

**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***HEDYSARUM POGONOCARPUM* BOISS. 'UN ALTTÜRLERİ ARASINDAKİ  
İZOENZİM VARYASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**AYŞE YAVUZ**

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

114517

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTAKYA**

**EKİM-2001**

Mustafa Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doç. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN danışmanlığında, Ayşe YAVUZ tarafından hazırlanan bu çalışma 04/10/2001 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN

İmza 

Üye : Prof. Dr. Aykut KENCE

İmza 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKTOKLU

İmza 

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Kod No: 86

  
İmza  
04/10/2001  
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Mustafa KAPLANKIRAN

Bu çalışma M.K.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 99F 1502

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
ÖNSÖZ .....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	5
2.1. <i>Hedysarum</i> L. Cinsine Ait Taksonomik Çalışmalar .....	5
2.2. Elektroforetik Çalışmalar Sonucu Elde Edilen Genel Bilgiler .....	5
2.3. Bitkilerle Yapılan Önemli Elektroforetik Çalışmalar .....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	16
3.1. Materyal .....	16
3.1.1. Çalışılan Populasyonlar .....	16
3.1.2. Kullanılan Tohumların Toplanması ve Saklanması .....	16
3.1.3. Elektroforetik Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler .....	16
3.2. Yöntem .....	19
3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi .....	19
3.2.2. Örneklerin Hazırlanması .....	21
3.2.3. Enzim Elektroforezi .....	22
3.2.3.1. Nişasta-Jel Hazırlanması .....	24
3.2.3.2. Jele Örnek Yüklmesi ve Yürütülmesi .....	24
3.2.3.3. Jellerin Kimyasal Boyanması .....	25
3.2.3.4. Sonuçların Yorumlanması .....	28
3.2.4. İstatiksel Yöntem .....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	32
4.1. Enzim Fenotipleri .....	32
4.1.1. ADH .....	32
4.1.2. MDH .....	33

4.1.3. PGM .....	34
4.2. Allel Frekansları ve Genetik Çeşitlilik .....	39
4.3. Genetik Yapının Belirlenmesi .....	43
4.4. Genetik Benzerlik ve Genetik Mesafe .....	51
4.5. Türleşme Modeli .....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	57
KAYNAKLAR .....	59
ÖZGEÇMİŞ .....	65
EKLER .....	66
EK 1. ....	67
EK 2. ....	68
EK 3. ....	69
EK 4. ....	72
EK 5. ....	74



## ÖZET

### **HEDYSARUM POGONOCARPUM BOISS.'UN ALTTÜRLERİ ARASINDAKİ İZOENZİM VARYASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

*Hedysarum pogonocarpum* Boiss.'un morfolojik olarak sınıflandırılmasında güçlükler yaşanan iki alttürünün (*H. pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum* ve *H. pogonocarpum* subsp. *haradjani* (Rech. fil.) B. Yıldız & E. Aktoklu) izoenzim çeşitliliği incelenerek taksonomik kategorilerinin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Subsp. *pogonocarpum* için Malatya'dan, subsp. *haradjani* için Kahramanmaraş'tan toplanan örneklerde, üç enzim sistemi (Alkol dehidrogenaz, Malat dehidrogenaz, Fosfogluco mutaz) yatay nişasta jel elektroforezi tekniği ile incelenmiştir.

Araştırmada, analiz edilen üç enzim sisteminde toplam dört lokus (ADH, MDH-1, MDH-2, PGM-2) belirlenmiştir. Bu dört lokustan sadece biri (MDH-2) her iki alttürde monomorfik; diğerleri polimorfik olarak saptanmıştır. *H. pogonocarpum*'un her iki alttüründe polimorfik lokusların oranı % 75, her bir lokustaki ortalama allel sayısı 1.8 olarak bulunmuştur. ADH izoenzimlerinin genotipleri her iki alttürün popülasyonları için Hardy-Weinberg dengesinde bulunurken, MDH-1 lokusu bakımından beklenenden fazla ( $P<0.001$ ) heterozigotluk gösterdikleri belirlenmiştir. PGM-2 lokusu ise subsp. *pogonocarpum*'da önemli miktarda heterozigotlukta eksiklik ( $P<0.01$ ) açığa çıkarırken subsp. *haradjani* Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuştur. Toplam genetik çeşitliliğin % 10'u popülasyonlar arasındaki farklılaşmadan kaynaklanmıştır. Gen akışımın düzeyi her bir kuşakta 2.05 olarak bulunmuştur. NEI'nin genetik mesafe katsayısı 0.119, genetik benzerlik katsayısı ise 0.888 olarak ölçülmüştür. NEI'nin genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri, çalışılan popülasyonların *H. pogonocarpum*'un alttürleri olarak kabul edilebileceğini göstermiştir.

2001, 74 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Hedysarum pogonocarpum*, İzoenzim, Allozim, Genetik Çeşitlilik, Sistemik, Takson, Genetik Farklılaşma, Alttür, Nişasta Jel Elektroforezi

## ABSTRACT

**THE INVESTIGATION OF THE ISOENZYME VARIATION AMONG THE SUBSPECIES OF *HEDYSARUM POGONOCARPUM***

There are various difficulties in morphological classification of two subspecies of *Hedysarum pogonocarpum* Boiss. For this reason, we studied the molecular characteristics of these subspecies (*H. pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum* ve *H. pogonocarpum* subsp. *haradjani* (Rech. fil.) B. Yıldız & E. Aktoklu) such as the isoenzyme variations to identify their taxonomic category. We investigated Alcohol dehydrogenase, Malate dehydrogenase, Phospho glycomutase by horizontal starch gel electrophoresis in subsp. *pogonocarpum* and subsp. *haradjani* samples collected from Malatya and Kahramanmaras respectively.

We identified the ADH, MDH-1, MDH-2, PGM-2 loci in the analysed three enzyme systems. Of the four loci identified only MDH-2 was monomorphic in both subspecies. The others were polymorphic. We found that the polymorphic loci of both subspecies of *H. pogonocarpum* was 75 % and the average allele number in each locus was 1.8. We also found that the genotype of the ADH isoenzymes of both subspecies populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. However, it was observed that for the MDH-1 locus there were more heterozygosity ( $P < 0.001$ ) than the expected. While the subsp. *haradjani* was found to be on Hardy-Weinberg equilibrium, the PGM-2 locus of the subsp. *pogonocarpum* displayed a considerable deficiency ( $P < 0.01$ ) in heterozygosity. 10 % of the total genetic variation was due to the interpopulational differentiation. The level of gene flow was found to be 2.05 per generation. Nei's genetic distance coefficient was 0.119 and genetic identity was found to be 0.888. These measured values propose that the sample populations analysed could be accepted as subspecies of *H. pogonocarpum*.

2001, 74 pages

**Key Words:** *Hedysarum pogonocarpum*, Isoenzymes, Allozymes, Genetic Variation, Systematic, Taxon, Genetic Differentiation, Subspecies, Starch Gel Electrophoresis

## ÖNSÖZ

Günümüze kadar bitkilerin tanımlanmaları çoğunlukla morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır. Fakat, özellikle *Hedysarum pogonocarpum* gibi iki ya da daha fazla alttüre sahip politipik türlerin sistematiklerinin yapılması oldukça fazla güçlüklerle doludur. Çünkü, politipik türler birbirlerinden farklı olan allopatrik popülasyonlardan oluşurlar. Fakat bilindiği gibi, bütün eşeyli çoğalan organizmalara ait popülasyonlar birbirlerinden zaten az şekilde farklıdır ve her zaman bireyler arasında bir takım varyasyonlar vardır. Bu allopatrik popülasyonların sistematiklerinin güvenilir bir şekilde yapılabilmesi için varyasyonların sınırlarının belirlenmesi ve bir ölçüm haline getirilmesi gerekir. Bu nedenle bu gibi coğrafik ırkların tanımlanmasında çoğu zaman morfolojik özellikler yetersiz kalabilmekte ve moleküler tekniklerin uygulanması gerekebilmektedir.

Bu alanda kullanılan tekniklerin başında izoenzim ve proteinlerin elektroforetik analizi gelmektedir. Son yıllarda DNA analizi de bu alanda önem kazanmıştır. Doğrudan DNA dizilimindeki varyasyonu inceleme genetikte gelinen son noktadır. Sistematik çalışmalarında da DNA kullanımının popülaritesi artsa da bu enzim elektroforezinin değerini azaltmaz. İki yöntem birçok durumda birbirlerini tamamlarlar. Örneğin, kloroplast genomu, bitki popülasyonları arasındaki ve içindeki genetik varyasyonu ve türleşmeyi tayin etmeyecek kadar korunmuştur. Kloroplast DNA'sı filogeniyi incelemek için faydalıdır fakat, allelik bilgi popülasyon düzeyindeki genetik varyasyonu göstermesi bakımından daha faydalıdır (CRAWFORD, 1990).

