

TÜRKİYE'DEKİ SAFKAN AT IRKLARINDA BAZI ENZİM SİSTEMLERİNİN ELEKTROFORETİK İNCELENMESİ*

The Electrophoretic Investigation of Some Enzyme Systems in Purebreds Horses in Turkey

Metehan UZUN**

Nesrin SULU****

Geliş Tarihi 0 24.02.2000

ÖZET

Bu araştırmada; esteraz enzim sistemi yönünden, 109 Arap, 112 İngiliz ve alyuvar enzim sistemleri (Fosfoglukonat dehidrogenaz=PGD, Fosfoglukomutaz=PGM, Fosfohekzoizomeraz=PHI) yönünden 125 Arap, 123 İngiliz atı incelenmiştir.

Esteraz lokusundaki fenotipik variantların ortaya konulması için alkali poliakrilamid jel elektroforezi ile isoelektrik odaklama yöntemleri birlikte kullanılmıştır. Alyuvar enzim sistemleri ise pH 7.2'de tek bir nişasta jel elektroforezi yöntemi ile tespit edilmiştir.

Esteraz enzim sisteminde; FF, FI, GI, II, FS ve SS olmak üzere altı fenotip Arap atlarında, FF, FI, II, SS ve FS olmak üzere beş fenotip İngiliz atlarında tespit edilmiştir. Her iki at popülasyonunda da allelinin en yüksek genotip frekansına sahip olduğu anlaşılmıştır. Nitekim homozigot II fenotipinin görülme yüzdesi Arap atlarında % 80.74 ve İngiliz atlarında % 75.90 olarak saptanmıştır. Esteraz enzim sistemi yönünden her iki at popülasyonunun da Hardy-Weinberg Dengesi'nde olduğu anlaşılmıştır.

Alyuvar enzim sistemlerinden olan PGD enzim sistemine ait; FF, FS ve SS olmak üzere üç fenotip tespit edilmiştir. FS fenotipinin görülme yüzdesi İngiliz atlarında Arap atlarına göre oldukça yüksek bulunmuştur. PGM enzim sistemi için homozigot SS ve PHI enzim sistemi için homozigot II fenotipleri gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Esteraz, Fosfoglukonat dehidrogenaz, Fosfoglukomutaz, Fosfohekzo izomeraz, At.

SUMMARY

In this study, esterase enzyme systems in 109 Arabian and 112 Throughbreed horses and erythrocyte enzyme systems (Phosphogluconate dehydrogenase = PGD, Phosphoglucomutase = PGM and Phosphoheksoizomerase = PHI) in 125 Arabian and 123 Throughbreed horses were investigated.

Both alkaline Polyacrylamid gel electrophoresis and isoelectric focusing (IEF) were used to identify phenotypic variants of esterase locus. Erythrocytes enzyme systems were analyzed with only a starch gel electrophoresis at pH 7.2.

Six phenotypes as FF, FI, GI, II, FS and SS in Arabian horses and five phenotypes as FF, FI, FS, II and SS in Throughbreed horses were determined in esterase systems. Genotype I had the highest frequency in both Arabian and Throughbreed horses. The frequency of homozygot II phenotype was 80.74 % in Arabian horses and 75.90 % in Throughbreed horses. It was realized that both populations were in Hardy-Weinberg balance according to the esterase enzyme systems.

FF, FS and SS phenotypes were detected in Arabian and Throughbreed horses for PGD which is one of the erythrocyte enzyme systems. The percentage of FS in Throughbreed horses was quite higher than that Arabian horses. In all examined animals, homozygot SS for PGM and II for PHI were observed.

Key Words: Esterase, Phosphogluconate dehydrogenase, Phosphoglucomutase, Phosphoheksoizomerase, Polymorphism, Electrophoresis, Horse

GİRİŞ

İnsan ve hayvanlarda kan grubu faktörleri, serumda, plazmada veya alyuvarlarda bulunan biyokimyasal sistemler, genetik olarak yaşam boyunca değişmezlik gösterirler ve bu sistemler "Genetik İşaretleyiciler" diye isimlendirilirler. Enzim sistemleri de bu Genetik İşaretleyiciler'dendir (1,2).

