

Kayseri Bölgesinde Yetiştirilen Şarole Irkı Sığırlarda ve Türkiye Yerli Sığır Irklarında Miyofosforilaz Eksikliği (Glikojen Depo Hastalığı Tip V) Allelinin PCR-RFLP ile Belirlenmesi

Bilal AKYÜZ¹, Davut BAYRAM¹, Okan ERTUGRUL², 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 saf ve melez Şarole ırkı sığırlar ile Türkiye yerli sığır ırklarında miyofosforilaz eksikliği allelinin bulunup bulunmadığının araştırılmasıdır. Araştırmada, on baş Şarole, 15 baş Şarole-Simmnetal melezi, 20 baş Yerli Kara, 20 baş Boz Irk, 20 baş Güney Anadolu Kırmızısı, 20 baş Doğu Anadolu Kırmızısı ve kontrol grubu olarak da 20 baş Simmental sığırı toplam 125 sığır kullanılmıştır. PCR ürünleri *StyI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Elde edilen parçacıklarda *StyI* restriksiyon bölgesinin varlığı veya yokluğu % 3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi ile bakılmıştır. İncelenen Şarole, Şarole melezi ve yerli sığırlarda miyofosforilaz eksikliği alleline rastlanılmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Kalıtsal hastalık, miyofosforilaz, RFLP, Şarole

Detection of Myophosphorylase Deficiency (Glycogen Storage Disease Type V) with PCR-RFLP in Charolais Cattle in Kayseri Region and in Turkey Native Cattle Breeds

Summary: The aim of this study was to investigate whether or not the myophosphorylase deficiency allele exists in Charolais and in Turkish native cattle breeds in Turkey. Ten Charolais, 15 Charolais-Simmental crossbreds, 20 Native Black, 20 Gray Steppe, 20 South Anatolian Red, 20 East Anatolian Red and 20 Simmental breed for the control group comprised the 125 cattle used in this study. The PCR products were digested by *StyI* restriction enzyme. The resulting fragments were analyzed on 3 % NuSieve agarose gel for the presence or absence of a *StyI* restriction site. There were no positive results indicating the presence of myophosphorylase deficiency allele in Charolais, Charolais crossbreed and Turkish native cattle breeds.

Key Words: Charolais, hereditary disease, Myophosphorylase, RFLP

Giriş

Glikojen depo hastalığının tip II ve tip V olarak iki tipi bulunmaktadır ve dokularda patolojik olarak glikojen birikmesi ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır (14). Glikojen depo hastalığı tip V, glikojen metabolizmasını bozarak hücre içinde glikojen birikmesine neden olan otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır (7,8). Kas glikojen fosforilaz veya miyofosforilaz yetmezliği olarak da adlandırılan hastalık birkaç ayağa kadar olan buzağılarda görülmektedir (7,13). Hastalık kaslarda egzersiz intolerans, kas ağrısı, tekrarlayan miyoglobulinüri, kahve renkli idrar ve plazma kreatin kinaz seviyesinde artış ile kendini göstermektedir (14,21). Benzer kalıtsal hastalık insanlarda McArdle's hastalığı olarak adlandırılmakta ve hastalık kaslarda glikojenin glikoz-1-fosfat'a çevrilmesini sağlayan miyofosforilaz enziminin eksikliğine neden olmaktadır (7,13,14,21). Hastalık sığırlardaki formuna benzer şekilde, egzersiz intolerans, kas krampları ve

miyoglobulinüri ile kendini göstermektedir (13). Sığırlarda glikojen depo hastalığı tip V, ilk olarak Kuzey Amerika'da yetiştirilen Şarole ırkı sığırlarda bildirilmiştir (6,13). Şarole sığırlarında glikojen depo hastalığı tip V'in klinik belirtileri genellikle birkaç aylık buzağılarda eksersize bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (13).

