



## Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyufbed>



Araştırma Makalesi

### Antalya'daki Keçi ve Koyunların İşkembe Siliyat (Ciliophora, Trichostomatia) Faunası ve İşkembe Siliyatlarının Filogenisi

Gözde GÜRELLİ<sup>\*1</sup>, Nuray YÜRÜCÜOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kastamonu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 37150, Kastamonu, Türkiye

<sup>2</sup>Ali Fuat Darende İlkokulu, 37150, Kastamonu, Türkiye

Gözde GÜRELLİ, ORCID No: 0000-0001-7233-9060,

Nuray YÜRÜCÜOĞLU, ORCID No: 0009-0002-5530-6659

\*Sorumlu yazar e-posta: [ggurelli@kastamonu.edu.tr](mailto:ggurelli@kastamonu.edu.tr)

#### Makale Bilgileri

Geliş: 25.03.2024

Kabul: 07.06.2024

Online Ağustos 2024

DOI: [10.53433/yyufbed.1458622](https://doi.org/10.53433/yyufbed.1458622)

#### Anahtar Kelimeler

Antalya,  
Filogeni,  
İşkembe,  
Keçi,  
Koyun,  
Trichostomatia

**Öz:** Bu çalışmada Antalya'daki keçi (*Capra aegagrus hircus*) ve koyunların (*Ovis aries*) işkembe siliyat faunası tespit edilmiş ve GenBank'tan elde edilen 68 işkembe siliyatına ait 18S rDNA gen dizileri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Antalya'daki 6 keçi ve 11 koyunun işkembesindeki ortalama siliyat yoğunluğu sırasıyla,  $124.0 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$  ve  $46.3 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$ 'dir. Keçide 8 cins, 15 tür ve 6 morfortip, koyunda 8 cins, 19 tür ve 7 morfortip teşhis edilmiştir. *Entodinium simulans* %100 yaygınlıkla tüm keçilerde, *Metadinium affine* ve *Entodinium bursa* ise %16.7 yaygınlıkla tek bir keçiden gözlemlenmiştir. Koyunlarda *Entodinium simulans* %81.8 yaygınlıkla incelenen 11 koyunun 10'unda, *Enoploplastron trilorricatum*, *Entodinium dilobum*, *E. longinucleatum*, *E. rectangulatum*, *E. simplex*, *E. simulans* m. lobosospinosum ise %9.1 yaygınlıkla tek bir koyundan tespit edilmiştir. Keçi ve koyunların işkembe siliyat faunası genelde *Entodinium* spp.'den meydana gelmektedir (keçiler için ortalama nispi bolluk %88.7, koyunlar için ortalama nispi bolluk %52.2). Filogenetik analizlere göre Ophryoscolecidae ailesi içinde Ophryoscolecinae, Entodiniinae ve Diplodiniinae alt-aileleri monofiletik orijine sahiptirler. *Isotricha*, *Dasytricha*, *Ophryoscolex*, *Epidinium*, *Entodinium*, *Diplodinium* ve *Ostracodinium* cinsleri de monofiletik kökenlidir.

### Rumen Ciliate (Ciliophora, Trichostomatia) Fauna of Goats and Sheep in Antalya, and Phylogeny of Rumen Ciliates

#### Article Info

Received: 25.03.2024

Accepted: 07.06.2024

Online August 2024

DOI: [10.53433/yyufbed.1458622](https://doi.org/10.53433/yyufbed.1458622)

#### Keywords

Antalya,  
Goat,  
Phylogeny,  
Rumen,  
Sheep,  
Trichostomatia

**Abstract:** In this study, the rumen ciliate fauna of goats (*Capra aegagrus hircus*) and sheep (*Ovis aries*) in Antalya was detected, and phylogenetic analyses were performed using 18S rDNA gene sequences of 68 rumen ciliates obtained from GenBank. The average ciliate density in the rumen of 6 goats and 11 sheep in Antalya was  $124.0 \times 10^4$  cells  $mL^{-1}$  and  $46.3 \times 10^4$  cells  $mL^{-1}$ , respectively. Eight genera, 15 species, and 6 morphotypes have been identified in goats, and 8 genera, 19 species, and 7 morphotypes in sheep. *Entodinium simulans* was observed in all goats with a prevalence of 100%, while *Metadinium affine* and *Entodinium bursa* were identified in a single goat with a prevalence of 16.7%. *Entodinium simulans* in sheep had a prevalence of 81.8%, and in 10 of the 11 sheep examined, *Enoploplastron trilorricatum*, *Entodinium dilobum*, *E. longinucleatum*, *E. rectangulatum*, *E. simplex*, and *E. simulans* m. lobosospinosum were detected in a single sheep with a prevalence of 9.1%. The rumen ciliate fauna of goats and sheep generally consists of *Entodinium* spp. (the average relative abundance for goats is 88.7%, and the average relative abundance for sheep is 52.2%). According to phylogenetic analyses, the Ophryoscolecinae, Entodiniinae, and Diplodiniinae subfamilies within the family Ophryoscolecidae have a monophyletic origin. The genera *Isotricha*, *Dasytricha*, *Ophryoscolex*, *Epidinium*, *Entodinium*, *Diplodinium*, and *Ostracodinium* are also monophyletic.

