

## Bıldırcın Hatlarının Tanımlanmasında Arilesteraz Tiplerinin Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Mehmet Ali YILDIZ<sup>1</sup>Handan ÇAMDEVİREN<sup>2</sup>Tahsin KESİCİ<sup>2</sup>

Geliş Tarihi: 01.02.1999

**Özet:** Çalışılan 4 farklı japon bıldırcını hattında arilesteraz tipleri belirlenmiş ve EsA<sup>+</sup> fenotiplerinin frekansları yüksek bulunmuştur. Log-doğrusal model kullanılarak bıldırcın popülasyonlarında fenotip ve genotip gruplarının belirlenmesinde arilesteraz sisteminin etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Japon bıldırcını, arilesteraz, log-doğrusal model

### Determination of the Possibility of Usage of Arylesterase Types in the Description of Quail Lines

**Abstract:** In this study arylesterase types were determined and EsA<sup>+</sup> phenotypes were high in four different Japanese quail lines. Arylesterase system can also be used for determined phenotype and genotype groups of quail populations by using log-linear model.

**Key Words:** Japanese quail, arylesterase, log-linear model

#### Giriş

Bıldırcınlar biyolojik çalışmalarda genellikle model hayvan olarak kullanılmakta ve bu sebepten dolayı da mutant tipler ve major varyantlara ilişkin elde edilen bilgiler oldukça sınırlı düzeyde kalmıştır.

Son yıllarda japon bıldırcınlarının kalitatif özellikler bakımından çeşitli boyutlarda tanımlanmasını sağlayan yeni araç ve metotların uygulama alanına sokulmasıyla, belirli özelliklerin fikse edildiği bıldırcın popülasyonlarının geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Crawford 1990).

Koyunlarda rutin analizlerde çok yaygın bir şekilde kullanılan arilesteraz (EsA) sistemi,  $\alpha$ -naftil asetati hidrolize etme yeteneğine göre iki tipe ayrılabilen ve  $\alpha$ -naftil asetata karşı aktivitesi yüksek olan EsA<sup>+</sup>, düşük olan ise EsA<sup>-</sup> olarak tanımlanmaktadır (Tucker ve ark. 1967).

Arilesteraz polimorfizminin bıldırcınlarda da kullanılabilirliğine ilişkin yapılan çalışmada, 8 farklı japon bıldırcını hattında EsA<sup>+</sup> fenotipleri EsA<sup>-</sup> fenotiplerine oranla daha yüksek bulunmuş ve bıldırcın popülasyonlarının karşılaştırılmasında da EsA sisteminden de etkin bir şekilde yararlanılabileceği ifade edilmiştir (Asal ve Yıldız 1997).

Var-yok, evet-hayır, doğru-yanlış, ölü-canlı, negatif-pozitif, yüksek-düşük (EsA sisteminde olduğu gibi) vb. şeklinde ifade edilen karakterlere ikili (**binary**) özellik, sözkonusu özelliğin sayısal kodlarına ise ikili veri adı verilmektedir. Bu çalışmada da bu tip veriler kullanılmıştır.

Bu çalışmada 4 farklı japon bıldırcını hattı EsA sistemi bakımından karşılaştırılmıştır.

#### Materyal ve Yöntem

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziaat Fakültesi, Zootehni Bölümü, Bıldırcın Yetiştiriciliği Ünitesi'ndeki Avrupa orijinli siyah (S), kahverengi (K) ve kırmızı gözlü beyaz (B) genotip grupları ile japon orijinli beyaz (W) tüy rengine sahip bıldırcın hatlarında yürütülmüştür. Avrupa orijinli hatların (S, K ve B) tüy rengini belirleyen genler bakımından genetik analizleri yapılmamakla birlikte, bu hatlar 8 generasyon kendi içlerinde akrabalı yetiştirilmiş ve tüy rengi bakımından herhangi bir fenotipik açılma meydana gelmemiştir. Çalışmada kullanılan Japon orijinli beyaz (W) bıldırcını hattı, 1994 yılında Gifu Üniversitesi'nden getirilmiştir. Bu genotip grubunda tüy renginin beyaz oluşunu sağlayan otozomal gen (W), yabancı alleline (w<sup>+</sup>) eksik dominant (incomplete dominance) etkilidir (Wakasugi ve Kondo 1973).