Glikojen depo hastalığı tip V, sığır miyofosforilaz geninin 489. kodonun 12. ekzonunda meydana gelen bir nokta mutasyonundan (C→T yer değişimi) kaynaklanmaktadır. Bu mutasyon, genin 489. kodonunun kodladığı arjinin amino asitinin (CGG), triptofan amino asitine (TGG) dönüştürmesine neden olmaktadır (10,13,19,21). Bu mutasyon sonucunda miyofosforilaz geninde daha önce bulunmayan bir *StyI* restriksiyon enzim tanıma bölgesi oluşmakta ve bu değişim polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon parçacık büyüklük polimorfizmi (PCR-RFLP) yardımıyla belirlenebilmektedir (13,19).

Çiftlik hayvanlarının kalıtsal hastalıkları ya verim düşüklüğüne ya da embriyonik ölümlere neden olarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır (7,14). Bu nedenle erkek ve dişi damızlıkların ırka özgü kalıtsal hastalıklar yönünden taranarak taşıyıcıların belirlenmesi ve yetiştirmeden çıkarılması gerekmektedir. Geçen elli yıldan fazla bir süredir

Geliş Tarihi/Submission Date : 11.11.2008
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.

genetik iyileştirme programları süt ve et üretiminde büyük katkılar sağlamıştır. Gelişmiş ülkelerde damızlık olarak seçilen hayvanlarda seçim kistasları süt verimi, ırk özellikleri, ağırlık artışı ve karkas özellikleri olmuştur. Fakat son 10–20 yılda bu kistaslara ilaveten döl verimi, uzun ömürlülük ve hastalıklara direnç de eklenmiştir (8). Et ve süt sığırı yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan suni tohumlama yöntemi bu özellikler yönünden en iyi birkaç hayvanın seçilerek damızlık olarak kullanılmasına olanak vermektedir. Suni tohumlama yönteminin yaygın olarak kullanılması genetik ilerlemede hızlı bir artış sağlamaktadır. Ancak az sayıdaki erkek damızlıkların tüm dünyada yaygın olarak kullanılması ırk içindeki genetik havuzun daralmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda, ırk içindeki akrabalık derecesi artmakta, kalıtsal hastalıkların frekansı yükselmekte ve tüm dünyaya yayılabilmektedir (2,3,11). Sığırlarda belirlenen kalıtsal hastalıkların % 87' si çekinik kalıtım şekli gösterir ve bu kalıtsal bozuklukların birçoğu ırka özeldir (11). Dolayısıyla, kalıtsal kusurların kontrol edilmesi ve popülasyondan temizlenmesi için taşıyıcı bireylerin belirlenerek sürüden ayıklanması gerekmektedir. Bu da ancak moleküler genetik yöntemlerle belirlenmektedir (2). Özellikle, suni tohumlama ve embriyo nakli amacıyla kullanılan damızlık ve damızlık adaylarının kalıtsal hastalıklar yönünden kontrol edilmesi ve kalıtsal hastalıkları taşımadıklarının kesin olarak belirlenmesi zorunluluğunu doğurmuştur (11). Benzer şekilde ekonomik verimlilik açısından öncelikle Türkiye'de yetiştirilen damızlık ve damızlık adaylarının verimi olumsuz yönde etkileyen kalıtsal kusurlar yönünden genetik yapılarının belirlenmesi gerekmektedir. Daha sonra Türkiye yerli sığır ırklarının da bu kalıtsal kusurlar yönünden genetik yapılarının belirlenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Çünkü ırka özgü olduğu düşünülen birçok kalıtsal bozukluk yönünden Türkiye yerli gen kaynakları incelenmemiştir.