## 1. Giriş

İşkembede bulunan protozoonların az bir kısmını kamçılılar, büyük bir çoğunluğunu ise siliyatlar oluşturmaktadır. Sağlıklı hayvanlarda işkembede sayı olarak mililitre başına  $10^5$ – $10^6$  siliyat bulunmaktadır (Ogimoto & Imai, 1981). İşkembede hayvanın sindiremediği selülozu ve nişastayı sindirmeyi sağlayan siliyatlar Litostomatea sınıfına ve Trichostomatia alt-sınıfına dahildirler (Lynn, 2008). Endokommensal olan bu siliyatların mevcudiyeti ilk kez Gruby & Delafond (1843) tarafından tespit edilmiştir. Konakları için patojen olmayan siliyatlar yaşam döngülerinde dayanıklı bir safhaya, yani kistik şekillere sahip değildir. Ayrıca işkembedeki bakterilerle beslendikleri için işkembe ortamında aşırı bakteri çoğalmasını engellemekte, bu sayede konak hayvanın işkembesinde aşırı fermentasyon olayının gerçekleşmesine de engel olmaktadır (Ogimoto & Imai, 1981; Williams & Coleman, 1992). Gün içinde enine ikiye bölünmeyle işkembedeki sayılarını iki katına çıkartmakta ve artan sayı kadarı şirden ve ince bağırsakta sindirilerek azotlu besin olarak konak tarafından kullanılmaktadır (Hungate, 1966). Ergin veya genç geviş getiren konaklara bulaşma, tükürük ile gerçekleşir. Yeni doğduklarında siliyat taşımayan genç geviş getiren hayvanlara işkembe siliyatlarının ilk bulaşması, ya anneleri tarafından yalandıklarında veya ruminasyonla çıkarılan ve protozoon içeren tükürükle bulaşmış besinlerin genç hayvan tarafından yenmesi ile olmaktadır (Dehority, 1986; Göçmen & Özbel, 2001; Moon-van der Staay ve ark., 2014; Vd'ačný, 2018). İşkembe siliyat içeriğinin konakların dağılım alanları ve filogenetik faktörler ile kontrol edildiği Dogiel (1947) tarafından rapor edilmiştir. Tür içeriğinin ayrıca, konakların beslenme habitatları, besin tipi ve miktarı ile de değiştiği bildirilmiştir (Dehority, 1978). Konağın fizyolojik durumu da faunanın oluşmasını sağlayan bir başka faktördür (Ogimoto & Imai, 1981). Son olarak da işkembe siliyatlarının bazı türleri arasında bulunduğu bildirilen antagonizm, fauna içeriğini belirleyen bir başka etken olarak rapor edilmiştir (Eadie, 1957; Imai ve ark., 1978; Gürelli & Mohamed, 2021).

Trichostomatia alt-sınıfına dahil olan işkembe siliyatları Vestibuliferida ve Entodiniomorphida olmak üzere iki takıma, Entodiniomorphida takımı ise Archistomatina, Blepharocorythina ve Entodiniomorphina olarak 3 alt-takıma ayrılır. Vestibuliferida takımı Isotrichidae ailesini, Archistomatina alt-takımı Buetschliidae ailesini, Blepharocorythina alt-takımı Blepharocorythidae ailesini, Entodiniomorphina alt-takımı Ophryoscolecidae ailesini içerir (Lynn, 2008). Ophryoscolecidae ailesi Entodiniinae, Diplodiniinae ve Ophryoscolecinae olmak üzere 3 alt-aileye ayrılır (Lubinsky, 1957).

Bu çalışmada Antalya'daki keçi (*Capra aegagrus hircus*) ve koyunların (*Ovis aries*) işkembe siliyat (Ciliophora, Trichostomatia) faunasının tespit edilmesi, GenBank'tan elde edilen işkembe siliyatlarına ait 18S rDNA gen dizileri kullanılarak filogenetik analizlerinin yapılması ve bu sayede işkembe siliyatlarının filogenisi hakkında bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. İşkembe örneklerinin toplanması ve siliyatlara uygulanan morfolojik yöntemler

Antalya'da bulunan keçi (*C. aegagrus hircus*) ve koyunların (*O. aries*) işkembe siliyat faunasını tespit etmek için Antalya'daki mezbahalarda kesilen ve o yöreye ait olan 6 keçi ve 11 koyundan Ocak 2018-Temmuz 2018 tarihleri arasında taze işkembe içeriği alınmıştır. İşkembe bir bıçak yardımıyla açılarak, işkembe içeriğinden bir miktar temiz bir kavanoza konulup üzerine %18.5'lik formalin eklenmiştir (Dehority, 1984). Formalin ile tespit edilerek laboratuvara getirilen örnekler, hücre ayrıştırma eleklerinden geçirilerek süzülmüştür. Oluşan süzüntü ağzı kapaklı şişeler içine alınarak depo örnekleri olarak saklanmıştır. Formalin ile tespit edilen depo örneklerden bir miktar küçük tüplere alınarak üzerlerine eşit miktarda MFS (metil yeşili formalin salin) solüsyonu ilave edilerek boyama gerçekleştirilmiştir (Ogimoto & Imai, 1981). MFS solüsyonu ile boyanmış olan örnekler, ışık mikroskopunun çeşitli büyütmelerinde incelenerek siliyat türleri teşhis edilmiş ve her bir konaktaki tür çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır. Bazı siliyat türlerindeki iskelet plaklarını gözlemleyebilmek için örnekler %2'lik Lugol'ün iyot solüsyonu ilave edilmiştir. Tür teşhisi yapıldıktan sonra, her bir konaktaki siliyat türlerinin yaygınlığı (Bush ve ark., 1997), nispi bolluğu ve toplam siliyat yoğunluğu hesaplanmıştır (Gürelli, 2017). Siliyat sayımı için Neubauer hemositometresi kullanılmıştır. Sayım işlemi hemositometrenin üzerine 1 damla MFS solüsyonu ile boyanmış örnek konulduktan sonra lamel

kapatılarak mikroskop altında hemositometrenin 4 büyük köşe kare kısmındaki toplam siliyat hücresinin sayılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçları örneğin sulandırma katsayısı ile çarpılarak mililitredeki siliyat sayısı hesaplanmıştır ( $N = 10/4 \times a \times d$ , N: toplam siliyat yoğunluğu, a: hemositometrenin 4 köşe kare kısmındaki toplam siliyat sayısı, d: sulandırma katsayısı). İşkembe siliyatlarının istatistiksel hesaplanmasında SPSS istatistik programı kullanılmıştır (Gürelli ve ark., 2016; Gürelli & Mohamed, 2021).

Türlerin teşhisinde ve sınıflandırılmasında Dogiel (1927), Ogimoto & Imai (1981), Dehority (1993), Öktem ve ark. (1997) ve Lynn (2008)'in çalışmalarından faydalanılmıştır.