Genetik İşaretleyicilerin çeşitli kullanım

alanları vardır. Popülasyon genetiği, anne-baba testleri ve türlere ait çeşitli verim özellikleri ve karakterlerin genetik kontrolü çalışmaları bunların en önemlileridir. Ülkemizde safkan at ırkları için yapılan anne-baba testlerinde hem kan gruplarının tespitine yönelik serolojik hem de kan protein sistemlerinin belirlenmesine yönelik elektroforetik yöntemler uygulanmaktadır.

* Bu makale aynı adlı doktora tezinden özetlenmiş olup, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonunca 96-33-00-06 kod nolu proje olarak desteklenmiştir.

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

**** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE.

Safkan at ırklarında geniş bir polimorfizm gösteren esteraz enzim sisteminin lokus sembolü Uluslararası Hayvan Genetiği Derneği tarafından Es ve allelleri F, G, H, I, O, R ve S olarak gösterilmiştir (3). Plasma veya serumda tespit edilebilen bu enzim sistemi için biri asit diğeri alkali pH'da yürütülmesi gereken iki elektroforez yönteminin gerektiği ve alkali ortamda gözlenen F allelinin asit ortamda F veya G, I allelinin I veya H şeklinde görülebildiği, S allelinin ise asit ortamda I olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (4-6). Atlarda bu enzim sisteminin polimorfizminden ilk bahseden araştırmacılardan biri olan Gahne, bu sisteme ait F, I ve S şeklinde üç kodominant allelin yanında O alleline de rastladığını belirtmektedir (7). Daha sonraki yıllarda bir çok at ırkında bu sisteme ait polimorfizm incelenmiş, Poni at ırklarında F, G, H, I, O ve S allellere rastlanılmış ancak H ve O allelinin çok nadir görüldüğü belirtilmiştir (8). Bowling ve Clark, safkan İngiliz atlarında F, I ve S, safkan Arap atlarında F, G, I ve S allelleri belirlemişlerdir (9).

Atlarda anne-baba testlerinde esterazın yanısıra, alyuvar enzim sistemleri olarak bilinen Fosfoglukonat dehidrogenaz (PGD), Fosfoglukomutaz (PGM) ve Fosfohekzoizomeraz (PHI) enzim sistemleri polimorfizmine de başvurulmaktadır. Bunlardan PGD, sistematikte 6-fosfo-D-glukonat olarak ta bilinen ve kod numarası 1.1.1.44 olan, ISAG tarafından lokus sembolü PGD, allelleri D, F ve S olarak belirtilen bir enzim sistemidir (3,10). Enzim dünyanın çeşitli bölgelerinde yaşayan at ırklarının çoğunda FF, FS ve SS fenotiplerini gösterir (11,12). Enzim sistemine ait D alleli ise safkan olmayan ırklarda, ancak oldukça seyrek olarak ortaya çıkmaktadır (8,13).

PGM ise glukoz-1-fosfotatan glukoz-6-fosfat oluşurken intramoleküler fosfat transferini katalize eden, kod numarası 2.5.7.1 olan ve ISAG tarafından allelleri F, S ve V şeklinde belirtilen bir enzim sistemidir (3,10). Bu enzim sistemi genel olarak at ırklarında F ve S olmak üzere iki kodominant allel tarafından kontrol edilir ve FF, FS ve SS fenotiplerini gösterir. S allelinin hem Arap hem de İngiliz atlarındaki görülme oranı F alleline göre oldukça yüksektir (8,9,14,15).

Atlarda polimorfizm gösteren bir diğeri alyuvar enzim sistemi olan PHI enzim sistemi ISAG tarafından glukozfosfat izomeraz olarak adlandırılmakta ve lokus sembolü GPI olarak

gösterilmektedir (3). Enzim aynı zamanda fosfoglukoz izomeraz veya sadece izomeraz olarak da isimlendirilir. Enzim sisteminde en fazla I alleli gözlemlenirken bazen F alleline derastlanmaktadır (1). Haflinger ırkı atlar ile İsveç atlarında I, F ve S allellerinin birlikte görülmesine dair bildirimler de mevcuttur (8,16).

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali: Araştırmada, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı çeşitli Tarım İşletmelerinde yetiştirilen 234 safkan Arap atı ile özel sektöre bağlı çeşitli işletmelerde yetiştirilen 235 safkan İngiliz atının kan örnekleri kullanıldı.