Daha önce Holştanlarda, önemli verim kayıplarına neden olan kalıtsal hastalıklardan sığır lökosit bağlanma yetmezliği (BLAD) ve üridin monofosfat senteaz yetmezliği (DUMPS) yönünden Türkiye'de yetiştirilen dişi ve erkek damızlıklar incelenmiştir. Bu hastalıklardan sadece BLAD'a neden olan mutant allelin Türkiye Holştayn popülasyonunda varlığı tespit edilmiştir (2,3,15). Daha önce Türkiye'de yetiştirilen Şaroleler ve yerli sığır ırkları glikojen depo hastalığı tip V yönünden incelenmemiştir. Bu çalışma ile Kayseri ve civarında yetiştirilen saf Şarole ve Şarole melezleri ile Türkiye yerli sığır ırklarında glikojen depo hastalığı tip V hastalığına neden olan mutant allelin varlığı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

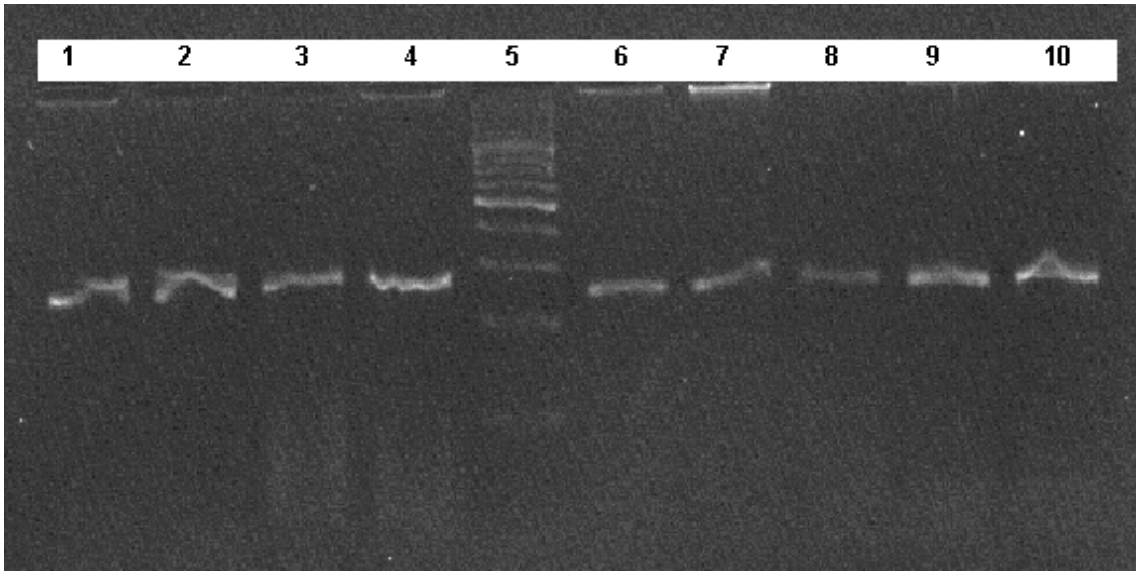
Araştırmanın hayvan materyalini toplam 125 baş sığır oluşturmaktadır. Bunlardan 10 baş Şarole ve 15 baş Şarole-Simmental melezi Kayseri ve civarından temin edilmiştir. Araştırma materyali yerli ırklar 20 baş Yerli Kara (YK, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Lalahan/Ankara), 20 baş Güney Anadolu Kırmızısı (GAK, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü Karataş/Adana), 20 baş Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK, Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Gezköy/Erzurum) ve 20 baş Boz Irk (BI, Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Bandırma/Balıkesir) sığırından oluşmuştur. Kontrol grubu olarak da daha önce glikojen depo hastalığı tip V' in kalıtsal varlığının saptanmadığı (7) ve Damızlık Sığır Yetiştiriciler Merkez Birliğinden temin edilen 20 baş Simmental sığırı kullanılmıştır. DNA izolasyonu için Şarole ve Şarole melezleri ile Simmental ırkı hayvanlardan antikoagulanlı tüplerle *vena jugularis*ten kan alınmıştır. Yerli ırklarda ise daha önce yapılan bir çalışmadan kalan DNA örneklerinden yararlanılmıştır (2). DNA izolasyonu için fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (1). Glikojen depo hastalığı tip V'e neden olan alleli belirlemek için yapılan PCR'de primer olarak, forward: 5'-CCA GGA AGA CCC TCA TTC CA-3'; reverse: 5'-AGG GAA ACA CAC ACA CTC-3' olacak şekilde bir primer seti kullanılmıştır (21). PCR karışımı Soethout ve arkadaşları (21) tarafından bildirildiği şekilde, her primerden 40 pmol, 1 X PCR tampon solüsyonu (KCl'li), 100 µM dNTP (Fermentas) ve 2 U Taq DNA polimeraz (Fermentas) konularak hazırlanan karışım steril ddH₂O ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır. Bu karışımın üzerine 200 ng genomik DNA'dan 3 µl ilave edilerek PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu, hazırlanan karışım ısı düzenleme aletinde 95 °C'de 10 dk tutulduktan sonra bir döngüsü 94 °C'de 15 sn, 34 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn olacak şekilde 35 döngü, son döngüyü takiben tüpler 72 °C'de 5 dakika tutularak yapılmıştır. Elde edilen ürünler 45 dakika 80 volt elektrik gerilimi uygulanarak % 2 lik agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Elektroforezde 252 baz çifti (bç) uzunluğunda bantların görüldüğü PCR ürünleri, RFLP için *StyI* restriksiyon enzimi (Fermentas) ile kesilmiştir. Bu işlem her bir örnek için toplam hacmi 25 µl olacak şekilde (*StyI* 20 U, 10 x Buffer 3 µl, ddH₂O 16 µl, 5 µl PCR ürünü) hazırlanan karışımın ısı düzenleme aletinde 37 °C de 4 saat tutularak yapılmıştır. Bu sürenin sonunda enzimi inaktive etmek için karışım 65 °C de 20 dk bekletilmiştir. Elde edilen RFLP ürünleri % 3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi ile gözlenmiştir. Elektroforez sonunda homozigot normal bireylerde 252 bç'lik tek bant, homozigot hasta bireylerde 133 ve