<sup>1</sup> Selçuk Üniv. Ziraat Fak. Zootehni Bölümü. Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı-Konya

<sup>2</sup> Ankara Üniv. Ziraat Fak. Zootehni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı-Ankara

Ariesteraz analizleri plazma örneklerinde tüp testi (Tucker ve ark. 1967) yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaçla; kan örnekleri 3 ml'lik antikoagulantlı (EDTA) şırıngalar ile doğrudan kalpten alınmıştır. Alınan kan örnekleri laboratuvara getirilerek 3000 dev/dak.'da 15 dakika santrifüj edilmiş, plazma ve hücre kısmı birbirinden ayrılmıştır. Bir cam üzerine önce bir damla kadar plazma örneği ve bunun üzerine de iki damla aktivite boya çözeltisi (Asetonda çözülmüş % 1'lik  $\alpha$ -naftil asetat solusyonundan 1 ml; 0.05 ml Fast Blue BB tuzu ve 49 ml. destile su) ilave edilmiştir. Bir kaç saniye içerisinde  $EsA^+$  (ariesteraz aktivitesi yüksek) fenotipleri sarımsı-kahverengi bir renk verirken,  $EsA^-$  (ariesteraz aktivitesi düşük) fenotipleri ise boyandıktan yaklaşık 30 saniye sonra koyu-yeşile dönen bir renge dönüşmektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda  $EsA^+$  fenotipine sahip olan bıldırcınlar '1',  $EsA^-$  fenotipine sahip olan bıldırcınlar ise '0' kodu ile kodlanarak,  $EsA$  fenotipinin farklı iki tipinde yer alan bıldırcınların genotip gruplarına göre dağılımını gösteren iki yönlü tablo oluşturulmuştur.

Genotip grupları ve ariesteraz aktivitelerine göre iki yönlü tablo oluşturularak ariesteraz aktivitesinin genotip gruplarına bağlı olup olmadığı khi-kare testi veya G testi ile kontrol edilebilir. Ayrıca sürekli değişkenlerde olduğu gibi genotip grupları ve ariesteraz aktivitesi (+ veya -) birer faktör olarak ele alınarak 1 numaralı eşitlikte olduğu gibi bir **log-doğrusal** model de oluşturulabilir (Anderson 1994).

$$\ln(f_{ij}^*) = \tau_{00} + \tau_i^F + \tau_j^G + \tau_{ij}^{FG} + \varepsilon_{ij} \dots \dots \dots (1)$$

$\ln(f_{ij}^*)$  : i' inci satır j' inci sütunda yer alan beklenen frekansın doğal logaritması

$\tau_{00}$  : Genel ortalama

$\tau_i^F$  : Ariesteraz fenotiplerinin etkisi

$\tau_j^G$  : Bıldırcın hatlarının etkisi

$\tau_{ij}^{FG}$  : Ariesteraz fenotipi ile bıldırcın hatları arasındaki interaksiyon etkisi

$\varepsilon_{ij}$  : Modele alınmayan etkiler ile rasgele hatayı göstermektedir.

Etki paylarının hesaplanabilmesi için aşağıdaki eşitliğin varsayılması gerekir.

$$\sum_i \tau_i^F = \sum_j \tau_j^G = \sum_i \tau_{ij}^{FG} = \sum_j \tau_{ij}^{FG} = 0$$

Belirtilen varsayım altında ana etkiler ve interaksiyona ait katsayılar hesaplanarak daha detaylı yorumlar yapmak mümkündür. Söz konusu etkilerin hesaplanmasında aşağıdaki adımlar izlenir.

1- İnteraksiyona ait katsayılar (etki payları),

$\tau_{ij}^{FG} = \mu_{ij} - \bar{\mu}_i - \bar{\mu}_j + \bar{\mu}_{..}$  eşitliği yardımıyla hesaplanır. Bu eşitlikte yer alan,

$$\mu_{ij} = \ln f_{ij}$$

$$\bar{\mu}_i = \sum_j \mu_{ij} / c$$

$$\bar{\mu}_j = \sum_i \mu_{ij} / r \quad \text{ve}$$

$$\bar{\mu}_{..} = \sum_i \sum_j \mu_{ij} / (rc) \quad \text{dir.}$$

r satır sayısını, c ise sütun sayısını göstermektedir.