Bu çalışma ile sistematik açıdan problemlili bir tür olan *H. pogonocarpum*'un allopatrik popülasyonlarının moleküler düzeyde analizi ile sınıflandırılmasına ışık tutulmaya çalışılacaktır. Ayrıca, ülkemizde henüz yaygınlaşmaya başlayan izoenzimlerin elektroforetik analizleri, daha çok genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılmaktadır; oysa sistematik alanında kullanılması sınırlı kalmıştır. Bu yüzden, bu çalışmanın izoenzim bilgisinin taksonomik problemlili türlerde uygulanmasının ülkemizde de yaygınlaşmasına katkıda bulunması beklenmektedir.

Bu konuda çalışmamı sağlayan, değerli fikirleriyle katkıda bulunan ve bana olan güveni ile her zaman destek olan Akademik Danışmanım Sayın Doç. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN'a (MKÜ, Biyoloji Bölümü) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Danışman hocamla beraber çalışma konumu belirleyen, fotoğraf çekimlerini yapan, çalışmada kullanılan tohumları sağlayan ve materyalle ilgili bilgilerinden faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKTOKLU'ya (MKÜ, Biyoloji Bölümü), laboratuvarlarında gözlem yapmamı ve istatistik programlarını kullanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Aykut KENCE'ye ve yardımlarından dolayı aynı bölümden Necva HADIMOĞULLARI'na (ODTÜ, Biyoloji Bölümü), çalışmamın her aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, teknik ve istatistik ile ilgili sorunlarımın çözümünde katkıda bulunan Sayın Arş. Gör. Nuray KAYA'ya (Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), yardımlarımı gördüğüm Sayın Prof. Dr. Kani IŞIK'a (Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), Sayın Doç. Dr. Cemal TURAN'a (MKÜ, Su Ürünleri Fakültesi), Sayın Yrd. Doç. Dr. İrfan KANDEMİR'e (Karadeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), Arş. Gör. D. Alpaslan KAYA'ya (Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi) ve Arş. Gör. Ersin DEMİREL'e (MKÜ, Biyoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca manevi desteklerinden dolayı Arş. Gör. E. Şebnem YILMAZ'a (MKÜ, Biyoloji Bölümü), Arş. Gör. Yelda BÜYÜKAŞIK'a (MKÜ, Biyoloji Bölümü), Arş. Gör. Erol ATAY'a (Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), Arş. Gör. Nuray ERGÜN'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), Arş. Gör. Birgül ÖZCAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ve sevgili aileme teşekkür ederim.

99-F-1502 No'lu "*Hedysarum pogonocarpum* Boiss. 'un alttürleri arasındaki izoenzim varyasyonlarının araştırılması" adlı Yüksek Lisans Tez Projesi M.K.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ****Simgeler**

g	gram
L	litre
M	molarite
$\mu$ L	mikrolitre
ml	mililitre
U	ünite (enzim birimi)

**Kısaltmalar**

BIOSYS	Biochemical Systematics
D	NEI'nin Genetik Mesafe Katsayısı
E. C. No	Enzyme Comission Number
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
I	NEI'nin Genetik Benzerlik Katsayısı
IUB	International Union of Biochemists
M	Her bir kuşaktaki gen akımı miktarı ( $N_{em}$ )
MKÜ	Mustafa Kemal Üniversitesi
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; Thiazolyl blue
NAD	$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid, redüklenmiş formu
NADP	$\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ODTÜ	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
6PGDH	6-fosfoglukoz dehidrogenaz
PMS	Phenazine Methosülfate

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	sayfa
Çizelge 3.1. İzoenzim araştırmasında kullanılan <i>H. pogonocarpum</i> populasyonlarının morfolojik özellikleri hakkında bilgiler.....	17
Çizelge 3.2. <i>H. pogonocarpum</i> populasyonlarının coğrafik konumları ile ilgili genel bilgiler .....	17
Çizelge 3.3. Özütleme tamponu bileşenleri .....	21
Çizelge 3.4. <i>H. pogonocarpum</i> 'un embriyo dokusunda çalışılan enzimler hakkında bilgiler .....	23
Çizelge 3.5. Çalışılan enzimlerin boyama tamponu ve boya maddeleri .....	27
Çizelge 4.1. Çalışılan <i>H. pogonocarpum</i> alttürlerinde, 4 lokusta, gözlenen allel frekansları .....	39
Çizelge 4.2. Çalışılan <i>H. pogonocarpum</i> alttürlerinde, 4 lokusta, populasyon içi çeşitliliğe ait parametreler .....	41
Çizelge 4.3. Değişik canlı gruplarının polimorfizm ve heterozigotluk düzeyleri hakkında bilgiler .....	42
Çizelge 4.4. <i>H. pogonocarpum</i> subsp. <i>pogonocarpum</i> 'un polimorfik lokuslarında Hardy-Weinberg dengesinden sapmaları gösteren ki kare ( $\chi^2$ ) testi .....	44
Çizelge 4.5. <i>H. pogonocarpum</i> subsp. <i>haradjani</i> 'nin polimorfik lokuslarında Hardy-Weinberg dengesinden sapmaları gösteren ki kare ( $\chi^2$ ) testi .....	44
Çizelge 4.6. <i>H. pogonocarpum</i> subsp. <i>pogonocarpum</i> 'da heterozigotluktaki eksiklik ya da aşırılıkları gösteren Fiksasyon İndeksi .....	45
Çizelge 4.7. <i>H. pogonocarpum</i> subsp. <i>haradjani</i> 'de heterozigotluktaki eksiklik ya da aşırılıkları gösteren Fiksasyon İndeksi .....	45
Çizelge 4.8. <i>H. pogonocarpum</i> alttürlerinin, 3 lokusta, Wright'ın F-istatistiği değerleri .....	47

Çizelge 4.9. <i>H. pogonocarpum</i> alttürleri arasındaki genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri .....	51
Çizelge 4.10. <i>H. pogonocarpum</i> alttürleri arasındaki tarafsız genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri .....	51



## ŞEKİLLER DİZİNİ

sayfa

Şekil 3.1.	<i>H. pogonocarpum</i> populasyonlarının Türkiye'deki yayılış alanları .....	18
Şekil 3.2.	Çalışmada kullanılan elektroforez setinin görünümü .....	18
Şekil 3.3.	Çalışmada kullanılan <i>H. pogonocarpum</i> 'a ait meyve örnekleri..	20
Şekil 3.4.	Çimlendirilip elektroforetik çalışma için uygun hale getirilmiş <i>H. pogonocarpum</i> tohumları .....	29
Şekil 3.5.	Monomerik ve dimerik enzimlerin nişasta jel elektroforezinde meydana getirdikleri zimogramlar .....	29
Şekil 4.1.	ADH enziminin zimogramı .....	35
Şekil 4.2.	ADH enziminin zimogramı .....	36
Şekil 4.3.	MDH enziminin zimogramı .....	37
Şekil 4.4.	MDH enziminin zimogramı .....	37
Şekil 4.5.	PGM enziminin zimogramı .....	38
Şekil 4.6.	PGM enziminin zimogramı .....	38

## 1. GİRİŞ

*Fabaceae*, cins ve tür sayısı bakımından Dünya'da *Asteraceae* ve *Orchidaceae*'den sonra gelen üçüncü büyük familyadır. HEYWOOD tarafından 1971'de *Fabaceae* familyasının Dünya florasında 500 cins ve 12.000'den fazla tür içerdiği belirtilmiştir (BAIRIGANJAN ve PATNAIK, 1989).

Türkiye'nin ekonomik değer taşıyan ve en çok tür içeren familyalarından birisi olan *Fabaceae*'ye dahil *Hedysarum* L. cinsi, *Fabaceae* familyasının *Papilionoideae* alt familyasında sistematik yerini almaktadır. *Hedysarum* cinsi Dünya'da 154, ülkemizde 25 tür (29 takson) ile temsil edilmektedir. Ülkemizdeki türlerin 15'i (% 60) Türkiye için endemiktir. *Hedysarum pogonocarpum* Boiss. da bu endemik türlerden bir tanesidir. Gen merkezi Orta Asya olarak kabul edilen *Hedysarum*'un en önemli gelişme merkezlerinden biri Anadolu'dur. Tanımı güç türlerden oluşan *Hedysarum* cinsi, çiçekleri, meyvesi ve tüy durumu özellikleriyle oldukça gösterişli ve hoş kokulu türleri içermektedir (YILDIZ ve AKTOKLU, 1996).