119 bç'lik iki bant, taşıyıcılarda ise 252 bç, 103 bç ve 82 bç olmak üzere üç bantın görülmesi beklenmiştir (21).

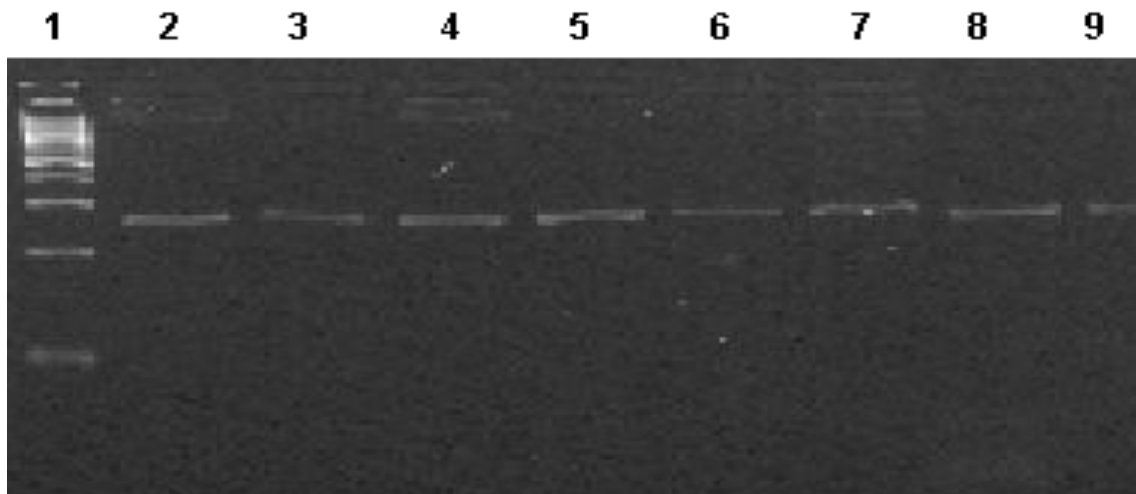
Bulgular

Yapılan PCR sonunda, incelenen tüm örnekler için DNA'lar elde edilmesi beklenen 252 bç'lik PCR ürünleri elde edilmiştir. PCR sonunda elde edilen ürünlerin belirlendiği % 2'lik agaroz jel elektroforezi Şekil 1 de görülmektedir.