## 2.2. Filogenetik yöntemler

İç grup olarak 68 işkembe siliyatına ait 18S rDNA gen dizileri ve dış grup olarak *Spathidium papilliferum*'un 18S rDNA gen dizisi GenBank'tan elde edilmiştir. Gen dizilerine ait asession numaraları Şekil 1'de verilmiştir. Siliyatlara ait gen dizileri Mega7 programında Clustal W implement algoritması kullanılarak hizalanmıştır (Kumar ve ark., 2016). Anormal hizalanmış bölgeler Gblocks v.091b programı kullanılarak hizalanmış diziden uzaklaştırılmıştır (Talavera & Castresana, 2007). Maksimum olabilirlik (ML) analizi IQ-Tree web sunucusunda IQ-Tree v.1.6.12 programında yapılmıştır (Nguyen ve ark., 2015; Trifinopoulos ve ark., 2016). ML analizi için en uygun model IQ-Tree programı tarafından belirlenen GTR+F+I+G4 modeli ile 1.000 bootstrap olarak yapılmıştır (Kalyaanamoorthy ve ark., 2017; Hoang ve ark., 2018). Bayesian Çıkarılması (BI) analizi MrBayes v.3.2.7 programı ile GTR+G+I evrimsel modeli kullanılarak yapılmıştır (Ronquist ve ark., 2012). Bayesian çıkarılması 1.000.000 jenerasyon ve her 500 jenerasyonda 1 örnekleme yapılacak şekilde dizayn edilmiştir. Elde edilen filogenetik ağacın ilk ve son %25'lik kısmı yakılarak kalan ağaçlardan konsensüs ağacı oluşturulmuştur. Her iki analiz (ML ve BI) ile oluşturulan filogenetik ağaçlar FigTree v1.4.3 programı ile kontrol edildikten sonra tek bir ağaç (ML ağacı) üzerinde nod değerleri ile birlikte birleştirilmiştir.

## 3. Bulgular

### 3.1. İşkembe örneklerindeki siliyat kompozisyonu

Antalya'daki 6 keçi ve 11 koyunun işkembesindeki ortalama siliyat yoğunluğu ( $\pm$  standart sapma) sırasıyla,  $124.0 \pm 46.1 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$  (minimum-maksimum değer,  $136.5-199.0 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$ ) ve  $46.3 \pm 63.1 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$  (minimum-maksimum değer,  $0-157.0 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$ )'dir. Bir koyunun (5 no'lu) işkembesinde herhangi bir siliyat türü tespit edilememiştir. Keçi başına düşen tür sayısı 3.0-14.0 (ortalama,  $8.5 \pm 4.3$ ), koyun başına düşen tür sayısı ise 0-16.0 (ortalama,  $5.5 \pm 4.9$ )'dir.

Keçide 8 cins, 15 tür ve 6 morfortip, koyunda 8 cins, 19 tür ve 7 morfortip teşhis edilmiştir. *Entodinium simulans* %100 yaygınlıkla tüm keçilerde, *Metadinium affine* ve *E. bursa* ise %16.7 yaygınlıkla tek bir keçiden gözlemlenmiştir. Koyunlarda *E. simulans* %81.8 yaygınlıkla incelenen 11 koyunun 10'unda, *Enoploplastron triloricastrum*, *Entodinium dilobum*, *E. longinucleatum*, *E. rectangulatum*, *E. simplex* ve *E. simulans m. lobosospinosum* ise %9.1 yaygınlıkla tek bir koyundan tespit edilmiştir. Keçi ve koyunların işkembe siliyat faunası genelde *Entodinium* spp.'den meydana gelmektedir (keçiler için ortalama nispi bolluk %88.7, koyunlar için ortalama nispi bolluk %52.2) (Çizelge 1).

### 3.2. Filogenetik analiz

Bu çalışmada 68 işkembe siliyatına ait 18S rDNA gen dizileri ve dış grup olarak *Spathidium papilliferum*'un 18S rDNA gen dizisi kullanılarak Maksimum Olabilirlik (ML) ve Bayesian Çıkarılması (BI) analizleri ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Her iki algoritma ile oluşturulan filogenetik ağaçlar topolojik olarak birbirlerine çok benzer olduklarından analiz sonuçları ML ağacı üzerinde BI düğüm (nod) değerleri gösterilerek verilmiştir (Şekil 1).

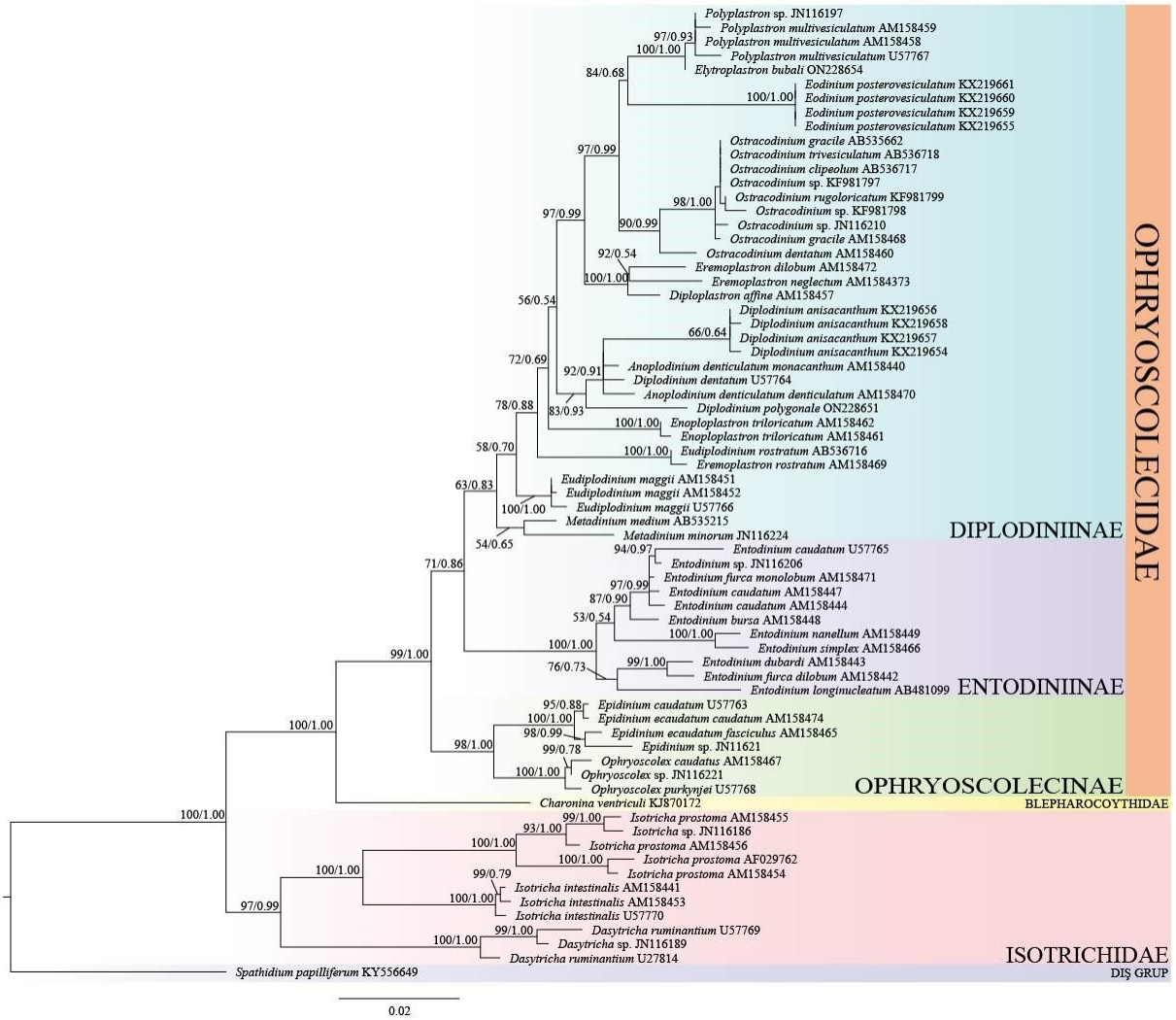
Çizelge 1. Antalya'daki 6 keçinin ve 11 koyunun işkembe içeriğindeki siliyatların yaygınlığı ve nispi bolluğu (SD: standart sapma)