*H. pogonocarpum*, Türkiye'de bulunan *Crinifera* (Boiss.) B. Fedtsch. seksiyonuna dahil türlerden en değişken olanıdır. *H. pogonocarpum*'un doğal yayılış alanı Doğu Anadolu'nun batısı (Amasya, Sivas ve Malatya) olan popülasyonları ile yayılış alanı Güneydoğu Anadolu'nun batısı (Malatya, Kahramanmaraş ve Adıyaman) olan popülasyonlarının sınıflandırılmasında güçlükler ortaya çıkmıştır. Yayılış alanının güneyinde, *H. pogonocarpum* türünün özellikleri, *H. kotschy* Boiss.'ye benzerlik gösterdiğinden dolayı Kahramanmaraş çevresinden toplanan örnekler, araştırmacılar tarafından farklı şekillerde yorumlanmıştır. Kahramanmaraş'ta bulunan Ahr Dağı popülasyonu, 1949'da RECHINGER tarafından, ayrı bir tür olarak (*H. haradjani* Rech. fil) kabul edilmiştir. HEDGE (1970) ise, *H. haradjani*'yi sinonime indirgeyerek *H. kotschy*'ye aktarmıştır.

Daha sonra YILDIZ ve AKTOKLU (1996) tarafından cins ile ilgili yapılan en son çalışmada Kahramanmaraş ve Malatya'nın güneyindeki popülasyonlarda, bitkinin habitusu, boyunun kısalığı, korollanın sarı renkli oluşu ve meyve özellikleri ile *H. kotschy*'den çok *H. pogonocarpum*'a yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu bakımdan RECHINGER'in görüşü daha geçerli görülmüş fakat, güney popülasyonunun *H. pogonocarpum* ile *H. kotschy* arasında geçit özellikleri taşıdığı belirlenmiştir. Bu

nedenle, RECHINGER'in epiteti geçerli kabul edilmiş, ancak ayrı bir tür olacak kadar farklı olmadığından *H. pogonocarpum*'un alttürü olarak aktarılmıştır. Kuzey Malatya, Elazığ ve Sivas popülasyonlarında bitkilerin tamamı uzun-kalkık tüylü, boyu daha kısa, yapraklar tabanda yoğun, yaprakçıklar küçük ve sık, meyve daha küçük olarak tespit edilmiştir. Bu farklılardan dolayı *H. pogonocarpum*'un bu iki farklı popülasyonunun alttür olması uygun görülmüştür.

*H. pogonocarpum* türünün morfolojik olarak sınıflandırılması sırasında, popülasyonların farklı sistematikçiler tarafından değişik şekillerde yorumlanması, bu türle ilgili taksonomik bir problem olduğunun göstergesidir. Bu nedenle, *H. pogonocarpum* türünün sistematikteki yerini daha net ve doğru bir şekilde bulabilmek için moleküler seviyede çalışılması gerektiği açıkça görülmektedir.

Popülasyonlar arasındaki farklılık ya da benzerliklerin belirlenmesi için yapılan ilk çalışmalar, çevre ve genotip etkileşiminin son görünümü olan fenotip üzerine olmuştur. 19. yy'ın sonlarında, türler kromozomların şekli, sayısı ya da bantlanma modellerine göre sınıflandırılmıştır. 20. yy'ın sonlarında hücre aktivitesinin metabolik ürünlerine dayalı çalışmalar yapılmıştır. İkincil kimyasal maddeler, özellikle flavonoid bileşikler, birçok taksonomik araştırmanın bir parçası olmuştur. Fakat moleküler seviyedeki tüm değişiklikler fenotipte ya da ikincil ürünlerde değişiklik meydana getirmeyebilir. (CRAWFORD, 1990; BRIGGS ve WALTERS, 1997). Bu yüzden, morfolojik yolla elde edilen bilgiler, genetik bilginin ancak çok küçük bir kısmını oluşturur. Genotip-çevre etkileşimi, bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi (poligenik kalıtım) ve bir genin birden fazla karaktere etki etmesi (pleiotropik veya polifenik kalıtım) gibi nedenlerden dolayı, morfolojik bilgi her zaman popülasyonlar arasında ve popülasyon içindeki genetik çeşitliliği ve benzerliği saptamak için yeterli olmamaktadır (METTLER ve GREGG, 1969; HARTL ve CLARK, 1989).

Bu nedenle, bireylerin morfolojik özelliklerine dayalı fenotipik farklılıklar her zaman genotipik farklılıkları aynı ölçüde yansıtmamaktadır. Ayrıca, genotipik farklılıklar da her zaman fenotipik olarak saptanamamaktadır. Morfolojik olarak farklılık göstermeyen bireyler, aslında genetik olarak farklı olabilirler. Bunun böyle olup olmadığını saptayabilmek için fenotipin oluşumuna yol açan olaylar dizisinin ilk basamaklarına inmek gereklidir. Bilindiği gibi enzimler genlerin birincil ürünleridir. Bu bakımdan genin ürünü olan enzim düzeyindeki bir analizin, olaylar dizisinin diğer

basamaklarındaki etkilerden arınmış halde bireyin genotipi hakkında daha sağlıklı bilgi vermesi beklenir (TURGUT, 1983; KARA, 1996'dan; LIENG SIRI ve ark., 1990).

Bitki taksonomisi, genetik çeşitlilik ve filogenetik sistematik ile ilgili çeşitli problemlerin çözümlenmesinde oldukça faydalar sağlayan izoenzim elektroforezi, bu alandaki en etkili ve en hızlı metodlardan birisidir (CRAWFORD, 1990).

Elektroforez tekniği, 1960'lı yılların sonlarında popülasyonlardaki genetik çeşitliliği belirlemek için geniş ölçüde kullanılmaya başlamıştır (WILKINSON, 1966). Daha sonraki yıllarda ise; elektroforez, özellikle sistematikteki problemlerin çözümü için tercih edilen bir teknik haline gelmiştir (SARICH, 1977). Elektroforez, değişik biyolojik türlerin genetiksel analizlerinde kullanılan biyokimyasal bir tekniktir (SHIELDS ve ark., 1983). Bu yöntemde enzimler, proteinler, nükleik asitler belirli bir elektrik akımı uygulanarak, elektriksel yüklerine ve molekül ağırlıklarına göre, bir jel sistemi içinde hareket ederler (BREWER ve SING, 1970).

İzoenzimler, ilk kez 1959'da MARKERT ve MOLLER tarafından bir enzimin aynı katalitik özgülüğe sahip farklı formları olarak tanımlanmıştır. Buna göre izoenzimler, yani birden fazla moleküler formu olan enzimler, aynı substratı kullanan fakat molekül büyüklükleri, elektrik yükleri ve üç boyutlu yapıları farklı olduğundan dolayı, elektroforezdeki yürüme mesafeleri farklı olan enzimlerdir. İzoenzim analizlerinin temeli, dokulardan izoenzimleri elektroforetik olarak izole etmek ve enzime özgü boylarla renklendirmek esasına dayanır (WENDEL ve WEEDEN, 1989; STUBER ve ark., 1988).

Elektroforetik analizler, tek bir lokustaki alternatif alleller tarafından kodlanan farklı elektromorfların bir çoğunu gösterebilmektedir. Bu şekilde oluşan allelik ürünler ilk kez 1969'da PRAKASH ve ark. tarafından "allozim" olarak adlandırılmıştır (WENDEL ve WEEDEN, 1989). Yani, eğer enzim birden fazla gen lokusundaki alleller tarafından kodlanırsa izoenzimler meydana gelmekte, eğer bir gen lokusundaki farklı alleller tarafından kodlanırsa allozimler meydana gelmektedir. Fakat günümüzde her iki enzim sınıfı için izoenzim ya da izozim terimi kullanılmaktadır.

Elektroforetik metodun birincil avantajı, genetik benzerlikleri ve farklılıkları ölçebilmesi ve özel bir enzimin taşıdığı izoenzim sayısını dolayısıyla gen lokuslarının sayısını belirleyebilmesidir. 1977'de GOTTLIEB tarafından, izoenzimlerin kodominant kalıtımının, bitkilere ait popülasyonların, türlerin, allel frekanslarının araştırılmasına

olanak sağladığı belirtilmiştir. İzoenzimler kodominant olarak kalıtıldığı için homozigot ve heterozigot genotipler kolayca ayırt edilebilmektedir. Epistatik ve pleiotropik etkileşimler yoktur, bu yüzden genotiplerin doğrudan saptanması mümkündür. Ayrıca izoenzimler çevresel değişimlerden etkilenmezler. Bu nedenle, populasyonlar, populasyon grupları, türler vs. arasındaki benzerlik ve farklılıklar doğrudan ölçülebilmektedir (CRAWFORD, 1985; JACOBS ve OLEO, 1990).

Bu avantajlarından dolayı, izoenzim elektroforezi, bitki sistematigi (BUTH, 1984; CRAWFORD, 1985; MURPHY ve ark., 1996) ve bitki populasyonları arasındaki ve içindeki genetik çeşitliliğin ölçülmesi için yaygın olarak kullanılan moleküler bir teknik haline gelmiştir (LOVELESS ve HAMRICK, 1984).