Elde edilen PCR ürünlerinin *Styl* enzim kesimi ile yapılan RFLP işlemi sonunda, incelenen ırklara ve kontrol grubuna ait tüm örneklerde enzim kesiminin olmadığı görülmüştür. RFLP sonuna da kesim işlemi uygulanan tüm bireylerde 252 bç'lik tek bant elde edilmiştir. İncelenen 25 Şarole ve Şarole melezi ile 20 baş YK, 20 baş GAK, 20 baş DAK ve 20 baş BI' ait örneklerden hiç birisinin glikojen depo hastalığı tip V taşıyıcısı olmadığı görülmüştür. PCR ürünlerinin *Styl* restriksiyon enzim kesimi sonunda yapılan % 3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi ile Şekil 2'deki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 1. PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezi. Kuyu 1: YK10, Kuyu 2: YK4, Kuyu 3: DAK10, Kuyu 4: GAK14, Kuyu 5: 100 bp plus DNA markör (Fermentas), Kuyu 6: BI2, Kuyu 7: Şarole-Simmental melez, Kuyu 8: Şarole14, Kuyu 9: Şarole10, Kuyu 10: Şarole1.



Şekil 2. *Styl* Endonükleaz enzimi ile elde edilen ürünlerinin % 3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezi. Kuyu 1: Kuyu 2: YK4, Kuyu 3: DAK10, Kuyu 4: GAK14, Kuyu 5: BI2, Kuyu 6: Şarole-Simmental melez, Kuyu 7: Şarole14, Kuyu 8: Şarole10, Kuyu 9: Şarole1.

Tartışma ve Sonuç

Glikojen depo hastalığı tip V sığırlarda günümüze kadar sadece Şarole sığır ırkında belirlenmesine rağmen (7,21), hastalık insanlarda farklı ırklarda bildirilmiştir (21). Bu nedenden dolayı çalışmada yerli sığır ırklarında da glikojen depo hastalığı tip V alleli yönünden incelenmesi düşünülmüştür. Ancak, incelenen Türkiye yerli sığır ırklarında bu kalıtsal hastalığa neden olan mutant allelin belirlenmemesi hastalığın Şarole ırkına özgü bir kalıtsal hastalık olduğu bilgisini desteklemektedir. Çek Cumhuriyeti'nde Şarole dışında diğer etçi ırklarda glikojen depo hastalığı tip V'in aranmasını amaçlayan bir çalışmada da benzer sonuca ulaşılmıştır. Ayrıca bu ülkede yetiştirilen Şarole ırkı sığırlarda da taşıyıcılara rastlanılmamıştır (6,7). Glikojen depo hastalığı tip V'e neden olan mutant allel ilk kez ABD'de yetiştirilen Şarole ırkı sığırlarda belirlenmesine rağmen, Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda'da taşıyıcı ve hasta bireylere rastlanılmıştır (13). Bu çalışmada, incelenen Şarole ve Şarole melezlerinde glikojen depo hastalığı tip V'e sebep olan mutant alleli taşıyan bireylere rastlanılmamıştır. Örnek sayısını artırmanın Türkiye'de yetiştirilen Şarolelerin glikojen depo hastalığı tip V yönünden genetik yapıları daha kesin olarak belirlenebileceği düşünülmüştür. Çalışmanın yapıldığı bölgede yetiştirilen Şarolelerde bu hastalığa ait mutant allele rastlanılmamış olması hastalığın Türkiye Şarole populasyonunda olmadığı veya sonraki yıllarda bu mutant allelin Türkiye'ye gelemeyeceği anlamına gelmez. Dolayısıyla, bu kalıtsal hastalığın görüldüğü ülkelerden ithal edilecek canlı hayvan ve spermalarda bu kalıtsal hastalığın bulunmadığının belgesinin aranması gereklidir.