2- Fenotipin (satırların) ana etki payları ise,

$\tau_i^F = \bar{\mu}_i - \bar{\mu}_{..}$  eşitliği ile hesaplanır. Bu eşitlikte yer alan ortalama terimleri yukarıda tanımlandığı gibi hesaplanır.

3- Genotipin (sütunların) ana etki payları,

$$\tau_j^G = \bar{\mu}_j - \bar{\mu}_{..} \quad \text{eşitliği ile hesaplanır.}$$

4- Genel ortalamayı temsil eden  $\tau_{00}$  yerine  $\bar{\mu}_{..}$  eşitliği kullanılır.

Etkilerin hesaplanmasından sonra ilk aşamada interaksiyon etkisinin önem kontrolü 2 numaralı eşitlikte verilen log-olabilirlik oran (**log-likelihood ratio**) istatistiği ( $D_1$ ) ile kontrol edilir. Bu istatistik yaklaşık  $(r-1)(c-1)$  serbestlik dereceli khi-kare dağılımı gösterdiğinden önem kontrolü buna göre yapılır. Önemli ise yani rasgele olma olasılığı kabul edilen  $\alpha$  seviyesinden az ise ana faktörler arasındaki interaksiyonun önemli olduğu sonucuna varılır ve interaksiyona ait katsayılar hesaplanır. İnteraksiyonun kaynağını incelemek ve gerekli testleri yapmak için her gözdeki gözlenen frekanslar ile teorik frekansların farkların 5 numaralı eşitliğe göre standardize edilir. Bu standardize edilmiş değerler standart normal dağılım gösterdiğinden her göz için önem kontrolü buna göre yapılarak interaksiyonun kaynakları belirlenir. Eğer interaksiyon ( $D_1 > \chi_{\alpha}^2 (r-1)(c-1)$ ) önemli değilse ana etkiler için testler yapılır. Bu etkiler fenotipe (satırlar) ve genotipe (sütunlar) ait etkilerdir. Fenotipe ait ana etkinin önem kontrolünde  $(r-1)$  serbestlik dereceli khi-kare dağılımı gösteren ve 3 numaralı eşitlikte tanımlanan  $D_2$  istatistiği, genotipe ait ana etkinin önem kontrolünde ise  $(c-1)$  serbestlik dereceli khi-kare dağılımı gösteren ve 4 numaralı eşitlikte verilen  $D_3$  istatistiği kullanılır. Buradaki D istatistiği birçok kitapta yer alan G istatistiğidir (Anderson 1994).

$$D_1 = 2 \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c f_{ij} (\ln f_{ij} - \ln f_{ij}^*) \dots \dots \dots (2)$$

$$D_2 = 2 \sum_{i=1}^r f_{i.} (\ln f_{i.} - \ln f_{i.}^*) \dots \dots \dots (3)$$

$$D_3 = 2 \sum_{j=1}^c f_{.j} (\ln f_{.j} - \ln f_{.j}^*) \dots \dots \dots (4)$$

$$r_{ij} = (f_{ij} - f_{ij}^*) / \sqrt{f_{ij}^* \{1 - (f_{i.}/N)\} \{1 - (f_{.j}/N)\}} \dots\dots\dots (5)$$

$f_{ij}$  : Gözlenen frekansları,

$f_{ij}^*$  : Beklenen frekansları,

N : Toplam örnek genişliğini göstermektedir

### Bulgular ve Tartışma

Arilesteraz fenotiplerinin genotip gruplarına göre dağılımı Çizelge 1'de verilmiştir. İncelenen populasyonların tamamında EsA<sup>+</sup> fenotiplerinin nisbi frekansı yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, Asaİ ve Yıldız (1997) tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir.