İzoenzim analizi, günümüze kadar bakterilerden insana, birçok canlı türünün doğal ve yapay populasyonlarındaki genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılmıştır (MAY, 1998). Birçok araştırmacı, izoenzim analizlerini kullanarak orman ağaçlarının doğal ve yapay populasyonlarında genetik çeşitlilik ve gen farklılaşmasının düzeyini belirlemiştir. Oysa izoenzimlerin, kapalı tohumlu bitkilerde çalışılması nispeten sınırlı kalmıştır. *Fabaceae* familyasında, özellikle sistematik amaçlı olarak yapılan izoenzim çalışmaları oldukça azdır. *Hedysarum* cinsine ait türlerin hiçbir doğal veya yapay populasyonunda izoenzimatik temele dayalı herhangi bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu nedenle, çalışma sonucunda elde edilecek bilgilerin, bu alanda yapılacak diğer araştırmalara katkıları sağlanması beklenmektedir.

Bu çalışma ile, sistematik açıdan problemlili bir tür olan *H. pogonocarpum*'un farklı lokalitelerde doğal yayılış gösteren iki populasyonu arasındaki morfolojik değişikliklerin, genetik temelini olup olmadığını araştırmak; belirlenen izoenzimatik özelliklerin, varsa farklılıkların *H. pogonocarpum* türünün populasyonları arasındaki genetik çeşitliliği mi yani türü varyasyonu mu gösterdiği, yoksa türü iki alttürüne ya da iki ayrı türe ayıracak kadar büyük mü olduğunu tespit etmek ve populasyonları sistematik bakımdan doğru taksonlarda yerleştirmek amaçlanmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

*Hedysarum* cinsinin temel kromozom sayısı  $x=8$ 'dir (BAIRIGANJAN ve PATNAIK, 1989). *H. pogonocarpum*'un da içinde yer aldığı *Crinifera* seksiyonuna dahil *H. aucheri* Boiss., *H. rotundifolium* Boiss. & Noë, *H. pycnostachyum* Hedge & Hub.-Mor. türleri ile yapılan bir çalışmada kromozom sayısı  $x=8$  ( $2n=16$ ) olarak bulunmuştur (AKPINAR ve YILDIZ, 1999).

### 2.1. *Hedysarum* L. Cinsine Ait Taksonomik Çalışmalar

*Hedysarum* cinsi ile ilgili ilk kaynak bilgileri 1753'te LINNE ile başlar. Cinsin yazarı olan LINNE, *Species Plantarum* adlı eserinde, 33 adet *Hedysarum* türü tanımlamıştır. *Hedysarum* cinsinin Türkiye türleriyle ilgili ilk ayrıntılı çalışma ve toplu bilgiler, birçok türün yanında, *Hedysarum pogonocarpum* Boiss.'u da bizzat kendisi tanımlayan BOISSIER tarafından 1872'de yayımlanan *Flora Orientalis*'te yer almaktadır. 1902'de FEDTSCHENKO tarafından yayımlanan revizyon niteliğindeki eserde 78 tür ele alınmıştır. Türkiye türleriyle ilgili en kapsamlı çalışma ise HEDGE'in (1970) Türkiye Florası için yapmış olduğu revizyondur. 1996'da YILDIZ ve AKTOKLU tarafından yapılan Türkiye'nin *Hedysarum* türlerinin revizyonunda, *H. pogonocarpum* ve *H. kotschy* türlerinin, özellikleri ayrıntılı olarak incelenerek tanımları ve sınırları yeniden belirlenmiştir. Araştırmacılar, daha önce *H. kotschy*'ye aktarılan *H. haradjani*'nin, *H. pogonocarpum*'a aktarılarak bu türün alttürü olarak kabul edilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir (YILDIZ ve AKTOKLU, 1996).

### 2.2. Elektroforetik Çalışmalar Sonucu Elde Edilen Genel Bilgiler

Proteinlerin elektroforetik dağılımı ve spesifik histokimyasal boyalarla enzimlerin görünür hale gelmesi bitki populasyonlarında genetik olarak kontrol edilen varyasyonları biyokimyasal düzeyde açığa çıkarmayı sağlar. HUNTER ve MARKERT (1957) tarafından geliştirilen zimogram metoduyla, çeşitli doku ve organizmalar

arasında nispeten bol miktarda olan enzimlerin karşılaştırılması, populasyon genetiği, taksonomi gibi çalışmalarda elektroforez tekniğinin kullanımını arttırmıştır (SHAW ve PRASAD, 1970; BROWN, 1979; CRAWFORD, 1985).

NEVO (1978) tarafından, doğal populasyonlardaki genetik çeşitlilik düzeyi bakımından, bitkilerin omurgasızlar ile omurgalıları arasında yer aldığı bildirilmiştir. Bununla beraber araştırmacı, bitkilerdeki genetik çeşitliliğin omurgalıları göre önemli derecede fazla olmadığını belirtmiştir.

HAMRICK ve ark. (1979), genel olarak açık tohumlu bitkilerin populasyon içi genetik çeşitliliğini monokotil ve dikotil bitkilere göre daha yüksek oranlarda koruduklarını ileri sürmüşlerdir.

POWELL ve TAYLOR (1979)'a göre populasyon genetiğindeki temel ilerleme, primer gen ürünleri olan proteinlerdeki varyasyonları çalışmak için moleküler biyoloji kavram ve tekniklerinin kullanılmasında olmuştur.

TEMPLETON (1980)'a göre, bir tür içindeki göç miktarının düşük olması ana populasyonun küçük altpopulasyonlara bölünmesine neden olur. Ayrıca araştırmacı tarafından böyle populasyonların yüksek  $F_{ST}$  değeriyle (populasyonlar arasındaki farklılaşma derecesi) karakterize edildiği bildirilmiştir.

Bitkilerdeki çoğu enzimler izoenzimlere sahiptir. Çünkü, aynı katalitik reaksiyon çoğu kez birkaç hücresel altbölümde (özellikle plastidler ve sitozol) meydana gelir. Bu da aynı reaksiyonun meydana geldiği her bir hücresel altbölümde ayrı bir izoenzime ihtiyaç duyulduğunu ifade eder. İzoenzimlerin hücresel lokasyonu ve sayısı bitkilerde yüksek derecede korunmuştur. Bununla beraber diploid türlerdeki gen duplikasyonu izoenzimlerin sayısını arttırmıştır (GOTTLIEB, 1982).

BUTH (1984) tarafından bildirildiğine göre, 1978'de BUSH ve KITTO adlı araştırmacılar, taksonlar arasındaki genetik farklılık düzeyini ölçmek için birkaç moleküler metodu değerlendirmişler ve sonuçta analizin kolaylığı ve hassasiyet derecesine bağlı olarak izoenzim elektroforezinin ırklar, türler ve yakın akraba cinsleri karşılaştırmak için en iyi metod olduğunu göstermişlerdir.

LOVELESS ve HAMRICK (1984), bitki populasyonlarının genetik yapısını etkileyen ekolojik faktörler üzerine, 1984'e kadar yapılan çalışmalardan derledikleri sonuçları gösteren bir makale hazırlamışlardır. Çalışmaya göre, BROWN (1978; 1979) tarafından, populasyon içindeki ve populasyonlar arasındaki genetik yapıyı belirleyen

temel faktör olarak bitki eşleşme sistemleri belirlenmiştir. HAMRICK (1990); HAMRICK ve GODT (1990) adlı araştırmacılar da yayınladıkları çalışmalarında, populasyonlar arasındaki allozim farklılıklarının dağılımını belirleyen en önemli faktörlerin tozlaşma mekanizmasıyla eşleşme sisteminin kombinasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar; tek yıllık, kendi kendini döleyen türlerin populasyonları arasında % 50'den fazla farklılık olduğu halde baskın olarak dışarıdan dölenen, rüzgarla tozlaşma yapan türlerin populasyonları arasında bu oranın % 10'dan daha az olduğunu belirtmişlerdir. Böylece, polen ya da tohum hareketi daha fazla türlerin gen akımı sınırlanmış türlere göre daha az farklılaşma gösterdiklerini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar tarafından, hayvanlarla tozlaşma yapan türlerin populasyonları arasında ise daha orta seviyelerde farklılaşma olduğu belirtilmiştir.

Coğrafik ırklarla ilgili (varyeteler ya da alttürler) elektroforetik çalışmalar; ırklar arasında, izoenzimleri kodlayan genlerde önemli farklılıkların meydana gelebildiğini ispatlamıştır. Çünkü, coğrafik izolasyon nedeniyle populasyonlar arasındaki gen akışı kesildiğinde, allozim farklılığı başlamakta ve morfolojik ve diğer özellikler aşamalı olarak ayrılarak coğrafik ırkları meydana getirmektedir. 1981'de GRANT tarafından ortaya atılan türleşmenin coğrafik modeline göre, bu türleşme modelinde bir aşama olarak coğrafik ırkların oluştuğu ileri sürülür. Bu gibi ırklar arasında allozistik farklılığın gözlenmesi, herhangi bir zamanda türleşme sürecinin tamamlanacağı (yani üreme izolasyonunun gelişeceği) ve tam türlerin daha düşük genetik benzerlikler göstereceği fikrini destekler. Çoğu örneklerde genetik benzerlik ortalaması aynı taksonun populasyonları için en yüksektir, farklı varyeteler ya da alttürlerin populasyonları için daha düşük ve farklı türler için ise genetik benzerlik ortalaması en düşüktür. Bu durum gen akışının engellenmesi sonucu birçok özelliklerin kademe kademe farklılaşmasıyla oluşur (CRAWFORD, 1985).

