall restriksiyon enzimini inaktive etmek için karışım 65 °C de 20 dk tutulmuştur. İşlemin sonunda RFLP ürünlerini belirlemek için % 3’lük NuSieve agaroz jelde elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez sonunda homozigot normal bireylerde 103 bp ve 82 bp’lik iki bant, homozigot hasta bireylerde 185 bp’lik tek bant, heterozigot taşıyıcılarda ise 185 bp, 103 bp ve 82 bp olmak üzere üç bantın görülmesi beklenmiştir.

Bulgular

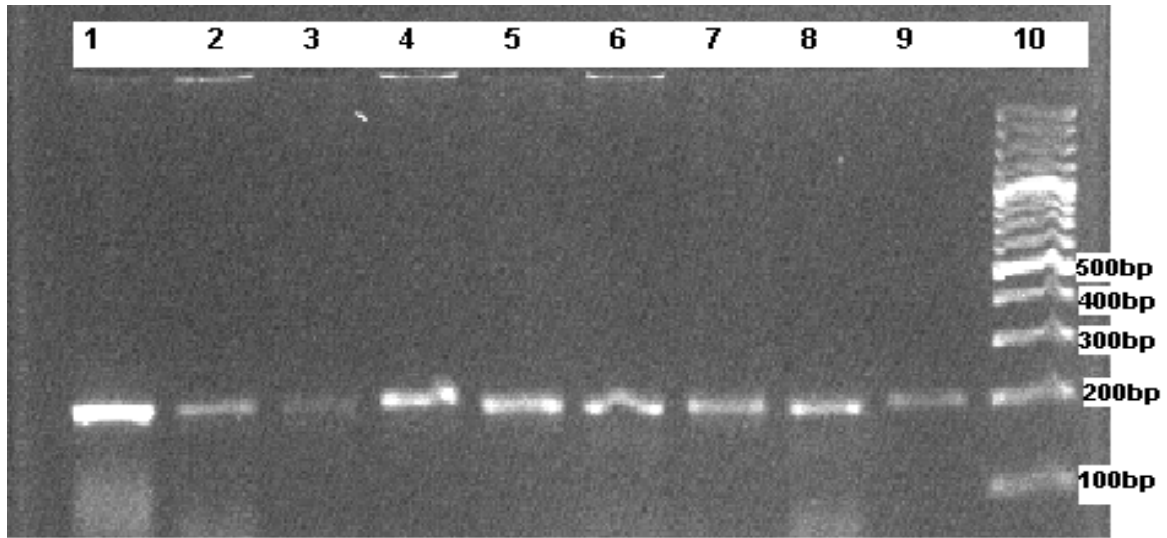
Kullanılan primerlerle yapılan PCR sonunda incelenen tüm örneklerden ve kontrol için kullanılan örneklerle ait DNA’lardan citrullinemia tanısı için elde edilmesi beklenen 185 bp’lik bantlar gözlenmiştir. PCR sonunda elde edilen ürünlerin belirlendiği % 2’lik agaroz jel elektroforezi Şekil 1 de görülmektedir.

PCR sonunda yapılan enzim kesimi sonunda tüm örneklerde 103 ve 82 bp'lik iki bant elde edilmiştir. İncelenen 176 Holştayn sığırı ve 10 baş YK, 10 baş GAK, 10 baş DAK ve 10 baş BI' ait örneklerden hiç birisinin citrullinemia taşıyıcısı olmadığı görülmüştür. PCR ürünlerinin *AvaII* restriksiyon enzim kesimi sonunda yapılan % 3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi ile Şekil 2'deki görüntü elde edilmiştir.

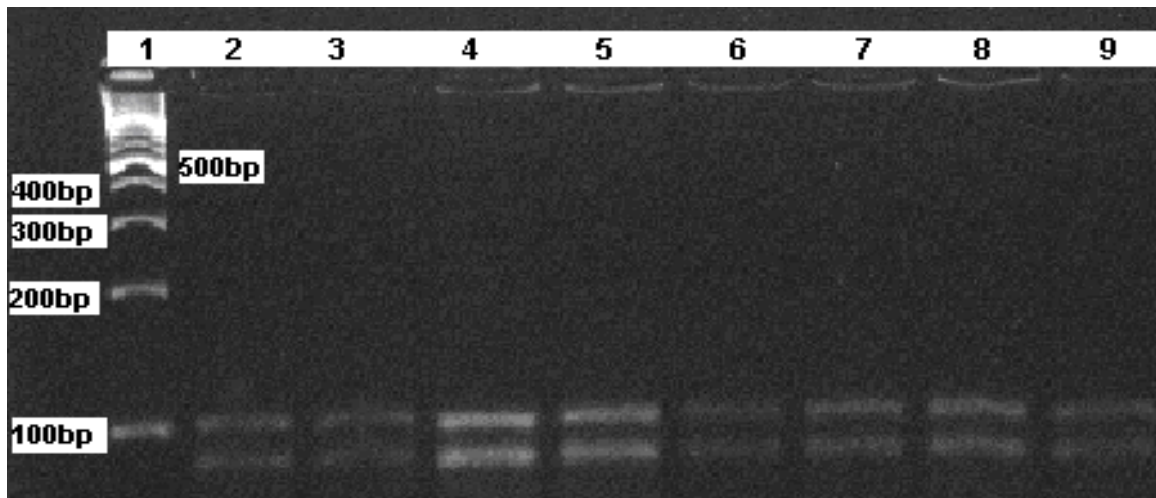
Tartışma ve Sonuç

Holştaynlarda citrullinemia tanısı için PCR'yi takiben yapılan-RFLP testinin tarama amaçlı olarak