Cins/Tür/Morfotip	Keçi		Koyun	
	Yaygınlık (%)	Nispi Bolluk (%) Ortalama ± SD (min.-maks. değer)	Yaygınlık (%)	Nispi Bolluk (%) Ortalama ± SD (min.-maks. değer)
<i>Dasytricha</i> Schuberg, 1888	83.3	3.8 ± 3.1 (0-7.8)	45.5	3.8 ± 6.7 (0-22.6)
<i>D. ruminantium</i> Schuberg, 1888	83.3	3.8 ± 3.1 (0-7.8)	45.5	3.8 ± 6.7 (0-22.6)
<i>Enoploplastron</i> Kofoid & MacLennan, 1932	-	-	9.1	0.2 ± 0.7 (0-2.2)
<i>E. trilorica</i> Dogiel, 1925	-	-	9.1	0.2 ± 0.7 (0-2.2)
<i>Entodinium</i> Stein, 1859	100	88.7 ± 6.9 (80.7-99.3)	81.8	52.2 ± 37.4 (0-97.2)
<i>E. bursa</i> Stein, 1858	16.7	0.5 ± 1.3 (0-3.2)	27.3	1.8 ± 4.3 (0-14.4)
<i>E. dilobum</i> (Dogiel, 1927)	50	1.3 ± 1.5 (0-3.0)	9.1	2.0 ± 6.7 (0-22.3)
<i>E. ellipsoideum</i> (Kofoid & MacLennan, 1930)	50	3.4 ± 3.9 (0-8.6)	27.3	3.0 ± 5.5 (0-14.3)
<i>E. exiguum</i> Dogiel, 1925	66.7	11.1 ± 8.8 (0-17.9)	27.3	2.8 ± 5.1 (0-12.9)
<i>E. longinucleatum</i> Dogiel, 1925	83.3	7.9 ± 4.3 (0-11.8)	9.1	0.4 ± 1.4 (0-4.6)
<i>E. minimum</i> Schuberg, 1888	-	-	27.3	5.2 ± 10.7 (0-33.3)
<i>E. nanellum</i> Dogiel, 1923	66.7	12.9 ± 11.6 (0-27.8)	27.3	6.0 ± 10.4 (0-24.4)
<i>E. rectangulatum</i> Kofoid & MacLennan, 1930	-	-	9.1	0.2 ± 0.7 (0-2.1)
<i>m. rectangulatum</i> Kofoid & MacLennan, 1930	-	-	9.1	0.2 ± 0.7 (0-2.1)
<i>E. semahatae</i> Öktem ve ark., 1997	-	-	9.1	0.1 ± 0.3 (0-1.0)
<i>E. simplex</i> (Dogiel, 1925)	-	-	9.1	1.3 ± 4.4 (0-14.5)
<i>E. simulans</i> Lubinsky, 1957	100	50.7 ± 28.6 (17.9-99.3)	81.8	36.0 ± 34.5 (0-85.0)
<i>m. dubardi</i> Lubinsky, 1957	66.7	19.9 ± 17.6 (0-45.6)	54.5	30.7 ± 36.6 (0-85.1)
<i>m. lobosospinosum</i> Lubinsky, 1957	66.7	6.5 ± 6.9 (0-18.3)	9.1	0.4 ± 1.2 (0-4.1)
<i>m. caudatum</i> Lubinsky, 1957	100	24.3 ± 7.0 (17.0-35.4)	36.4	4.9 ± 8.5 (0-25.8)
<i>Epidinium</i> Crawley, 1923	66.7	3.7 ± 5.9 (0-14.3)	45.5	7.3 ± 13.5 (0-44.4)
<i>E. ecaudatum</i> (Fiorentini, 1889)	66.7	3.7 ± 5.9 (0-14.3)	45.5	7.3 ± 13.5 (0-44.4)
<i>m. ecaudatum</i> (Fiorentini, 1889)	50	0.9 ± 1.8 (0-4.6)	45.5	4.7 ± 9.8 (0-33.3)
<i>m. caudatum</i> (Fiorentini, 1889)	66.7	1.4 ± 2.0 (0-4.8)	27.3	2.7 ± 4.7 (0-11.3)
<i>Isotricha</i> Stein, 1858	66.7	1.7 ± 2.0 (0-4.3)	72.7	17.7 ± 23.6 (0-66.7)
<i>I. intestinalis</i> Stein, 1858	66.7	0.5 ± 0.5 (0-1.1)	18.2	2.3 ± 6.4 (0-21.4)
<i>I. prostoma</i> Stein, 1858	50	1.2 ± 1.5 (0-3.2)	72.7	15.4 ± 23.7 (0-66.7)
<i>Metadinium</i> Awerinzew & Mutafova, 1914	16.7	0.2 ± 0.4 (0-1.0)	18.2	1.0 ± 2.0 (0-7.1)
<i>M. affine</i> (Dogiel & Fedorowa, 1925)	16.7	0.2 ± 0.4 (0-1.0)	18.2	1.0 ± 2.0 (0-7.1)
<i>Ophryoscolex</i> Stein, 1858	50	0.5 ± 1.1 (0-2.8)	18.2	0.5 ± 1.2 (0-3.8)
<i>O. caudatus</i> Eberlein, 1895	50	0.5 ± 1.1 (0-2.8)	18.2	0.5 ± 1.2 (0-3.8)
<i>m. tricornatus</i> Dogiel, 1927	50	0.5 ± 1.1 (0-2.8)	18.2	0.5 ± 1.2 (0-3.8)
<i>Polyplastron</i> Dogiel, 1927	50	0.9 ± 1.0 (0-2.1)	27.3	1.1 ± 2.3 (0-7.3)
<i>P. multivesiculatum</i> (Dogiel & Fedorowa, 1923)	50	0.9 ± 1.0 (0-2.1)	27.3	1.1 ± 2.3 (0-7.3)