EL-KASSABY ve ark. (1987) ile FADY ve CONKLE (1993), populasyonların Hardy-Weinberg dengesinden sapması durumunda gözlenebilecek heterozigot aşırılığının, birbirine benzemeyen genotipler arasında eşleşmenin tercih edilmesi ve heterozigotlar yararına seçim; heterozigot eksikliğinin ise Wahlund etkisi, birbirine benzeyen genotipler arasında eşleşmenin tercih edilmesi ve homozigotlar yararına seçim ile açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

ALONSO ve REGUERA (1989)'ya göre, populasyonların genetik yapısını belirleyen fiksasyon indeksi (F) değerinin sıfırı göstermesi, populasyonun Hardy-Weinberg (H-W) dengesinde olduğunu gösterir. F'nin pozitif değeri popülasyonda H-W oranlarına kıyasla heterozigotlukta eksiklik, F'nin negatif değeri ise popülasyonda H-W oranlarına kıyasla heterozigotlukta aşırılık olduğunu ifade eder.

RAELSON ve GRANT (1989)'a göre, aynı bireylerin farklı gelişim aşamalarındaki enzim fenotipleri, bu enzimlerin farklı izoenzimatik modellerini gösterir.

CRAWFORD (1990) tarafından, bitki sistematikçilerinin, genel olarak taksonomik amaçlar için popülasyon içindeki değişen karakterleri çok az kullandıkları; fakat, bunun hatalı bir düşünce olduğu, aksine genetik çeşitlilik derecesinin ölçülmesinin sistematığe çok faydalı bilgiler sağladığı belirtilmiştir. BROWN (1979)'a göre, genetik çeşitlilik bir türün gen havuzundaki kalıtsal bilginin çeşitliliği olarak tanımlanır ve mutasyon, kromozomal değişimler, göç, doğal seçim, popülasyon büyüklüğü ve eşleşme modellerinin etkisiyle şekillenir.

CRAWFORD (1990) tarafından, allelik bilginin, aynı cinsde ait türleri çalışmayı sağlayan en kullanışlı yol olduğu ve morfoloji, sitogenetik, coğrafik dağılım gibi bilgilerle kombine edildiğinde daha değerli hale geldiği bildirilmiştir.

WEEDEN ve WENDEL (1990) tarafından, bir izoenzim lokusu, özelleşmiş bir biyokimyasal reaksiyonu katalize edebilen bir enzim için yapısal gen olarak tarif edilmiştir.

KAZAN ve MUEHLBAUER (1991) tarafından, enzim elektroforezinin, belirli genlerin farklılığını belirlediği ve böylece taksonlar arasındaki sistematik ilişkileri açıklayabildiği bildirilmiştir.

İzoenzim elektroforezi, özellikle morfolojik olarak benzer taksonların sistematik çalışmalarında faydalar sağlar. Çünkü bu taksonların elektroforetik fenotipleri farklılıklar gösterebilirler. Yani, bazı taksonlarda bulunan allellerden bazıları izoenzimatik karakter olarak tespit edildiği halde, bu genler morfolojik karakterler olarak tespit edilmezler (HORNERO ve PEREZ, 1997).

### 2.3. Bitkilerle Yapılan Önemli Elektroforetik Çalışmalar

WAIN (1983)'de coğrafik türleşme modeline göre, türleşmenin ilk aşamasındaki allopatrik popülasyonları gösteren *Helianthus debilis* Nutt. (*Asteraceae*)'in alttürleri arasındaki genetik mesafe miktarını ölçmüştür. Araştırmacı, bu taksona ait 5 alttür arasındaki genetik mesafe katsayısını 0.08 olarak belirlemiş ve çalışılan alttürlerin coğrafik modele uygun olarak, türleşmenin ilk aşamalarında olduğunu bildirmiştir.

SAIDMAN ve VILARDI (1987) tarafından, morfolojik olarak farklı türler halinde sınıflandırılan taksonomik olarak problemli yedi *Prosopis* L. (*Fabaceae*) türü arasındaki genetik benzerliklerin analizi, izoenzim elektroforezi yoluyla çalışılmıştır. 25 enzim lokusundaki allel frekanslarından elde edilen genetik mesafe miktarı, bu türlerin, biyolojik olarak semi-ya da alt türler olabilecekleri hipotezini desteklemiştir. Böylece, daha önceden kromozom çalışmaları ve biyokimyasal analizler (fenol ve yağ asitlerinin kromatografisi, serbest aminoasitlerin analizi, immünolojik özelliklerin analizi) ile bildirilen "seksiyon içindeki benzerlik, farklı türler olarak tanımlanmalarına göre daha yüksektir; onları tür olarak teşhis edecek belirteçler yoktur" görüşü izoenzimatik olarak da kanıtlanmıştır. Ayrıca; araştırmacılar tarafından, türler arasında üreme etkileşimlerinin belirlenmesinden dolayı, onların tür ve alttür arasındaki ara taksonları ifade eden semitür olabilecekleri bildirilmiştir.

JAASKA ve JAASKA (1988), Aspartat aminotransferaz (AAT) ve Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzimlerinden elde ettikleri bilgilere dayanarak *Phaseolus* L. ve *Vigna* Savi cinslerinin (*Fabaceae*) sistematik açıdan akrabalıklarını incelemişlerdir. *Vigna* altcinsinin *Catiang* (DC.) Verdc. seksiyonunda bulunan *Vigna unguiculata* (L.) Walp., cinsin diğer seksiyonlarından farklı, izole edilmiş ve tekdüze olarak bulunurken bazı izoenzimler bakımından *Phaseolus*'a yakın olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu yüzden, *V. unguiculata*'nın *Vigna* altcinsinden ayrılarak *Catiang* (DC.) Jaaska & Jaaska şeklinde ayrı bir altcins olarak tanımlanmasının uygun olacağını bildirmişlerdir.

RAELSON ve GRANT (1988), tetraploid *Lotus corniculatus* L. (*Fabaceae*) türünün kökeni ile ilgili hipotezleri değerlendirmek için, dört diploid *Lotus* türünün (*L. alpinus* Schleichs., *L. japonicus* (Regel) Larsen, *L. tenuis* Waldst. et Kit, *L. uliginosus* Schkuhrs birkaç coğrafik alana dağılmış örneklerinde yatay nişasta jel elektroforezi yoluyla, yedi enzim sistemindeki izoenzimleri incelemişlerdir. *L. uliginosus*, yedi

lokusta *L. corniculatus*'da bulunmayan monomorfik allellere sahip iken diğer diploid taksonların bu yedi lokus ve diğer lokuslar için *L. corniculatus*'da bulunan allelleri içerdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, araştırmacılar birkaç lokustaki bazı izoenzim allelleri bakımından *L. uliginosus*'un diğer diploid türlerden ve *L. corniculatus*'dan farklı olduğunu ancak *L. corniculatus*'un kökenini doğru bir şekilde belirleyebilmek için daha fazla izoenzim bilgisine ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir.

KOENIG ve GEPTS (1989) tarafından, Orta Amerika'dan Arjantin'e kadar olan geniş bir coğrafik alandan toplanan 83 yabancı *Phaseolus vulgaris* L. (*Fabaceae*) örnek grubu, dokuz polimorfik izoenzim lokusundaki çeşitliliğe ait coğrafik modelleri ve genetik farklılık düzeyini tespit etmek için, allozimik olarak analiz edilmiştir. Araştırmacılar tarafından, genetik farklılıkla ilgili olarak, iki temel coğrafik merkezin bulunduğu (Meksika, Orta Amerika, Kolombiya ve Peru ile Peru ve Arjantin), ayrıca Kuzey Peru'dan alınan örneklerin bu iki temel merkezdeki örneklerden farklı olduğu ve iki ayrı grup arasında geçiş zonu oluşturduğu kanıtlanmıştır.

GARVIN ve ark. (1989), *Phaseolus acutifolius* A. Gray 'un (*Fabaceae*) 8 enzim sisteminden elde ettikleri izoenzimlerin linkaj ve kalıtımını belirledikleri çalışmalarında, Alkol dehidrogenaz (ADH) enziminin dimerik yapıda olduğu ve iki lokus tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir.