kullanılmaya başlanmasından sonra, Avustralya'da doğan her 250 Holştayn buzağıdan birinin citrullinemia hastası olduğu ve yine bu ülkedeki citrullinemia taşıyıcılarının oranının da %10'dan fazla oldukları bildirilmiştir (11). Ancak ABD, İngiltere ve Almanya'da taşıyıcıların oranının Avustralya'daki orandan çok düşük olduğu bildirilmiştir (9, 11). Hindistan'da ise sadece bir taşıyıcı boğa belirlenmiş ve bu boğanın Avustralya'dan ithal edildiği belirlenmiştir (9). Diğer Avrupa ülkelerinden Çek Cumhuriyetinde yetiştirilen Holştayn'larda bu hastalık yönünden taşıyıcı bireylere rastlanılmadığı bildirilmiştir (3). Bu çalışmada, Türkiye'de yetiştirilen



Şekil 1. PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri



Şekil 2. *AvaII* Endonükleaz enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin % 3 NuSieve agaroz jel elektroforezi sonucu citrullinemia açısından genetik yapılarının belirlenmesi. Kuyu 1: 100 bp plus DNA markör (Fermentas), Kuyu 2: DAK, Kuyu 3: BI, Kuyu 4: GAK, Kuyu 5: YK, Kuyu 6: Simmental, Kuyu 7: Holştayn 1♀, Kuyu 8: Holştayn 2♂, Kuyu 9: Holştayn 3♀, 10: Holştayn 4♂.

len Holştayn'larda citrullinemia taşıyıcısı bireylere rastlanılmamıştır. Bu durum bir kalıtsal bozukluk olan citrullinemia'nın yine Holştayn'larda görülen ve süt sığırcılığında önemli ekonomik kayıplara neden olan BLAD, CVM gibi kalıtsal hastalıklar kadar yaygın olmadığına bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Çalışma sonunda elde edilen bulgunun olumlu sonuçlanmasının bir diğer yorumu da dışarıdan ithalat yoluyla gelen ve Türkiye'de kullanılan materyaller ile (sperm ve canlı sığır) bu hastalığın taşınmadığıdır. Ancak bu çalışma ile Türkiye'de yetiştirilen Holştayn'larda citrullinemia alleline rastlanılmamış olması bu kalıtsal hastalığın Türkiye'de yetiştirilen Holştaynlara bulaşmayacağı anlamına gelmez.

Sonuç olarak Türkiye de yetiştirilen Holştayn popülasyonunda citrullinemia alleli bulunamamıştır. Ancak bu durum bu kalıtsal hastalığın Türkiye'de yetiştirilen Holştaynlara hiç bulaşmayacağı anlamına gelmez. Çünkü Türkiye'de yetiştirilen evcil hayvanlarda, gelişmiş ülkelerin daha önce kontrol altına aldığı bir çok kalıtsal hastalık hakkında yeterli bilgi yoktur. Türkiye'de yetiştirilen ve suni tohumlamada kullanılması düşünülen damızlık adaylarında ve annelerinde yokluğunun belgelenmesi zorunlu IBR, BVD, sığır lökozu ve sığır tüberkülozu gibi enfeksiyöz hastalıklar yanında citrullinemia, DUMPS, BLAD, CVM gibi üretimde problem yaratacak kalıtsal hastalıklar yönünden de taşıyıcı olup olmadıklarının belirlenmesi gerektiğini ileri sürebiliriz.

Kaynaklar

1. Agerholm JS, Bendixen C, Arnbjerg J, Andersen O, 2004. Morphological variation of complex vertebral malformation in Holstein calves. *J Vet Diagn Invest*, 16: 548-553.
2. Akyüz B, Ertuğrul O, 2008. Türkiye'de holştayn ve yerli sığırlarda üridin monofosfat sentez eksikliğinin (DUMPS) belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 55: 57-60.
3. Citek J, Rehout V, Hajkova J, Pavkova J, 2006. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Vet Med*, 51(6): 333-339.
4. Fries R, Ruvinsky A, 1999. *The genetics of cattle*, CABI Publishing, Wallingford, Chapter 6, p. 58.
5. Healy PJ, 1996. Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J Anim Sci*, 74:917-922.
6. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Fifth Edition, Academic Press London, p. 36-37.
7. Kehrli M, Shuster DE, Ackerman MR 1992. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell Vet*, 82(2): 103-109.
8. Padeeri M, Vijaykumar K, Grupe S, Narayan MP, Schwerin M, Kumar MH. Incidence of 1999, Hereditary citrullinemia and bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalus*) population. *Arch Tierz*, 42: 347-352.
9. Patel RK, Singh KM, Soni KJ, Jenabhai B, Chauhan JB, Rao KRSS, 2006. Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. *J Appl Genet*, 47: 239-242.
10. Powell RL, Norman HD, Cowan CM, 1996. Relationship of bovine leukocyte adhesion deficiency with genetic merit for performance traits. *J Dairy Sci*, 79: 895-899.
11. Robinson JL, Burns JL, Magura CE, Shanks RD, 1993. Low incidence of citrullinemia carriers among dairy cattle of the United States. *J Dairy Sci*, 76: 853-858.

Yazışma Adresi :

Yrd. Doç. Dr. Bilal AKYÜZ
Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Zootehni ABD
Barış Manço C. Sümer M.38090
Kocasinan, Kayseri,
Tel: 0-352-3380006/175
Fax: 0-352-3372740
E-Mail: bakyuz@erciyes.edu.tr