Yöntem: 1. *Nişasta Jel Elektroforezi:* Bu yöntem eritrosit enzim sistemlerini belirlemek amacıyla kullanıldı ve Bengtsson ve Sandberg'ten modifiye edildi (17). Öncelikle alınan kan örneklerinde alyuvarlar üç kez yıkanarak hemolizat elde edildi. Elektroforez işlemine kadar hemolizatlar -20 °C'de saklandı.

Elektroforez işlemi için ilk olarak pH'sı 7.2 olan tampon çözeltisi hazırlandı (Tablo 1). Hazırlanan bu tampon çözeltisi hem jel hem de elektrot solusyonu olarak kullanıldı. Nişasta jel çözeltisi tampon ve distile su katılarak % 11-12'lik olarak hazırlandı. Jel elektroforez odacığına dökülüp donması beklendikten sonra numuneler katoda 4 cm mesafede olacak şekilde jel üzerine uygulandı. Elektroforez işlemi 15 V/cm akım düşecek şekilde 4.5 saat sürdürüldü. Boyama işlemi için jel önce numunelerin uygulandığı yerden ikiye ayrıldı. Katot tarafında kalan kısım PHI enzim sisteminin boyanması için ayrıldı. Anot kısmı ise yatay olarak tekrar ikiye bölündü ve üstte kalan kısımda PGM, altta kalan kısımda PGD enzim sistemleri boyandı.

Boyama işlemi için taze olarak boyama çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler her bir enzim sistemi için tablo-1'de verilen oranlarda karıştırılarak kullanıldı.

2. *Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE):* Alkali pH'da esteraz enzim sistemi fenotiplerini belirlemek için bu yöntem uygulandı. Esteraz enzim sistemi atlardan elde edilen serumlardan incelenmiştir. Bu yöntemde pH'sı 8.5 olan Tris-Borik asit çözeltisi hen tampon hem de elektrot çözeltisi olarak kullanıldı (Tablo 1). Poliakrilamid jel üç farklı yoğunlukta tek bir plaka

Tablo 1. Elektroforez işlemlerinde kullanılan tampon ve boya çözeltileri.
Table 1. The buffer and staining solutions used in electrophoresis.

Nişasta Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	
Çözeltinin adı	Bileşimi
Ana Tompon Çözeltisi (pH 7.2)	NaH ₂ PO ₄ 12H ₂ O (34.6 g), NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O (14.5 g), EDTA (1 g), MgCl ₂ (1 g), NaOH (1.6 g), Damıtık su (1000 cc)
Nişasta Jel Çözeltisi	Ana tampon çözeltisi (12 ml), Nişasta (Sigma kat. no S-4501, 14.5 g), Damıtık su (108 ml)
Stok Boya Çözeltileri	
A Çözeltisi	Tris (3.6 g), Damıtık su (100 ml)
B Çözeltisi	MgCl ₂ (2 g), Damıtık su (100 ml)
C Çözeltisi	NADP (Sigma kat. no N-3886, 20 mg), Damıtık su (10 ml)
D Çözeltisi	PMS (Sigma kat. no P-9625, 20 mg), Damıtık su (10 ml)
E Çözeltisi	MTT (Sigma kat. no M-2128, 20 mg), Damıtık su (10 ml)
Enzim Boya Çözeltileri	
PGD için	A çöz. (2.5 ml), B çöz. (1.5 ml), C çöz. (0.5 ml), D çöz. (0.5 ml), E çöz. (0.5 ml), Fosfolukonik asit (5 mg).
PGM için	A çöz. (2.5 ml), B çöz. (1.5 ml), C çöz. (1.5 ml), D çöz. (0.5 ml), E çöz. (0.5 ml), Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (10 µl), Glikoz 1 Fosfat (10 mg)
PHI için	A çöz. (2.0 ml), B çöz. (2.0 ml), C çöz. (0.5 ml), D çöz. (0.5 ml), E çöz. (0.5 ml), Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (10 µl), Fruktoz 1 Fosfat (10 mg)
PAGE İçin Kullanılan Çözeltiler	
Stok Çözeltiler	
A Çözeltisi	akrilamid (12 g), Bis-akrilamid (0.3 g), Damıtık su (25.5 ml)
B Çözeltisi	Tris (18.16 g), Sitrik asit (4 g), Damıtık su (25 ml)
C Çözeltisi	Amonyumpersülfat (0.05 g), Damıtık su (25 ml)
Tampon Çözeltisi	Tris (16 g), Borik asit (4 g), Damıtık su (2000 ml)
Esteraz Boya Çözeltileri	
Çözelti 1 (pH 6.8)	Tris (3.63 g), Maleik asit (3.48 g), Damıtık su (300 ml)
Çözelti 2	α Naftil asetat (0.2 g), Aseton (10 ml), Damıtık su (10 ml)
Çöz: Çözelti	