İlk aşamada model 1 numaralı eşitlikte yer alan interaksiyon teriminin önemli olup olmadığını kontrol etmek için 2 numaralı eşitlik yardımı ile D<sub>1</sub> değeri hesaplanmış ve D<sub>1</sub>=10.296 bulunmuştur. Bu 3 serbestlik dereceli [(2-1)(4-1)] khi-kare dağılımı gösterir. Bunun rasgele olma olasılığı P=0.016 dır. Bu da çok küçük bir olasılık ( P < 0.05) olduğu için ana faktörler arasında interaksiyon olmadığı hipotezinin reddini gerektirir. Yani, interaksiyon önemlidir.

Yapılan bu test sonucundan hareketle arilesteraz aktivitesinin düşük yada yüksek olmasının genotip gruplarından en az birine bağımlı olduğunu ifade eden karşıt hipotezi kabul edilir. Bu grup veya grupların belirlenmesi gerekir. Bu nedenle interaksiyona ait bileşenler tek tek incelenmiştir. İnteraksiyona neden olan bileşenlere (genotip ve fenotip grupları) ait etki miktarlarının tahminleri, log-doğrusal model yardımıyla yapılmıştır. Her bir genotip-fenotip sınıfı (alt grup) için hesaplanan interaksiyon etkileri kullanılarak, interaksiyona neden olan genotipin belirlenmesi sağlanmıştır. Alt gruplar için hesaplanan interaksiyona ait etki miktarlarının (katsayıların) tahmin değerleri Çizelge 3'de sunulmuştur.

Çizelge 1. Arilesteraz fenotiplerinin genotip gruplarına dağılımı (gözlenen frekanslar =  $f_{ij}$ )

Arilesteraz Fenotipleri	Genotip grupları				Toplam
	S	K	B	W	
EsA <sup>+</sup> (1)	f <sub>11</sub> = 30	f <sub>12</sub> = 27	f <sub>13</sub> = 11	f <sub>14</sub> = 16	f <sub>1.</sub> = 84
EsA <sup>-</sup> (0)	f <sub>21</sub> = 18	f <sub>22</sub> = 20	f <sub>23</sub> = 9	f <sub>24</sub> = 1	f <sub>2.</sub> = 48
Toplam	f <sub>.1</sub> = 48	f <sub>.2</sub> = 47	f <sub>.3</sub> = 20	f <sub>.4</sub> = 17	N=132

Çizelge 2. Teorik frekanslar ( $f_{ij}^* = (f_{i.} \times f_{.j})/N$ )

Arilesteraz Fenotipleri	Genotip grupları				Toplam
	S	K	B	W	
EsA <sup>+</sup> (1)	f <sub>11</sub> <sup>*</sup> 30.55	f <sub>12</sub> <sup>*</sup> 29.91	f <sub>13</sub> <sup>*</sup> 12.73	f <sub>14</sub> <sup>*</sup> 10.82	f <sub>1.</sub> = 84
EsA <sup>-</sup> (0)	f <sub>21</sub> <sup>*</sup> 17.09	f <sub>22</sub> <sup>*</sup> 16.730	f <sub>23</sub> <sup>*</sup> 7.12	f <sub>24</sub> <sup>*</sup> 6.05	f <sub>2.</sub> = 48
Toplam	f <sub>.1</sub> = 48	f <sub>.2</sub> = 47	f <sub>.3</sub> = 20	f <sub>.4</sub> = 17	N=132

Bu etkiler aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$\mu_{11} = \ln 30 = 3.401$$

$$\mu_{12} = \ln 27 = 3.296$$

$$\mu_{13} = \ln 11 = 2.398$$

$$\mu_{14} = \ln 16 = 2.773$$

$$\mu_{21} = \ln 18 = 2.890$$

$$\mu_{22} = \ln 20 = 2.996$$

$$\mu_{23} = \ln 9 = 2.197$$

$$\mu_{24} = \ln 1 = 0.000$$

$$\mu = (\mu_{11} + \mu_{12} + \mu_{13} + \mu_{14} + \mu_{21} + \mu_{22} + \mu_{23} + \mu_{24}) / (rc) = (3.401 + 3.296 + 2.398 + 2.773 + 2.890 + 2.996 + 2.197 + 0.000) / (4 \times 2) = 2.494 = 2.494$$