CRAWFORD ve WILSON 1978'de diploid, tek yıllık yabancı otlar olan *Chenopodium* L. 'un birkaç yakın akraba türleri arasındaki ve içindeki allozim çeşitliliğini analiz etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından, belirli taksonların beraber büyüdükleri zaman morfolojik olarak karıştırıldığı belirlenmiş ve bu yüzden farklı olduğu şüphelenilen türler elektroforetik olarak çalışılmıştır. CRAWFORD ve WILSON, farklı olduğu düşünülen türlerin, gerçekten birkaç gende alternatif alleller taşıdıklarını ve izoenzim lokusları temeline göre hibridizasyonla ilgili kanıtlar elde edilmediğini ve bu yüzden bunların farklı türler olduğunu belirtmişlerdir (CRAWFORD, 1990).

CRAWFORD (1990) tarafından bildirildiğine göre, JEFFRIES ve GOTTLIEB adlı araştırmacılar 1982'de *Salicornia* L. 'nın morfolojik olarak çok benzer olan iki diploid türünü elektroforetik olarak incelemişlerdir. JEFFRIES ve GOTTLIEB bu taksonların tuzlu bataklıklardaki çok az farklı olan habitatlarda yaşadıklarını fakat birbirleriyle karışmış olarak da bulunabildiklerini tespit etmişlerdir. Bu nedenle,

araştırmacılar bu taksonların gen havuzları farklı olan, farklı iki tür mü yoksa bir populasyon çeşitliliği mi olduğunu belirlemeye çalışmışlardır. Elektroforetik analiz sonucunda, her bir tür içindeki bireyler arasında allozim farklılığı olmadığı belirlenmiş; fakat iki taksonun, 30 genin 6'sında alternatif alleller bakımından monomorfik olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, JEFFRIES ve GOTLIEB tarafından türler arasında hibridizasyon olmadığı ve allozim bilgisinin taksonların farklı iki tür olarak tanımlanması için kuvvetli kanıtlar sağladığı ileri sürülmüştür.

BROWN ve ark. (1990), dikotil ve çok yıllık bir *Fabaceae* türü olan *Glycine canescens* F. J. Herm. 'in yayılış alanının tamamındaki genetik varyasyonu belirlemek için nişasta jel elektroforezi yoluyla allozim varyasyonunu incelemişlerdir. Çalışmalarında 11 enzim sistemine ait toplam 31 lokus belirlemişler ve polimorfik lokusların oranını % 81 olarak bildirmişlerdir.

KAZAN ve MUEHLBAUER (1991), 9 tekyıllık ve 1 çokyıllık *Cicer* L. (*Fabaceae*) türünde, 30 allozim lokusundan elde ettikleri elektroforetik bilgilerle, taksonlar arasındaki filogenetik ilişkileri incelemişler ve genetik uzaklık değerlerine bağlı olarak, birkaç tür grubu belirlemişlerdir. Örneğin, *C. arietinum* L., *C. reticulatum* Lad., ve *C. echinospermum* Dav. çalışılan çoğu lokus için aynı allelleri paylaşırken, çokyıllık *C. anatolicum* Alef bu gruba yakın akraba tür olarak bulunmuştur. İki tekyıllık tür olan *C. chorassanicum* (Bunge) M. G. Popov ve *C. yamashitae* Kitam. birlikte gruplandırılmıştır. Çalışmaya göre, genetik mesafe ve coğrafik dağılım arasında korelasyon tespit edilmiştir. Enzim elektroforezinden elde edilen sonuçlar, daha önceden yayınlanan morfolojik benzerlik ve çaprazlama denemelerine göre yapılan taksonomik ilişkileri, büyük ölçüde desteklemiştir. Bununla beraber; araştırmacılar tarafından, *C. yamashitae* türünün genetik mesafe dendogramındaki pozisyonunun, çaprazlama temeline göre yapılan sınıflandırmayla uyuşmadığı ve *C. yamashitae*'nin, grubun geri kalan türlerinden morfolojik ve genetik olarak tamamen farklı olduğu ileri sürülmüştür.

AHMAD ve ark. (1992), doğal ve kültürlü yapılmış *Cicer* (nohut) türlerinde 16 enzim sistemi çalışmışlar ve sonuçta varsayılan 22 lokustan 21'inin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen izoenzimatik verilere dayanarak türler arasındaki polimorfizmi ve filogenetik ilişkileri incelemişlerdir. Türler arasında belirlenen varyasyon derecesi tür içinde görülmemiştir. Kültürlü yapılmış *Cicer*

türlerinin izoenzim lokuslarında, çeşitlilik belirlenememiştir. Allozim bilgisine göre belirlenen tekyıllık *Cicer* türlerinin filogenisi, daha önceden çeşitli özellikler bakımından yapılanlarla uygunluk göstermiştir. İzoenzim allellerinden birçoğu doğal *C. reticulatum*'da bulunurken, kültür formu olan *C. arietinum*'da tespit edilmemiştir. Bu bakımdan, araştırmacılar nohutun ıslah edilmesinin Eski Dünya'nın bir bölgesinde yapıldığını ve daha sonra "Fertile Crescent" denilen, Türkiye ve Irak'ı da içine alan hilal şeklinde alanı içeren ve tarım alanı olarak kullanılan bölgeye, oradan da Asya ve Amerika'ya yayıldığını ileri sürmüşlerdir.

LISTON (1992), *Astragalus* L.'un (*Fabaceae*) *Leptocarpi* Jones seksiyonuna ait olan ve birçok özellik bakımından diğer altseksiyonlardan ayrılan *Californici* (Gray) Barneby altseksiyonundaki yedi tür ile bunlara akraba beş türün elektroforetik olarak genetik varyasyonunu analiz etmiş, populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmayı ve sistematiklerini çalışmıştır. Aynı türe ait tüm populasyonlar yüksek genetik benzerlik (> 0.961) gösterirken, türler arasındaki genetik benzerlik ortalaması çok daha düşük (0.69) olarak bulunmuştur. Genetik mesafe bilgisinden elde edilen grup analizi dağların güneyinde yetişen, tekyıllık türlerin, çölde yetişen üç tür ve çokyıllık türden tamamen farklılaşmış olduğunu göstermiştir. Türüçü genetik farklılık ve çeşitlilik hem morfolojik olarak tekdüze hem de değişken olan türlerde çok düşük bulunmuştur. Araştırmacılar tarafından, türleşmenin son zamanlarda meydana gelmiş olması, bu durumu en iyi açıklayan model olarak düşünülmüştür.

PASQUET (1993) tarafından, yabani *Vigna unguiculata*'nın yedi alttürü arasındaki taksonomik ilişkiler, izoenzim çeşitliliği analiz edilerek açıklanmaya çalışılmıştır. Sonuçlar önceki morfolojik bilgilerden elde edilen türüstü sınıflandırmayla büyük ölçüde uygunluk göstermiştir. Bununla beraber; subsp. *pubescens* ile var. *spontanea* arasındaki genetik benzerlik morfolojik özelliklerine kıyasla daha fazla bulunmuş, diğer çokyıllık alttürler arasındaki genetik farklılıkların da daha fazla olduğu belirlenmiştir. Araştırmacı, alttürler arasında gözlenen genetik farklılıkların yüksek olmasından dolayı, onların *V. unguiculata*'dan çok eskiden ayrılmış olduklarını ileri sürmüştür. Ayrıca, araştırmacı tarafından *V. unguiculata* türünün temel olarak bir otogam ve tek yıllık grup ( subsp. *pubescens* ve var. *spontanea*'yı içeren) ve birkaç ayrı allogam ve çokyıllık alttürler halinde ayrılmış olabilecekleri belirtilmiştir.



HARRIS ve ark. (1994), *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (*Fabaceae*) türünün 12 popülasyonunda, izoenzim analizi yoluyla, popülasyonlar içindeki ve arasındaki genetik çeşitlilik miktarını ölçmüşlerdir. Araştırmacılar, incelemelerinde kullandıkları üç enzim sistemi olan Aspartat aminotransferaz (AAT), Peroksidaz (PER) ve Fosfoglukoz izomeraz (PGI)'ın *L. leucocephala*'nın iki alttürünü teşhis etmek ve popülasyonlar arasındaki farklılaşmayı belirlemek için yeterli olduğunu bildirmişlerdir. *L. leucocephala*'da tür içi çeşitlilik iki alttür arasındaki farklılıklardan ve subsp. *glabrata* (Rose) Zarate' daki popülasyonlar arası çeşitlilikten dolayı yüksek seviyelerde açığa çıkmıştır. *L. leucocephala*'nın iki alttürü, subsp. *leucocephala* ve subsp. *glabrata*, AAT izoenzimine ait C ve D allellerinin sadece subsp. *leucocephala* popülasyonlarında meydana gelmesiyle birbirlerinden farklılaşmışlardır.

GARWIN ve WEEDEN (1994) tarafından ıslah edilmiş *Phaseolus acutifolius* ile onun gen kaynağı olduğu tahmin edilen doğal *Phaseolus vulgaris* arasında, Akonitaz (ACO) enzimine ait izoenzim varyasyonu çalışılarak, ıslah edilmiş türün coğrafik kökeni araştırılmıştır.