üzerinde hazırlandı (9 10, % 4, % 8) ve elektroforez işlemi 100 voltta sabit akım olacak şekilde 3.4-4 saatte gerçekleştirildi (4). Boyama solusyonu olarak; Tris-Maleik çözeltisi ile α Naftil asetat-aseton çözeltisi kullanıldı (Tablo 1).

3. *İzoelektrik Fokuslama:* İzoelektrik fokuslama yöntemi Weitkamp ve arkadaşları ile Fisher ve Scott'un uyguladığı yöntemler birleştirilerek gerçekleştirildi. Jelin bileşimi aşağıdaki gibi hazırlandı (5,6).

Ampholine pH (4-5)	1 ml
Akrilamit ana çözeltisi	4 ml
Damıtık su	19 ml
Riboflavin (%0.01)	0.2 ml

Burada riboflavin jelin polimerizasyonunu sağlamak için kullanıldı. Hazırlana bu zöçelti bir enjektör aracılığı ile jel kalıbına aktarıldı ve polimerizasyon için oda ısısında 12-15 saat süre ile ultraviyole ışığı altında bekletildi. Polimerize olan jel IEF odacığına alındı ve numuneler 5 katı sulandırıldıktan sonra filtre kağıtlarına emdirilerek jel üzerine uygulandı. Elektroforez işlemi +8 °Cde, 2 Watt sabit akımda yürütüldü. Boyama işlemi alkali PAGE'de olduğu gibi gerçekleştirildi.

İstatistiksel Testler

Gen frekanslarının hesaplanmasında direkt sayım yöntemi kullanıldı. Populasyona uygulanan genetik denge testi esteraz için G istatistiği, PGD için ise X^2 yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (18-20).

BULGULAR

Esteraz Enzim Sistemi: Esteraz enzim sistemini tespit etmek için iki ayrı elektroforez yönteminden yararlanılmıştır. Bunlardan birisi alkali PAGE yöntemidir ve bu yöntemle F, S ve I olmak üzere üç allel ve bu allellere ait FF, II, FS, FI ve IS şeklinde beş fenotip tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu enzim sistemi için uygulanan ikinci yöntem asit pH'da IEF yöntemidir. IEF yöntemi ile Arap atlarında G allelinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2). At populasyonlarında fenotipik veya allellerle ilgili değerler hesaplanırken her iki yöntemde elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir. S alleli ile ilgili veriler sadece alkali PAGE'de

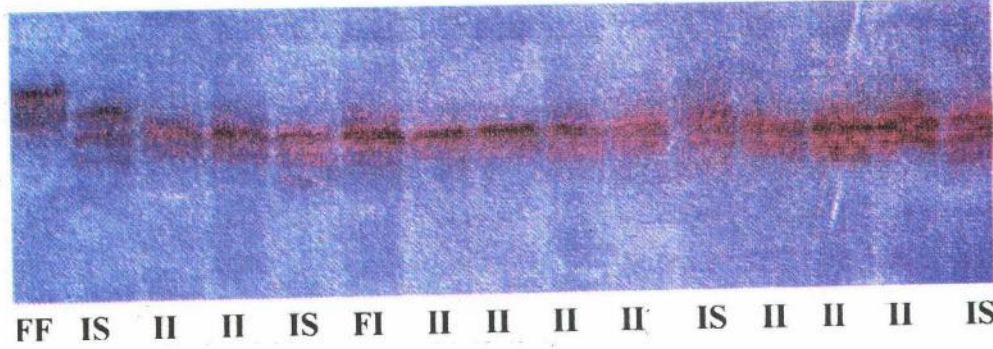
değerlendirilirken F ve I alleleri ile ilgili veriler sözkonusu allelerin IEF yöntemindeki nihai polimorfizmlerine göre hesaplanmıştır.