Filogenetik ağaçlarda, vestibuliferid ve entodiniomorphid siliyatlar iki monofiletik klad oluşturmuş ve bu kladların ayrımı her iki analizde tam desteklenmiştir (ML/BI, %100/1.00). Vestibuliferid siliyatlar *Dasytricha ruminantium* ve *Isotricha* spp. olmak üzere 2 alt kümeye ayrılır (ML/BI, %97/0.99). *Dasytricha ruminantium* kümesi *Isotricha* spp. kümesine bazal olarak bağlanmaktadır. *Isotricha* spp.'den oluşan küme 2 dala ayrılmakta, *Isotricha intestinalis* kümesini oluşturan dal *Isotricha prostoma* kümesini oluşturan dala bazal olarak bağlanmaktadır (ML/BI, %100/1.00). Blepharocorythina alt-takımı ve Blepharocorythidae ailesine dahil *Charonina ventriculi* Entodiniomorphina alt-takımı ve Ophryoscolecidae ailesine dahil işkembe siliyatlarına her iki analiz ile tam desteklenerek bazal olarak bağlanmaktadır (ML/BI, %100/1.00). Ophryoscolecinae alt-ailesi Ophryoscolecidae ailesi içerisinde ve onun kaidesinde monofiletik bir klad oluşturmaktadır. Bu kladın ayrımı ML analizi ile çok güçlü, BI analizi ile tam desteklenmektedir (ML/BI, %99/1.00). Ophryoscolecinae alt-ailesi de *Epidinium* spp. ve *Ophryoscolex* spp. olmak üzere iki küme oluşturmaktadır. *Epidinium* spp. ve *Ophryoscolex* spp. popülasyonlarının oluşturdukları kümeler ML analizi ile çok güçlü, BI analizi ile tam desteklenerek birbirlerinden farklılaşırlar (ML/BI, %98/1.00). Ophryoscolecidae ailesi içinde yer alan Entodiniinae alt-ailesi ve Diplodiniinae alt-ailesi birbirlerinden orta derecede güçlü destek ile farklılaşmış (ML/BI, %71/0.86) ve her iki alt-aile monofiletik bir klad oluşturmuştur. Entodiniinae alt-ailesinde bulunan *Entodinium longinucleatum*, *E. furca dilobum* (sin. *E. dilobum*), *Entodinium dubardi* bir küme oluşturmakta ve bu küme *E. simplex*, *E. nanellum*, *E. bursa*, *Entodinium caudatum*, *E. furca monolobum* (sin. *E. monolobum*), *Entodinium* sp., *E. caudatum*'dan oluşan kümeden her iki analiz ile tam ayrılmaktadır (ML/BI, %100/1.00). Diplodiniinae alt-ailesine



dahil *Metadinium minorum* ve *M. medium* kardeş taksonlar olarak bir küme oluşturmakta ve bu küme *Eudiplodinium maggii* ile birbirlerinden ML analizi ile zayıf, BI analizi ile orta derecede güçlü destek ile farklılaşırlar (ML/BI, %63/0.83). *Eudiplodinium maggii* ve *Eremoplastron rostratum* (sin. *Eudiplodinium rostratum*) birbirlerinden ML analizi ile zayıf, BI analizi ile orta derecede güçlü destek ile ayrılırlar (ML/BI, %58/0.70). *Eudiplodinium rostratum* ve *Enoploplastron triloricastrum* birbirlerinden orta derecede güçlü bir destek ile farklılaşırlar (ML/BI, %78/0.88). *Diplodinium* spp.; *Diplodinium polygonale*, *Anoploplodinium denticulatum denticulatum* (sin. *Diplodinium dentatum*), *Diplodinium dentatum*, *Anoploplodinium denticulatum monocanthum* (sin. *Diplodinium anisacanthum* m. monocanthum), *Diplodinium anisacanthum* bir küme oluşturmakta ve bu küme, *Diploplastron affine* (sin. *Metadinium affine*), *Eremoplastron neglectum* (sin. *Eudiplodinium neglectum*) ve *Eremoplastron dilobum* (sin. *Eudiplodinium dilobum*)'un oluşturduğu kümeyle birbirlerinden her iki analiz ile zayıf desteklenerek ayrılırlar (ML/BI, %56/0.54). *Ostracodinium* spp.; *Ostracodinium dentatum* (sin. *Ostracodinium mammosum*), *O. gracile*, *Ostracodinium* sp., *O. rugoloricastrum*, *O. clipeolum* ve *O. trivesiculatum* bir küme oluşturmakta ve bu küme *Eodinium postero-vesiculatum*'dan her iki analiz ile çok güçlü desteklenerek birbirlerinden farklılaşırlar (ML/BI, %97/0.99). *Eodinium postero-vesiculatum* ve *Elytroplastron bubali* birbirlerinden ML analizi ile güçlü, BI analizi ile orta derecede güçlü bir destek ile ayrılırlar (ML/BI, %84/0.68). *Elytroplastron bubali* ve *Polyplastron multivesiculatum* her iki analiz ile tam desteklenerek birbirlerinden farklılaşırlar (ML/BI, %100/1.00).