TAYYAR ve WAINES (1996) tarafından, 11 *Cicer* türünde nişasta jel elektroforezi yoluyla belirlenen, 23 izoenzim lokusundaki allelik varyasyon ölçülerek *Cicer* türleri arasındaki ve içindeki genetik farklılık ve türlerarası genetik ilişkiler açıklanmaya çalışılmıştır. NEI'nin popülasyonlar arasındaki farklılıkları ölçen tarafsız genetik mesafesi dört genetik grup oluşturmuştur. Örneğin, ilk grubu *C. reticulatum*, *C. arietinum* ve *C. echinospermum* türleri meydana getirmiştir ve bunlardan ilk ikisi arasında, türeyen-ata tür ilişkisi olduğu belirlenmiştir. *C. arietinum* ve *C. reticulatum* arasında gözlenen düşük genetik mesafe değeri ( $D= 0.18$ ), kültür formu olan *C. arietinum*'un yabani *C. reticulatum*'dan ıslah edildiği hipotezini desteklemiştir. *C. bijugum* Rech., *C. judaicum* Boiss. ve *C. pinnatifidum* Jaub. ise ikinci grubu oluşturmuştur. Bunlardan morfolojik olarak çok benzeyen son iki tür aynı zamanda aynı türe ait popülasyonlarda tipik olarak gözlenen miktarda genetik mesafe değeri ( $D= 0.13$ ) açığa çıkarmıştır. Bu yüzden araştırmacılar tarafından, izoenzim bilgisinin *C. judaicum* ve *C. pinnatifidum* ile ilgili olarak çaprazlama ve protein analizi ile elde edilen onların ayrı türler olduğu görüşünü desteklemediği bildirilmiştir. *C. cuneatum* Rich ise çok farklı izoenzim profili ve kendine has morfolojik özellikleri ile dördüncü tür grubunun tek üyesi olmuştur.

SAIDMAN ve ark. (1996), *Prosopis* cinsinin *Strombocarpa* seksiyonuna ait beş türünün populasyonları arasındaki genetik farklılık ve çeşitlilik derecesini izoenzim elektroforezi yoluyla incelemiştir. Araştırmacılar, *Prosopis reptans* ile *P. strombulifera* arasında bulunan yeterince yüksek genetik benzerlikten dolayı ( $I = 0.986-0.928$ ); onları ayrı türler yerine, *P. strombulifera*'nın coğrafik ırkları ya da alttürleri olarak sınıflandırmanın daha uygun olacağını belirtmişlerdir.

CHAMBERLAIN ve ark. (1996) tarafından, *Leucaena shannonii* Donn. Smith (*Fabaceae*) türüne ait 4 taksonun populasyonları arasındaki ve içindeki genetik çeşitlilik izoenzimlerle analiz edilmiştir. İzoenzim çeşitliliği, *L. shannonii*'nin iki alttürü arasındaki yakın akrabalığı desteklememiştir. NEI'nin tarafsız genetik mesafe katsayısı ( $D = 0.184-0.454$ ) iki alttürün populasyonlarının birbirlerinden oldukça farklı olduklarını göstermiştir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından, önceden alttür olarak ayrılan iki taksonun (*L. shannonii* Donn. Smith subsp. *shannonii* ve *L. shannonii* Donn. Smith subsp. *magnifica* C. E. Hughes) ayrı türler haline getirilmesi gerektiği öne sürülmüştür.

HARRIS ve ark. (1997), Afrika'nın tamamından örneklenen *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. 'nin (*Fabaceae*) 30 populasyonunda beş enzim sistemi yoluyla belirlenen altı izoenzim lokusu kullanarak, populasyonlar arasındaki genetik çeşitliliği incelemiştir. Araştırmacılar genetik çeşitliliği, Batı Afrika populasyonlarında en büyük, Güneydoğu Afrika populasyonlarında en düşük, Etiyopya/Sudan populasyonlarında ise orta seviyelerde ölçmüşler ve populasyonları Güney/Doğu Afrika ve Etiyopya/Batı Afrika olarak iki temel gruba ayırmışlardır.

HORNERO ve PEREZ (1997) tarafından, *Colutea arborescens* L. subsp. *gallica* Browicz ve *C. atlantica* Browicz'dan (*Fabaceae*) alınan 23 populasyonda, on enzim sistemindeki çeşitlilik analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; araştırmacılar, *Colutea* L. türlerine ait o zaman geçerli olan taksonomik sınırlamalarla uyuşmayan, iki temel gen havuzunun bulunduğunu ileri sürmüşlerdir.

MAQUET ve ark. (1997), *Phaseolus lunatus* L. (*Fabaceae*) türünün genetik yapısını ve populasyonları içindeki genetik çeşitliliğini çalışmışlardır. Allozimlerden ölçülen genetik parametreler, *P. lunatus* türünde kendi kendini dölleme eşleşme mekanizmasının hakim olduğunu desteklemiştir. Araştırmacılar, populasyonlarda kendi kendini dölleme, küçük populasyonların varlığı ve düşük gen akışının bulunması

durumunda, populasyonlar arası gen farklılığının populasyon içindeki gen farklılığından daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

JAASKA (1999) tarafından *Vigna* türleri ile yapılan izoenzimatik çalışmada, ADH enziminin iki lokus tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir.

GONZALES-CANDALES ve MONTALIO (2000), *Hippocrepis valentina* Boiss. (*Fabaceae*) türünün doğal populasyonlarında, izoenzim çeşitliliğini analiz ederek, populasyonların genetik yapısını ve genetik farklılaşmayı incelemişlerdir. Araştırmacılar, nişasta-jel elektroforezi yoluyla sekiz enzim sisteminden elde ettikleri sonuçları, yakın akraba iki tür olan *H. balearica* Jacq. ve *H. grosii* Pau 'deki genetik çeşitlilik düzeyleriyle kıyasladıklarında, *H. valentina*'nın daha önceden ileri sürüldüğü gibi, *H. balearica*'dan bağımsız, ayrı bir tür olmasının uygun olduğunu desteklemişlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışılan Populasyonlar

*H. pogonocarpum* türünün iki ayrı lokal populasyonundan (Malatya ve Kahramanmaraş) toplanan tohumlar elektroforetik olarak çalışıldı. *H. pogonocarpum*'un her bir alt populasyonunun morfolojik özelliklerine ait genel bilgiler Çizelge 3.1'de, coğrafik konumları ile ilgili genel bilgiler Çizelge 3.2'de gösterildi. Ayrıca, çalışmada kullanılan *H. pogonocarpum* populasyonlarının Türkiye'deki yayılış alanları Şekil 3.1'de gösterildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Tohumların Toplanması ve Saklanması

Tohumlar, YILDIZ ve AKTOKLU (1996) tarafından yapılan "Türkiye'nin *Hedysarum* L. (*Fabaceae*) cinsine ait Türlerin Revizyonu" adlı araştırma sırasında toplanmıştır. Temmuz-Ağustos aylarında, her populasyondan ayrı ayrı toplanarak, farklı torbalar içine konulan tohumlar; tohum torbaları ilgili populasyonlara ait bilgilerle etiketlendikten sonra çimlendirme işlemine kadar +4 °C'de saklanmıştır. Elektroforetik analiz sırasında ise, *H. pogonocarpum* tohumları Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ekrem AKTOKLU tarafından sağlanmıştır.

##### 3.1.3. Elektroforetik Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal maddeler

Elektroforez için, 31x16 cm ebatlarında 7 cm yüksekliğinde BIO/RAD marka pleksiglas elektroforez tankı ve BIO/RAD marka, Power Pac 1000 model (azami 1000 V, 500 mA, 250 W) güç kaynağı kullanıldı. Laboratuvarda kullanılan bir elektroforez

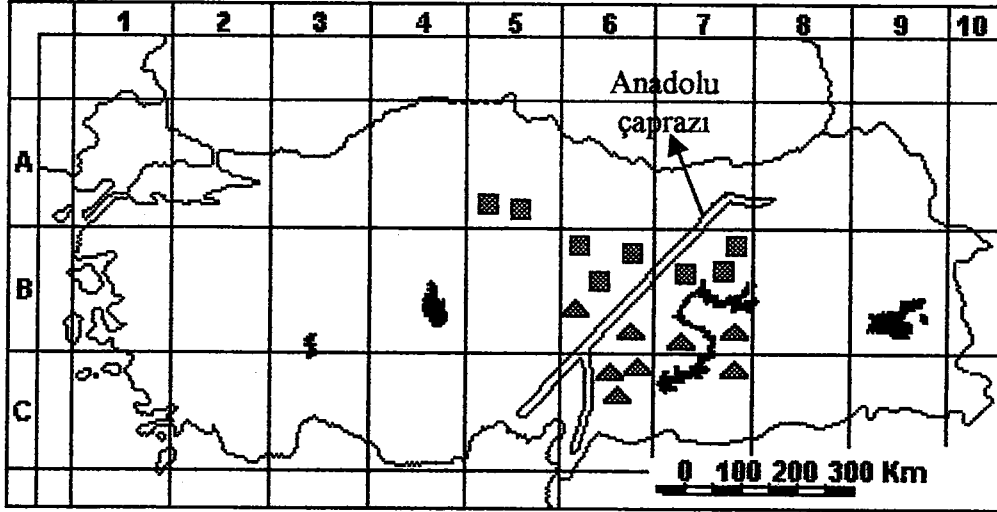
seti Şekil 3.2'de gösterildi. Elektroforetik çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ise Ek 1'de sunuldu.