Doğal tohumlama ile bir boğa senede 80–100 inek tohumlayabilirken, yaygınlaşan suni tohumlama sayesinde bu sayı yılda 20 bin ineğe çıkabilmektedir (4). Bu durum sığır yetiştiriciliğinde kullanılan damızlık boğa sayısını azaltmaktadır. Suni tohumlamanın sığır yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmasından beri birey başına alınan verim artmıştır. Fakat, yöntem gerek et ve gerekse süt sığırı yetiştiriciliğinde en yaygın kullanılan ırklarda genetik yakınlığı arttırmıştır (12). Ayrıca yaygın olarak kullanılan bir damızlıkta var olan ve teşhisi yapılabildiği kadar bilinmeyen kalıtsal bir bozukluk kısa sürede tüm dünyaya yayılabilmektedir. Bu tür kalıtsal hastalıklara en güzel örnek Holştaynlarda görülen BLAD hastalığı verilebilir. Daha önce granülositopati sendromu olarak adlandırılan bu hastalığın, kalıtsal bir hastalık olduğu ve bu hastalığa sebep olan mutant allelin ilk olarak 1952 yılında doğan Osbornedale Ivanhoe isimli boğada bulunduğu 1989 yılında belirlenmiştir (15,16). Geçen

37 yıllık sürede üstün verim özelliklerine sahip bu boğa, boğanın oğulları ve torunlarının Holştayn yetiştiriciliğinde çok yaygın kullanılması sonucunda hastalık ABD'den Japonya'ya kadar tüm dünyaya yayılmıştır (9,17,16). İnsanlarda genetik temeli bilinen 200'den fazla enzim yetmezliğine sebep olan kalıtsal bozukluk tanımlanmışken sığırlarda bu sayı yedidir (8,20). Ayrıca çiftlik hayvanlarında görülen kalıtsal hastalıklar çoğunlukla çekinik kalıtım şekli göstermektedir (11). Dolayısıyla bilinen ve verimi olumsuz etkileyen kalıtsal bozukluklar yönünden damızlık ve damızlık adaylarını kontrol etmeyen ülkelere kalıtsal hastalıklar kolay yayılabilmektedir. Tarım Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de suni tohumlamada 1999 yılında yurt içinde üretilen 1 570 325 doz ve yurt dışından ithal edilen 357 987 doz, toplam 1 928 312 doz, sperma kullanılmıştır (5). Türkiye'de saf Şarole ırkı sığırların yanında yetiştiriciler pazarın durumuna göre Holştayn, Simmental ve yerli ırkların dişilerini kullanarak Şarole melezleri de elde etmektedirler.

Sonuç olarak Kayseri ve civarında yetiştirilen Şarole ve melezlerinde glikojen depo hastalığı tip V' neden olan mutant allel bulunmamıştır. Ancak bu durum bu kalıtsal hastalığın Türkiye'de yetiştirilen Şarole populasyonunda da bulunmadığı anlamına gelmez. Çünkü Türkiye'de yetiştirilen evcil hayvanlarda, gelişmiş ülkelerin daha önce belirlediği ve kontrol altına aldığı birçok kalıtsal hastalık hakkında yeterli tarama yapılmamıştır. Bu nedenle yetiştirici birlikleri ile birlikte Türkiye'deki Şarole populasyonunun taranması düşünülebilir. Suni tohumlamada kullanılması düşünülen damızlık adaylarının ve annelerinin IBR, BVD, sığır lökozu ve sığır tüberkülozu gibi enfeksiyöz hastalıkları taşımadıklarının belgelenmesi zorunludur. Benzer şekilde damızlık adayları ve annelerinin glikojen depo hastalığı tip V, DUMPS, BLAD, CVM gibi üretimde problem yaratacak ırka özgü kalıtsal hastalıklar yönünden de taşıyıcı olup/olmadıkları belirlenmesi gereklidir.