Esteraz enzim sisteminde hem Arap hem de İngiliz atlarında II fenotipinin en yüksek görülme yüzdesine sahip olduğu anlaşılmıştır. Arap atlarında fenotiplerin görülme yüzdeleri; II için 80.74, FI için 7.34, GI için 6.43, IS için 2.75, FF için 1.83 ve FS için 0.91, İngiliz atlarında ise II için % 75.90, FI için % 14.29, IS için % 8.03, FF için % 0.89 ve FS için % 0.89 değerlerini gösterdiği anlaşılmıştır. Bu değerler ile allel farkları ve beklenen değerler Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Arap ve İngiliz atlarında elde edilen beklenen ve gözlenen gen frekansı değerlerinden yararlanılarak populasyona Genetik Denge Testi uygulanmış ve her iki populasyonun genetik dengede olduğu anlaşılmıştır.

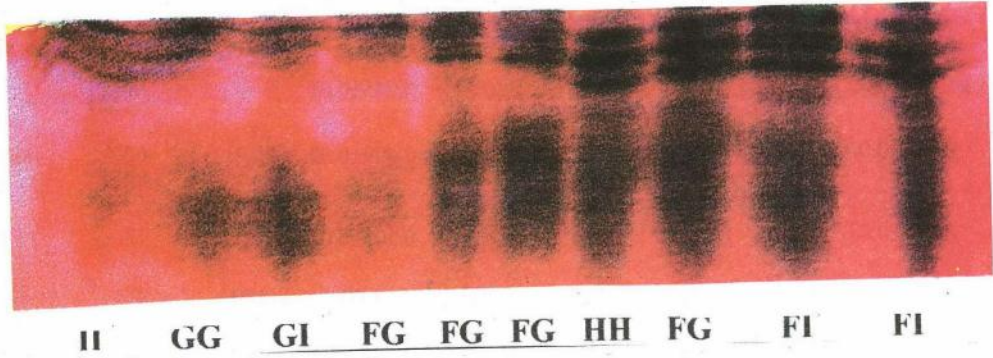
Alyuvar Enzim Sistemleri: Alyuvar enzim sistemleri için yapılan nişasta jel elektroforezinde (pH 7.2), her iki at ırkında da PGD enzim sistemine ait iki kodominant allel tarafından kontrol edilen ve anoda doğru göç eden üç ayrı fenotip belirlenmiştir. Anoda doğru en hızlı göç eden iki bantlı yapı FF, en geride kalan yine iki bantlı yapı SS ve her ikisinin ortasında kalan üç bantlı fenotip ise FS olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3).

Arap atlarında PGD enzim sistemi fenotiplerinden en çok FF'in rastlandığı (% 69.60), SS'in FF'e göre oldukça düşük (% 12.80) ve heterozigot FS'nin ise SS fenotipine yakın bir görülme yüzdesi (% 17.60) gösterdiği anlaşılmıştır. İngiliz atlarında PGD enzim sisteminde fenotiplerden FF % 50.41, FS % 39.33 görülme yüzdeleri ile Arap atlarına göre farklılık arz etmektedirler. Bu at ırkında SS fenotipinin görülme yüzdesi ise % 10.56'dır (Tablo 2). Arap atlarında FS fenotipinin beklenen ve gözlenen değerleri arasındaki belirgin fark istatistiksel olarak da anlamlı çıkmış ve populasyonun PGD enzim sistemi yönünden genetik dengede olmadığını ortaya koymuştur ($P < 0.05$).

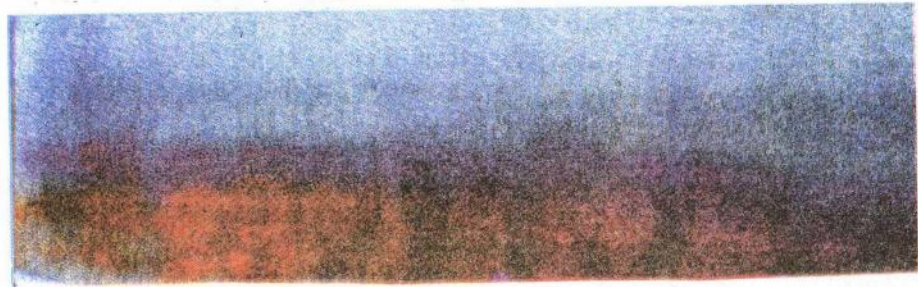
Bir diğer alyuvar enzim sistemi olan PGM enzim sisteminde anoda doğru ilerleyen tekli bir bant yapısına rastlanmıştır. PGD enzim sistemine ait bantların hemen arkasında gözlem



Şekil 1. Alkali PAGE'de esteraz enzim sistemi fenotiplerinin görünümü
Figure 1. Esteraze enzyme systems phenotypes in PAGE.