$$\mu_{1.} = (\mu_{11} + \mu_{12} + \mu_{13} + \mu_{14}) / (c) = (3.401 + 3.296 + 2.398 + 2.773) / 4 = 2.967$$

$$\mu_{2.} = (\mu_{21} + \mu_{22} + \mu_{23} + \mu_{24}) / (c) = (2.890 + 2.996 + 2.197 + 0.000) / 4 = 2.02075$$

$$\bar{\mu}_{.1} = (\mu_{11} + \mu_{21}) / (r) = (3.401 + 2.890) / 2 = 3.1455$$

$$\bar{\mu}_{.2} = (\mu_{12} + \mu_{22}) / (r) = (3.296 + 2.996) / 2 = 3.146$$

$$\bar{\mu}_{.3} = (\mu_{13} + \mu_{23}) / (r) = (2.398 + 2.197) / 2 = 2.2975$$

$$\bar{\mu}_{.4} = (\mu_{14} + \mu_{24}) / (r) = (2.773 + 0.000) / 2 = 1.3865$$

$$\hat{r}_{11} = \mu_{11} - \bar{\mu}_{1.} - \bar{\mu}_{.1} + \mu = 3.401 - 2.967 - 3.1455 + 2.494 = -0.218$$

olup EsA<sup>+</sup> fenotipinde ve S genotipindeki bıldırıcınların interaksiyon etki payı elde edilir. Diğer fenotip X genotip gruplarına ait etkilerde benzer şekilde hesaplanır.

Çizelge 3 incelendiğinde japon orjinli beyaz (W) bildircin hattında interaksiyona ait etki paylarının, diğer genotip gruplarındaki interaksiyon etki paylarından miktar olarak büyük ve zıt işaretli olduğu görülmektedir. Belirtilen bağımlılığa neden olan genotip grubunun belirlenmesi de ya da daha genel anlamda Çizelge 3'te verilen interaksiyona ait etkilerin önemli olup olmadıklarının tespitinde, kurulan modelden sapmaların bir ölçüsü olan standardize edilmiş artık değerleri kullanılabilir, bu değerler Çizelge 3'te sunulmuştur.

EsA<sup>+</sup> fenotipinde ve S genotipinde olanlara ait standardize edilen artık değer hesaplanması aşağıdaki şekilde örneklenebilir.

$$r_{11} = \frac{(30 - 30.55)}{\sqrt{(30.55(1 - (30 + 27 + 11 + 16)/132) (1 - (30 + 18)/132))}} = -0.207$$

Diğer gözlerdeki artık değerleri ise benzer şekilde hesaplanır.

Çizelge 3. Genotip grupları ile arilesteraz fenotipleri arasındaki interaksiyona ait etki miktarları ( $\tau_{ij}^{FG}$ )

Arilesteraz Fenotipleri	Genotip grupları			
	S	K	B	W
EsA <sup>+</sup> (1)	-0.218	-0.323	-0.373	0.914
EsA <sup>-</sup> (0)	0.218	0.323	0.373	-0.914

Çizelge 4. Standardize edilmiş artık değerleri ( $r_{ij}$ )

Arilesteraz fenotipleri	Genotip grupları			
	S	K	B	W
EsA <sup>+</sup> (1)	-0.207	-1.020	-0.873	2.798**
EsA <sup>-</sup> (0)	0.207	1.020	0.873	-2.798**

\*\* P < 0.01

Çizelge 5. Fenotip ve genotip gruplarına ait ana etkiler

Fenotip gruplarının ana etkileri ( $\tau_i$ )		Genotip gruplarının ana etkileri ( $\tau_j$ )		
EsA <sup>+</sup>	EsA <sup>-</sup>	S	K	B
0.169	-0.169	0.283	0.283	-0.566

Çizelge 4 'de görüldüğü gibi W genotipinde standardize edilmiş artık değerleri  $\pm 2.798$  dir. Bu değerlerin standart normal dağılımdan rastgele alınma olasılığı P = 0.0051 dir. Başka bir deyişle P < 0.01 dir. Bu sonuç W genotipinin önemli etkiye sahip olduğunu gösterir. Diğer gözlerdeki  $r_{ij}$  değerlerinin rasgele olma olasılıkları ise %5 'den büyüktür (p > 0.05). O halde interaksiyona neden olan W genotip grubudur. Bulunan bu sonuç doğrultusunda modelden W hattı çıkarılarak tekrar log-olabilirlik istatistiği hesaplanmış ve

D<sub>1</sub> = 0.709 bulunmuştur. İki serbestlik dereceli  $\chi^2$  dağılımına göre bu değer rasgele olma olasılığı p=0.40 dir. Bu durumda arilesteraz tiplerinin genotip gruplarına bağlı olmadığı sonucuna varılır.