Kaynaklar

1. Akyüz B, 2004. Türkiye'deki Holştayn sığırlarında sığır lökosit bağlanma yetmezliğinin (bovine leukocyte adhesion deficiency, BLAD) restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) ile belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniv Sağlık Bil Enst, Zootečni Programı. Ankara.
2. Akyüz B, Ertuğrul O, 2006. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle. *Acta Vet Hung*, 54(2): 173–178.

3. 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.
4. Alpan O, 1993. *Sığır Yetiştiriciliği ve Besiciliği*. 3. Basım. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni Bölümü, s. 205.
5. Anonim, 2005. Erişim (06.10.2005). <http://www.tarim.gov.tr/arayuz/9/icerik.asp?efl=buyukbas/buyukbas.htm&curdir=\uretim\hayvancilik\buyukbas&fl=sunitohumlama/sunitohumlama.htm>.
6. 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.
7. Citek J, Rehout V, Vecerek L, Hajkova J, 2007. Genotyping glycogen storage disease type II and type V in cattle reared in the Czech Republic. *J Vet Med A*, 54: 257-259.
8. Distl O, 2005. The use of molecular genetics in eliminating of inherited anomalies in cattle *Arch Tierz Dummerstorf*, 48(3): 209-218.
9. Fésüs L, Zsolnai A, Anton I, Bárány I, Bozó S, 1999. Short communication BLAD genotypes and cow production traits in Hungarian Holsteins. *J Anim Breed Genet*, 116: 169-174.
10. Fries R, Ruvinsky A, 1999. *The Genetics of Cattle*, CABI Publishing, Wallingford, Chapter 6, p. 59.
11. Healy PJ, 1996. Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J Anim Sci*, 74:917-922.
12. Jánosa Á, Baranyai B, Dohy J, 1999. Comparison of milk production of the progeny of BLAD-carrier and healthy Holstein bulls in Hungary. *Acta Vet Hung*, 47(3): 283-289.
13. Johnstone AC, McSparran KD, Kenny JE, Anderson IL, Macpherson GR, Jolly RD, 2004. Myophosphorylase deficiency (glycogen storage disease Type V) in a herd of Charolais cattle in New Zealand: confirmation by PCR-RFLP testing. *N Z Vet J*, 52(6): 404-408.
14. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th Ed., Academic Press London, p. 46,77,434.
15. Kehrl M, Shuster DE, Ackerman MR 1992. Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornel Vet*, 82(2): 103-109.
16. Kriegesmann B, Jansen S, Baumgartner BG, Brenig B, 1999. Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and the refinement of test for Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *J Dairy Sci*, 80: 2547-2549.
17. Mirck MH, von Bannisseht-Wijismuller TH, Timmermans-Besselink WJH, Van Luijk JHL, Buntjer JB, Lenstra JA, 1995. Optimization of the PCR test for the mutation causing bovine leukocyte adhesion deficiency. *Cell Mol Biol*, 41(5): 695-698.
18. Nagahata H, 2004. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD). *J Vet Med Sci*, 66(12); 1475-82.
19. O'Rourke BA, Dennis JA, Healy PJ, 2006. Internal restriction sites: quality assurance aids in genotyping. *J Vet Diagn Invest*, 18:195-197.
20. 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.
21. Soethout EC, Verkaar ELC, Jansen GH, Muller KE, Lenstra JA. 2002. A direct Sty I polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) test for the myophosphorylase mutation in cattle. *J Vet Med A*, 49: 289-90.

Yazışma Adresi :

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