Şekil 1. İşkembe siliyatlarına ait 18SrDNA gen dizilerinin ML ve BI analizlerine dayalı filogenisi. Nod değerleri ML/BI çıkarması sonuçlarını içermektedir. Bar her 100 nükleotidde 2 baz değişimini göstermektedir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, keçilerden 8 cins, 15 tür ve 6 morfotip, koyunlardan 8 cins, 19 tür ve 7 morfotip tespit edilmiştir. Yeni bir tür veya ülkemizden ilk kayıt tür rapor edilememiştir, gözlemlenen türler daha önce ülkemizdeki keçi ve koyunlardan teşhis edilmiştir (Öktem ve ark., 1997; Göçmen ve ark., 1999; Göçmen ve ark., 2005; Gürelli, 2014; Gürelli, 2017; Berber & Gürelli, 2019).

Antalya'daki keçilerin işkembesinde bulunan ortalama siliyat yoğunluğu ( $124.0 \pm 46.1 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$ ) İzmir'deki (Gürelli, 2014) ve Türkiye'nin güneydoğusundaki (Göçmen ve ark., 2005) keçilerden daha fazladır. Antalya'daki koyunların işkembesinden tespit edilen ortalama siliyat yoğunluğu ( $46.3 \pm 63.1 \times 10^4$  hücre  $mL^{-1}$ ) İzmir'deki (Öktem ve ark., 1997; Göçmen ve ark., 1999; Gürelli, 2017) ve Kastamonu'daki (Berber & Gürelli, 2019) koyunlardan daha azdır. Siliyat yoğunluk değerlerindeki varyasyon konak hayvanlardan, tükettiği besinin cinsi ve miktarındaki farklılıklardan coğrafi dağılımından veya bu faktörlerin birleşiminden meydana gelebilir (Imai ve ark., 1989; Ito & Imai, 1990; Gürelli, 2016; Gürelli & Mohamed, 2021).

Antalya'daki keçi ve koyunların işkembe içeriğinde *Entodinium* türleri baskın olarak bulunması keçi ve koyunların beslenme alışkanlıklarından kaynaklanmış olabilir. Keçi ve koyunlar ara beslenici (fırsatçı beslenici) hayvanlar olmalarına rağmen, keçiler yaprak, çalı ve ağaç sürgünleriyle, koyunlar ise çoğunlukla ot, çayır ve otsu çiçekli bitkilerle beslenmektedir (Ito ve ark., 1995; Gurung ve ark., 2002; Burrit & Frost, 2006; Cannas & Pulina, 2008). Ara beslenici hayvanların işkembesi *Entodinium* türlerinin gelişmesi için daha uygun çevresel faktörler içerebilir (Ito ve ark., 1993). Eğer konak hayvan yüksek konsantrasyonla beslenirse, *Entodinium* türleri daha hızlı büyümekte ve neticede *Entodinium* türlerinin kompozisyon oranı ve toplam yoğunluğu daha fazla olmaktadır (Hungate, 1966). *Entodinium* türleri için başlıca enerji kaynağı nişastadır (Kurihara ve ark., 1978). Farklı konak hayvanlar tarafından tüketilen besinin seçimi ve miktarı işkembe siliyat faunası üzerinde önemli faktörlerdir (Dehority, 1974; Ito ve ark., 1993). Bunun yanında *Entodinium* türleri bütün geniş getiren hayvanlarda geniş bir dağılıma sahiptir ve bu sebeple işkembedeki baskın türleri oluşturmaktadır (Imai, 1988; Gürelli ve ark., 2016). *E. simulans*'ın keçilerde ve koyunlarda en çok tür (%100 ve %81.8) olarak tespit edilmesinin nedeni, *E. simulans*'ın geniş bir dağılıma sahip olması yada konakların diyetleri olabilir. *Enoploplastron triloricastrum*, *Entodinium minimum*, *E. rectangulatum*, *E. semahatae* ve *E. simplex* koyunlardan teşhis edilmesine rağmen, keçilerden gözlemlenememiştir. Bu durum daha az konak sayısıyla çalışılmasından kaynaklanmış olabilir. Antalya'daki koyunlarda kaudal ışsızsız *E. simulans* morfotipinin daha fazla bulunmasına rağmen, keçilerde ise kaudal ışsınlı *E. simulans* morfotipi daha fazla tespit edilmiştir. Konaklar düşük nişasta değerli bir diyet ile beslenirse kaudal ışsızsız siliyatlar daha baskın olmakta, konaklar zengin nişasta değerli bir diyet ile beslendiğinde iyi gelişmiş kaudal ışsınlı siliyatlar baskın hale gelmektedir (Lubinsky, 1957). *Entodinium* ve *Epidinium* türlerinin kaudal ışın geliştirmelerinin nedeni olarak *Entodinium bursa* ve *Polyplastron multivesiculatum*'un predatör davranışlarına karşı korunmaya çalışmak olarak düşünülmektedir, çünkü *E. bursa* ve *P. multivesiculatum* daha büyük ve karnivor türlerdir (Coleman ve ark., 1977). Fakat ışın geliştirmenin tam nedeni bilinmemektedir. Geviş getiren hayvanların işkembesindeki siliyat popülasyonu 4 tipe ayrılmaktadır. Bütün tipler *Entodinium*, *Dasytricha* ve *Isotricha* cinslerini içermektedir. A-tip siliyat popülasyonu *P. multivesiculatum*'u ve genellikle fakat her zaman olmamakla birlikte *Metadinium affine*'i içermektedir. B-tip siliyat popülasyonu *Epidinium* türünü, *Eudiplodinium maggii*'yi veya her iki türü birlikte içermektedir. K-tip siliyat popülasyonu *Elytroplastron bubali*'yi içermekte ve sığırlarda bulunmaktadır. O-tip siliyat popülasyonu sadece *Entodinium*, *Isotricha* ve *Dasytricha*'yı içermektedir. *Polyplastron multivesiculatum*'un predatör aktivitesi nedeniyle A-tip siliyat popülasyonu ve B-tip siliyat popülasyonu aynı konakta bulunmamaktadır. *Polyplastron multivesiculatum*, *Epidinium* türünü ve *Eudiplodinium maggii*'yi yok etmektedir (Eadie, 1957; Eadie, 1962; Imai ve ark., 1978; Imai ve ark., 1979; Ogimoto & Imai, 1981; Williams & Coleman, 1992). Antalyada'ki keçilerin 3'ü A-tip, 2'si B-tip ve 1'i O-tip popülasyona, koyunların ise 3'ü A-tip, 5'i B-tip ve 2'si O-tip popülasyona sahiptirler.