Şekil 2. IEF yönteminde bazı esteraz enzim sistemi fenotiplerinin görünümü
Figure 2. Some of the esteraze enzyme systems phenotypes in IEF



Şekil 3. Nişasta jel elektroforezinde PGD enzim sistemi fenotiplerinin görünümü
Figure 3. PGD enzyme systems phenotypes in Starch gel electrophoresis.

lenen bu bant yapısı SS olarak isimlendirilmiştir.

PHI enzim sistemi ise diğer iki enzim sisteminin aksine katoda doğru ilerlemiştir. Bu en-

zim sistemine ait tek bir bant yapısı örneklerin uygulanma naktosundan yaklaşık 1 cm ileride tespit edilmiş ve bu bantın homozigot II fenotipine ait olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 2. Safkan Arap ve İngiliz atlarında bazı enzim sistemleri için polimorfik değerler
Table 2. Polymorphic values of some enzyme systems in Arabian and Throughbreed horses

Allel		Safkan Arap					Safkan İngiliz			
Allel	Gen Frek.	Fenotip	Görülme %	Gözlenen (n)	Bekenen (n)	Gen Frek.	Görülme %	Gözlenen (n)	Bekenen (n)	
Es	F	FF	1.83	2	0.39	0.084±0.01	0.89	1	0.80	
			7.34	8	11.64		14.29	16	16.38	
			0.91	1	0.24		0.89	1	0.84	
			-	-	0.42		-	-	-	
G	0.032±0.01	GG	-	-	0.11	-	-	-	-	
			6.43	7	6.21		-	-	-	
			-	-	0.13		-	-	-	
I	0.890±0.02	II	80.74	88	86.33	0.871±0.02	75.90	85	84.96	
			2.75	3	3.49		8.03	9	8.80	
S	0.018±0.009	SS	-	-	0.04	0.045±0.01	-	-	-	
PGD	F	FF	69.60	87	76.83	0.699±0.02	50.41	62	60.27	
			17.60	22	42.33		39.33	48	51.66	
S	0.217±0.03	SS	12.80	16	5.83	0.301±0.02	10.56	13	11.07	
PGM	S	1.00	SS	100	125	125	1.00	100	123	123
PHI	I	1.00	II	100	125	125	1.00	100	123	123

Gen Frek: Gen Frekansı

TARTIŞMA ve SONUÇ

Esteraz enzim sistemi için, atlarda, asit pH'da IEF yönteminin kullanılması gerektiğinden söz eden Fisher ve Scott, nişasta jel elektroforezi ile bu yöntemi karşılaştırmışlar ve IEF'nin daha kolay ve doğru bir sonuç verdiğini belirtmişlerdir (5). Weitkamp ve ark. ise, atlarda esteraz enzim sistemi için alkali PAGE yöntemini kullandıktan sonra F ve G bantlarının tam olarak belirlenebilmesi için IEF'yi kullandıklarını bildirmektedirler (6)

Bu çalışmada da, at populasyonlarında geniş bir polimorfizm gösteren esteraz enzim sistemi için yukarıdaki araştırmacıların bildirimlerine benzer şekilde IEF yöntemi tercih edilmiştir. Alkali pH'da F, I ve S allellerini gösteren bu enzim sistemi asit pH'da ayrıca G, H, O, R ve L allellerini de göstermektedir. Bu nedenle alkali pH'da yapılan PAGE'de fenotiplerin değerlendirilmesinde önemli bir zorlukla karşılaşılmazken asit pH'da bant sayısının art-