W hattının analiz dışı bırakılması neticesinde geriye kalan 3 genotip grubu ve iki farklı arilesteraz fenotiplerini dikkate alarak oluşturulan 2x3 tablosu için interaksiyon etkisinin önemli bulunmaması nedeniyle fenotip ve genotip gruplarına ait ana etkiler aşağıda gösterildiği şekilde hesaplanmış ve Çizelge 5'te sunulmuştur.

EsA<sup>+</sup> fenotipinin ana etkisi,

$$\bar{\mu}_{..} = (3.40 + \dots + 2.197)/(3 \times 2) = 2.863$$

$$\bar{\mu}_{.1} = (3.401 + 3.296 + 2.398)/3 = 3.032$$

$$\tau_{1.} = 3.031 - 2.863 = 0.169$$

EsA<sup>-</sup> fenotipine ait ana etki ise yukarıda hesaplanan EsA<sup>+</sup> fenotipine ait etkinin ters işaretlidir (-0.169).

S, K ve B genotiplerinin etkileri ise;

$$\tau_{.1} = 3.1455 - 2.863 = 0.2825$$

$$\tau_{.2} = 3.146 - 2.863 = 0.2825$$

$$\tau_{.3} = 2.2975 - 2.863 = -0.566$$

olarak hesaplanmaktadır. Bu etkilerden sonucunu istenirse eşitlik kullanılmadan da hesaplanabilir. Çünkü etki toplamlarının sıfır olması gerekmektedir.

Bu çizelgede yer alan ana etkilerin önem kontrollerinde de log-olabilirlik oran istatistiğinden yararlanılmıştır. Fenotip ve genotip gruplarına ait ana etkiler sırasıyla 3 ve 4 numaralı eşitliklerden hesaplanmış ve D<sub>2</sub> = 3.856 (P = 0.0496) ve D<sub>3</sub> = 14.727 (P = 0.000635) bulunmuştur. D<sub>2</sub> istatistiği 1, D<sub>3</sub> istatistiği ise 2 serbestlik dereceli  $\chi^2$  dağılımı göstermektedir. Gerek fenotip gerekse genotip gruplarının ana etkilerine ait D istatistiklerinin hipotez kontrolleri sonucunda her iki ana etkide önemli bulunmuştur (P < 0.05). Bu sonuca göre EsA<sup>+</sup> fenotipinin EsA<sup>-</sup> fenotipine nazaran daha sık görüldüğü ve her iki fenotipte de B genotipinin frekansının diğer genotip gruplarından düşük olduğu söylenebilir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Asal ve Yıldız (1997) tarafından da belirtildiği gibi, bildircin populasyonlarının karşılaştırılmasında arilesteraz sisteminden de yararlanılabileceği ileri sürülebilir.

#### Kaynaklar

- Anderson, E. B., 1994. The Statistical Analysis of Categorical Data. Third Edition, Springer-Verlag, Germany.
- Asal, S. ve Yıldız, M. A. 1997. Çeşitli Japon Bildircini (*Coturnix japonica*) Hatlarında Protein Polimorfizmi ile Bunların Verimle Olan İlişkileri. TÜBİTAK (Proje No: 1197).
- Crawford, R. D., 1990. Poultry Breeding and Genetics. Chapter 1. Origin And History Of Poultry Species. R.D. Crawford ed., Elsevier, Amsterdam, pp : 1-42.
- Tucker, E. M., Y. Suzuki, and C. Stormont, 1967. Three New Phenotypic Systems In The Blood Of Sheep. Vox Sang. 13: 246-262.