Her iki analiz (ML ve BI) ile elde edilen filogenetik ağaçlarda *Isotricha prostoma* kümesi içerisinde yer alan *Isotricha prostoma* popülasyonları (AM158454 ve AM158455) birbirlerinden genetik olarak oldukça uzak konumlanmıştır. Bu durum siliyat popülasyonlarının elde edildiği konaklar ile bu konakların coğrafi dağılımlarının farklı olması ve her konağın farklı seçim baskısına maruz kalmasından dolayı simbiyontu oldukları siliyatlarda da tür içi genetik farklılaşmanın devam ettiğini işaret etmektedir. *Metadinium minorum* ve *M. medium* kardeş pozisyonda konumlanmış olmalarına

rağmen *M. minorum*'da genetik farklılaşma daha fazladır. *Diplodinium polygonale* diğer *Diplodinium* spp. popülasyonları ile bir küme oluşturmakta fakat *D. polygonale* bu kümeye bazal olarak bağlanmaktadır. Bu durum *D. polygonale*'nin diğer *Diplodinium* spp. popülasyonlarından genetik olarak farklı olduğunu ve daha atasal konumda olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde *Ostracodinium dentatum* (sin. *Ostracodinium mammosum*) diğer *Ostracodinium* spp. popülasyonlarının oluşturduğu kümeye bazal olarak bağlandığı için bu popülasyonlardan genetik olarak farklılaşmış ve daha atasal konumdadır. (Şekil 1).

Bu çalışmadaki filogenetik analizlere göre Ophryoscolecidae ailesi içinde Ophryoscolecinae, Entodiniinae ve Diplodiniinae alt-aileleri monofiletik orijine sahiptirler ve Lubinsky (1957)'nin Ophryoscolecidae ailesini morfolojik sistematiğe göre 3 alt-aileye ayırma hipotezi filogenetik ağaca göre desteklenmektedir, ayrıca Cedrola ve ark. (2022) ile Rossi ve ark. (2015)'in çalışmalarıyla da uygunluk göstermektedir. *Dasytricha*, *Isotricha*, *Ophryoscolex*, *Epidinium*, *Entodinium*, *Diplodinium* ve *Ostracodinium* cinsleri de monofiletik kökenlidir (Şekil 1).

Sonuç olarak işkembe siliyat faunasının oluşumunda konak türün beslenme alışkanlıkları, filogenetik faktörleri, coğrafi dağılımları, işkembedeki pH, antagonizm ve siliyat türleri arasındaki transfaunasyon önemli etkilere sahiptir.

## Kaynakça

- Berber, B., & Gürelli, G. (2019). Rumen ciliate fauna of domestic sheep in Kastamonu, Turkey and infraciliature of *Diplodinium quinquespinosum*, *Metadinium affine*, and *M. tauricum* (Entodiniomorpha, Ophryoscolecidae). *Zootaxa*, 4695(6), 550–558. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.6.5>
- Burritt, E., & Frost, R. (2006). Chapter 2: Animal behaviour principles and practices. In: K. L. Launchbaugh, J. W. Walker, & R. J. Daines (Eds), *Targeted grazing: A natural approach to vegetation management and landscape enhancement* (pp. 10–21). Englewood: American Sheep Industry Association.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Cannas, A., & Pulina, G. (2008). *Dairy goats feeding and nutrition*. CAB International.
- Cedrola, F., Senra, M. V. X., Fregulia, P., D'Agosto, M., & Dias, R. J. P. (2022). Insights into the systematics of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorpha). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69, e12915. <https://doi.org/10.1111/jeu.12915>
- Coleman, G. S., Laurie, J. I., & Bailey, J. E. (1977). The cultivation of the rumen ciliate *Entodinium bursa* in the presence of *Entodinium caudatum*. *Journal of General Microbiology*, 101, 253–258. <https://doi.org/10.1099/00221287-101-2-253>
- Dehority, B. A. (1974). Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (*Alces americana*), musk-ox (*Ovibos moschatus*) and Dall mountain sheep (*Ovis dalli*). *Journal of Protozoology*, 21, 26–32. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03612.x>
- Dehority, B. A. (1978). Specificity of rumen ciliate protozoa in cattle and sheep. *Journal of Protozoology*, 25(4), 509–513. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1978.tb04177.x>
- Dehority, B. A. (1984). Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 182–185. <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.182-185.1984>
- Dehority, B. A. (1986). Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. *Insect Science and Its Application*, 7, 279–296. <https://doi.org/10.1017/S1742758400009346>
- Dehority, B. A. (1993). *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. CRC Press.
- Dogiel, V. A. (1927). Monographie der familie Ophryoscolecidae. *Archiv für Protistenkunde*, 59, 1–288.
- Dogiel, V. A. (1947). The phylogeny of the stomach infusorians of ruminants in the light of paleontological and parasitological data. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 88(3), 337–343. <https://doi.org/10.1242/jcs.s3-88.3.337>