ması değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır (4). Araştırmada esteraz enzim sistemi genotipleri (F, I, S ve G) alkali PAGE ve IEF yönteminde birlikte değerlendirilmiştir. Alkali PAGE'de FF olarak gözlenen fenotipin asit pH'da FF, FG ve GG şeklinde, II fenotipinin II, IH ve HH şeklinde görülebildiği, S allelinin ise asit pH'da I olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (4,6). Bu nedenle S alleli ilgili veriler alkali PAGE'deki sonuçlara göre değerlendirilmişken, F ve I alleli ilgili veriler her iki allelin IEF'deki son görünümüne göre ele alınmıştır. İncelenen Arap ve İngiliz atlarında, PAGE'de; FF, FI, II, IS ve FS fenotiplerine rastlanmıştır. IEF yönteminde ise; Arap atlarında ayrıca G alleli heterozigot GI fenotipi şeklinde belirlendiği halde, İngiliz atlarında bu allel gözlemlenmemiştir. Buna rağmen Amerika'daki İngiliz atlarında G allelinin varlığını bildiren araştırmacı da vardır (1).

Hem Arap hem de İngiliz atlarında en yüksek gen frekansına I allelinin (0.890, 0.871) sahip

olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç, Amerika'daki Arap atlarında I alleli için bildirilen 0.93 ve İngiliz atları için bildirilen 0.90, Fransa'daki Arap atı popülasyonu için bildirilen 0.85 gen frekansı değerleri ile benzerlik göstermekte, I genotipinin bütün safkan at popülasyonlarında en yüksek genotipik frekansa sahip olduğu anlaşılmaktadır (9,12). Benzer şekilde ülkemiz Arap atlarında elde edilen; $F=0.06$, $S=0.01$ ve $G=0.03$ değerleri ile İngiliz atlarında elde edilen; $F=0.08$ ve $S=0.04$ gen frekansı değerleri, Amerika'daki Arap atlarında elde edilen; $F=0.02$, $S=0.01$, İngiliz atlarında elde edilen; $F=0.06$ ve $S=0.01$ sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Poni at ırklarında; F, G, I ve S allellerinin yanısıra düşük frekansta da olsa H ve O allellere rastlanıldığı bildirilmektedir (2). Yine Amerika'daki yerli at ırklarında F, I, S ve G allellerinden başka H, O ve R alleleri de belirlenmiştir (1). Ülkemiz safkan at ırklarında ise yukarıda bildirilen alleller belirlenememiştir. Ayrıca safkan olmayan bu at ırklarında elde edilen fenotip ve genotip frekansları da ülkemiz safkan at ırklarında elde edilen değerlere benzemektedir.

Bu araştırmada incelenen alyuvar enzim sistemleri tek bir nişasta jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir. Bunlardan PGD enzim sisteminde FF, FS ve SS fenotipleri tespit edilmiş, her iki at ırkında da FF fenotipi en yüksek görülme yüzdesi göstermiş ve heterozigot FS fenotipinin frekansı Arap atlarında % 17.60 iken, İngiliz atlarında % 39.02 olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Ülkemiz safkan atlarında PGD enzim sistemi gen frekansları açısından Fransa Arap atı, İberik Arap atı, Polonya Arap atı, Audres Arap atı, Beaty Butte atı, Wassuk atı, Amerika Arap ve İngiliz atı, Quarter atı ve Peruvian Paso at popülasyonlarına benzediği anlaşılmaktadır (1,9,12).

Kuzey İsvaç atlarında PGD enzim sisteminde D genine de rastlandığı belirtilmiştir (13). Diğer araştırmacılar da bu geni genellikle safkan olmayan at ırklarında belirlemişlerdir. Türkiye'deki safkan at ırklarında D alleleline rastlanmaması, Op't Hof ve Osterhof'un bildirdiği bu allelin eşek ve katırlar ile safkan olmayan at ırklarında rastlandığı şeklindeki açıklamasının yanısıra, diğer araştırmacıların bu alelin safkan

ırklarda belirlenmediği yönündeki bildirimlerine benzerlik göstermektedir (1,8,9,13).

Arap atlarında beklenen ve gözlemlenen değerler arasında anlamlı fark ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). FS fenotipinin gözlenen değeri 22 iken beklenen değer 42 olduğu, SS fenotipinin ise gözlemlenen değeri 16 iken beklenen değerinin 5 olduğu anlaşılmıştır. Arap atlarındaki bu durumun başka amaçla yapılan seleksiyondan, çevre şartlarının etkisinden veya herhangi bir mutasyondan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, esteraz enzim sisteminin tespiti için alkali PAGE ve asidik IEF yöntemlerinin birlikte kullanılması gerektiği, ebeveyn testlerinde PGD enzim sisteminde yararlanılması gerektiği, tek bir fenotip göstermelerine rağmen PHI ve PGM enzim sistemlerinin de yine ebeveyn testlerinde kullanılabilirliği yargısına varılmıştır. Bununla birlikte bu sistemlere ait polimorfizimin popülasyonun tamamını yansıtacak şekilde daha sağlıklı bir biçimde ortaya konulması için çalışılacak numune sayısının artırılması gerektiğinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Daha fazla numune ile çalışılması durumunda PGM ve PHI enzim sistemlerinin de polimorfizm gösterebilme ihtimalinin artacağı umulmaktadır. Ayrıca elde edilen bu sonuçların, safkan at ırklarında yapılan ebeveyn testlerinde güvenilirlik oranını arttıracığı, bu at popülasyonlarının genetik özelliklerinin belirlenmesi ve genetik hatlarının korunmasına katkı sağlayacağı, yerli at ırklarının genetik çeşitliliğinin ortaya konulması, gen kaynaklarının korunması, diğer at popülasyonları ile olan akrabalıklarının ortaya çıkarılması ve kökenlerinin araştırılması konularında çalışacak araştırmacılara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bowling AT: Population genetics of great basin feral horses. *Anim Genet*, 25 Suppl: 67-74, 1994.
2. Kaminski M: Genetic structure of populations of horses based on distribution of hemotypes. *Biochem Systematics and Ecology*, 10(4): 377-385, 1982.
3. ISAG: Horse Blood Typing Nomenclature. 1992.
4. Bağcı C, Doğrul F: Atlarda serum esteraz sisteminin elektroforetik belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 40(2): 117-125, 1993.

5. Fisher RA, Scott AM: Isoelectric focusing of horse serum esterase isozymes and detection of new phenotypes. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 9: 207-213, 1978.
6. Weitkamp LR, Maccluer JW, Guttormsen SA, King RH: Standardbred stallion gene transmission for twelve protein systems: evidence for selection in trotters. *Anim Genet*, 19: 317-330, 1988.
7. Gahne B: Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses. *Genetics*, 53: 681-694, 1966.
8. Kamiski M, Urbanska-Nicolas H: Electrophoretic polymorphism of proteins in the blood of horses: Studies of eleven pony breeds or populations. *Biochem Systematics and Ecology*, 7: 229-237, 1979.
9. Bowling AT, Clark RS: Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 16: 93-108, 1985.
10. King J: Practical Clinical Enzymology. D Van Nostrand Comp Ltd, London, 1965.
11. Farndale BM, Hubbard DE, Anderson IL: A new PGD variant in New Zealand Thoroughbred horses. *Anim Genet*, 23(Suppl 1): 24, 1992.
12. Kaminski M, Urbanska-Nicolas H: Structure genetique des chevaux Arabes de France: Variants electrophoretiques sanguins. *Revue Med Vet*, 131(8-9): 613-626, 1980.
13. Op't Hof J, Osterhof DR: Isoenzyme polymorphism of 6-phosphoglukonate dehydrogenase (EC.1.1.1.44) in the family Equidae. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 4: 111-113, 1973.
14. Bengtsson S, Sandberg K: Phosphoglucomutase polymorphism in Swedish horses. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 3: 115-119, 1972.
15. Van Haeringen VA, Van Haeringen H: Genetic markers in Friesian horses. *Anim Genet*, (Supp 1): 23, 1992.
16. Sandberg K: Phosphohexose isomerase polymorphism in horse erythrocytes. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 4: 79-82, 1973.
17. Bengtsson S, Sandberg K: A method for simultaneous electrophoresis of horse red cell enzyme systems. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 4: 83-87, 1973.
18. Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F: İstatistik Metotları. Ankara Üniv Ziraat Fak Yay, 2. Baskı, Ankara, 1993.
19. Nei M: Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, 1985.
20. Sokal RR, Rohlf FJ: The Principles and Practise of Statistic in Biological Research. Third ed. WH Freeman and Company, New York, 1995.