- Eadie, J. M. (1957). The mid-winter rumen microfauna of the seaweed-eating sheep of North Ronaldshay. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B* 66(3), 276–287. <https://doi.org/10.1017/S0080455X00010055>
- Eadie, J. M. (1962). The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *Journal of General Microbiology*, 29, 563–578. <https://doi.org/10.1099/00221287-29-4-563>
- Göçmen, B., & Özbek, Y. (2001). İşkembede yaşayan kamçılı (Mastigophora) ve holotriş siliyat (Ciliophora) protozoonlar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 25(4), 405–425.
- Göçmen, B., Rastgeldi, S., Karaoğlu, A., & Aşkan, H. (2005). Rumen ciliated protozoa of the Turkish domestic goats (*Capra hircus* L.). *Zootaxa*, 1091(1), 53–64. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1091.1.4>
- Göçmen, B., Torun, S., & Öktem, N. (1999). Türkiye evcil koyun (*Ovis ammon aries*)'lerinin işkembe siliyat (Protozoa: Ciliophora) faunası hakkında bir ön çalışma: II- Familia Ophryoscolecidae (Entodiniomorpha). *Doğa-Turkish Journal of Zoology*, 23, 473–490.
- Gruby, D., & Delafond, O. (1843). Recherches sur des animalcules su developpant en gland nombre dens l'estomac et les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Comptes Rendus Academy Science Paris*, 17, 1304–1308.
- Gurung, Y. B., Parajuli, N., Miyazaki, Y., Imai, S., & Kobayashi, K. (2002). Rumen ciliate faunae of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and goat (*Capra hircus*) in Nepal. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 265–267. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.265>
- Gürelli, G. (2014). Rumen ciliate fauna (Ciliophora, Protista) of Turkish domestic goats living in İzmir, Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 136–143. <https://doi.org/10.3906/zoo-1303-21>
- Gürelli, G. (2016). Rumen ciliates of domestic cattle (*Bos taurus taurus*) in Kastamonu, Turkey with the description of a new species. *European Journal of Protistology*, 56, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.07.002>
- Gürelli, G. (2017). Rumen ciliate fauna of domestic sheep (*Ovis aries*) in İzmir, Turkey and scanning electron microscopic observations. *Zootaxa*, 4286(4), 545–554. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4286.4.7>
- Gürelli, G., Canbulat, S., Aldayarov, N., & Dehority, B.A. (2016). Rumen ciliate protozoa of domestic sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra aegagrus hircus*) in Kyrgyzstan. *FEMS Microbiology Letters*, 363, fnw028. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw028>
- Gürelli, G., & Mohamed, A. R. A. (2021). Comparative study of rumen ciliate fauna of goat and sheep in Libya. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 45(4), 274–279. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.39974>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 3, 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Hungate, R. E. (1996). *The rumen and its microbes*. Academic Press.
- Imai, S. (1988). Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. *Journal of Protozoology*, 35, 130–136. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1988.tb04092.x>
- Imai, S., Han, S. S., Cheng, K. J., & Kudo, H. (1989). Composition of the rumen ciliate population in experimental herds of cattle and sheep in Lethbridge, Alberta, Western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 686–90. <https://doi.org/10.1139/m89-112>
- Imai, S., Katsuno, M., & Ogimoto, K. (1978). Distribution of rumen ciliate protozoa in cattle, sheep and goat and experimental transfaunation of them. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 49(7), 494–505. <https://doi.org/10.2508/chikusan.49.494>
- Imai, S., Katsuno, M., & Ogimoto, K. (1979). Type of the pattern of the rumen ciliate composition of the domestic ruminants and the predator-prey interaction of ciliates. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 50(2), 79–87. <https://doi.org/10.2508/chikusan.50.79>
- Ito, A., & Imai, S. (1990). Ciliated protozoa in the rumen of Holstein–Friesian cattle (*Bos taurus taurus*) in Hokkaido, Japan, with the description of two new species. *Zoological Science*, 7, 449–458.
- Ito, A., Imai, S., Manda, M., & Ogimoto, K. (1995). Rumen ciliates of Tokara native goat in Kagoshima, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57, 355–357. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.355>



- Ito, A., Imai, S., & Ogimoto, K. (1993). Rumen ciliates of ezo deer (*Cervus nippon yesoensis*) with the morphological comparison with those of cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *55*, 93–98. <https://doi.org/10.1292/jvms.55.93>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. F. K., & Von Haeseler, A. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*, 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K., (2016). MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kurihara, Y., Takechi, T., & Shibata, F. (1978). Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen of sheep fed on a purified diet. *The Journal of Agricultural Science*, *90*, 373–381. <https://doi.org/10.1017/S0021859600055489>
- Lubinsky, G. (1957). Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae III. Phylogeny of the Ophryoscolecidae based on their comparative morphology. *Canadian Journal of Zoology*, *35*, 141–159. <https://doi.org/10.1139/z57-009>
- Lynn, D. H. (2008). *The ciliated protozoa: Characterization, classification and guide to the literature* (3rd ed.). Springer.
- Moon-van der Staay, S. Y., van der Staay, G. W. M., Michalowski, T., Jauany, J.-P., Pristas, P., Javorský, P., ... & Hackstein, J. H. P. (2014). The symbiotic intestinal ciliates and the evolution of their hosts. *European Journal of Protistology*, *50*, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.01.004>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Ogimoto, K., & Imai, S. (1981). *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press.
- Öktem, N., Göçmen, B., & Torun, S. (1997). Türkiye evcil koyun (*Ovis ammon aries*)'larının işkembe siliyat (Protozoa: Ciliophora) faunası hakkında bir ön çalışma: I. Familya Isotrichidae (Trichostomatida) ve Entodiniidae (Entodiniomorpha). *Turkish Journal of Zoology*, *21*, 475–502.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rossi, M. F., Dias, R. J. P., Senra, M. V. X., Martinele, I., Soares, C. A. G., & D'Agosto, M. (2015). Molecular phylogeny of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) inferred from 18S rDNA Sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *62*, 584–590. <https://doi.org/10.1111/jeu.12211>
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, *56*, 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B.Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, *44*, 232–235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Vd'ačný, P. (2018). Evolutionary associations of endosymbiotic ciliates shed light on the timing of the marsupial-placental split. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1757–1769. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy071>
- Williams, A. G., & Coleman, G. S. (1992). *The rumen protozoa*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>