Çizelge 3.1. İzoenzim araştırmasında kullanılan *H. pogonocarpum* populasyonlarının morfolojik özellikleri hakkında bilgiler (YILDIZ ve AKTOKLU, 1996)

TAKSON	Yaprak	Meyve	Çiçeklenme ve Meyve zamanı	Habitat
subsp. <i>pogonocarpum</i>	Çoğunlukla tabanda, yaprakçıklar sık, (3-)4-7x2-5mm, tomentoz (yünlü)	Legümen, 1-2 segmentli segmentler eliptik, küçük, 7-8 x 5-6 mm	Mayıs-Ağustos	Step, kalkerli alanlar, bağ ve kıraç tarla kenarları, meşelikler
subsp. <i>haradjani</i>	Gövde üzerinde dağınık, yaprakçıklar seyrek, 10-20x4-6 mm, pubescent (tüylü)	Legümen, 1-2 segmentli, segmentler eliptik, büyük, 11-12 x 7-8 mm	Mayıs-Temmuz	Step, kalkerli alanlar

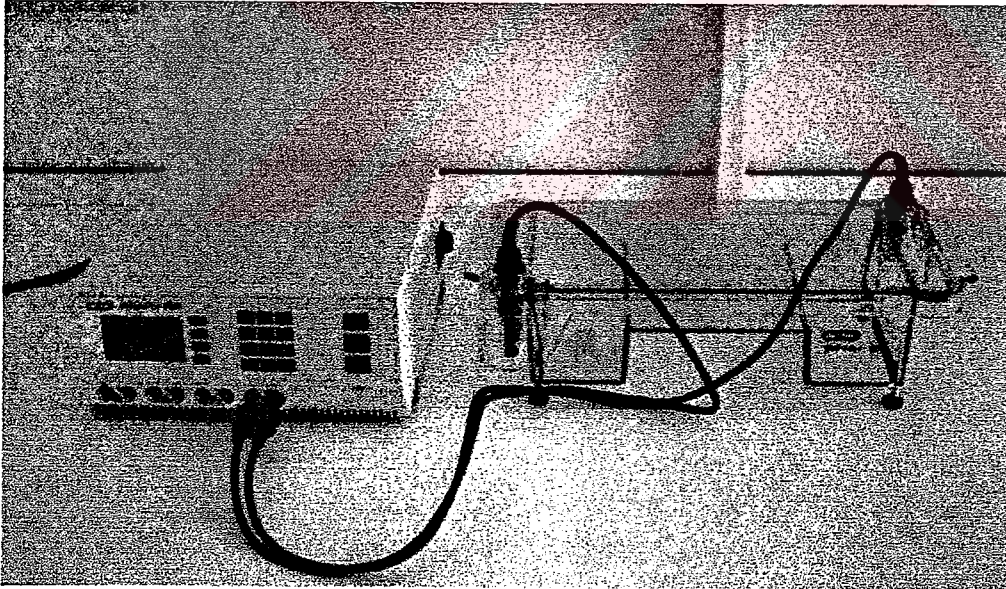
Çizelge 3.2. *H. pogonocarpum* populasyonlarının coğrafik konumları ile ilgili genel bilgiler (YILDIZ ve AKTOKLU, 1996)

TAKSON	Türkiye'de Yayılışı	Genel Yayılışı	Denizden Yüksekliği (m)
subsp. <i>pogonocarpum</i>	A5 Amasya B6 Sivas, B7 Malatya, Elazığ	Endemik	750-1700
subsp. <i>haradjani</i>	B6/7 Malatya C6, C7 Malatya C6 Kahramanmaraş	Endemik	700-1700



Şekil 3.1. *H. pogonocarpum* populasyonlarının Türkiye'deki yayılış alanları

- : *H. pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum*
- ▲ : *H. pogonocarpum* subsp. *haradjani*



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan elektroforez setinin görünümü

## 3.2. Yöntem

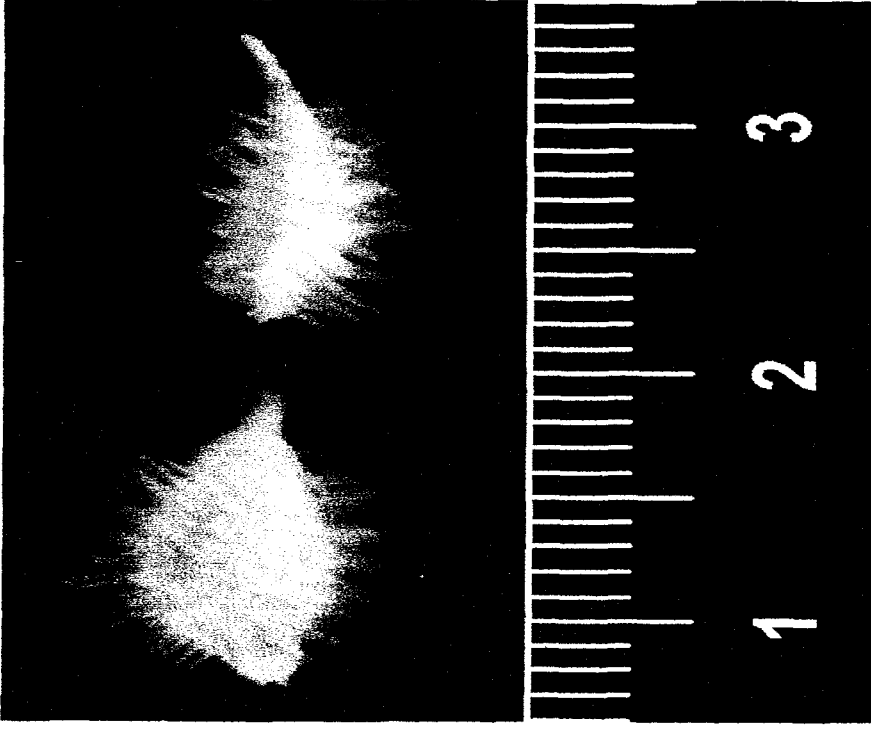
### 3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi

*Fabaceae* familyası kapalı tohumlu bitkilerin (Angiospermae) iki çenekli (Dicotyledonopsida) sınıfında yer alır. Tohum, 2n kromozomlu embriyo ve onu çevreleyen tohum kabuğundan oluşur. Tohumun çimlenmesi için gerekli olan besinler olgun embriyonun kotiledonlarından sağlanır.

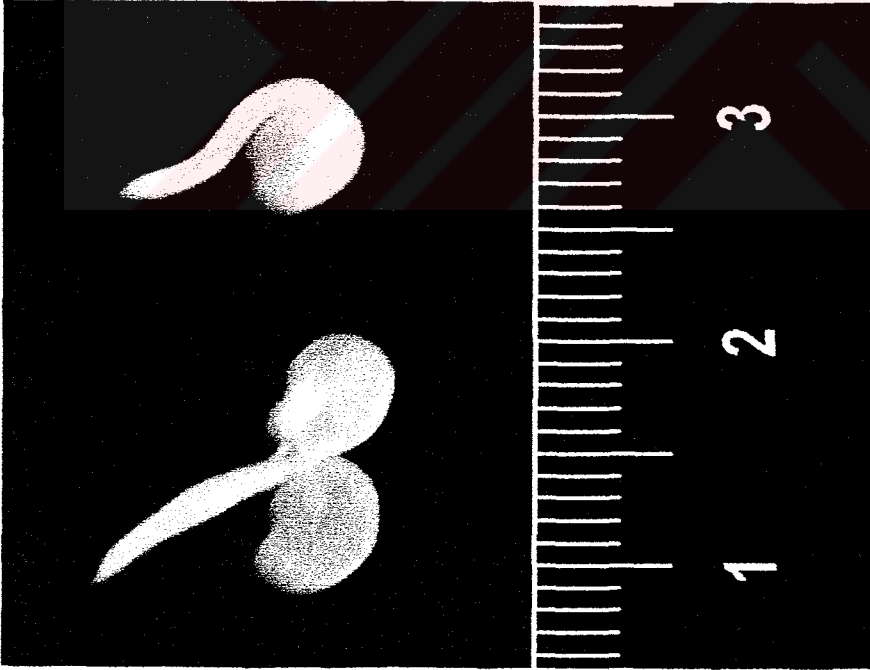
Tohum kabuğunun fiziksel ya da kimyasal yapısı ve üzerinde meyve kabuğunun bulunması çimlenmeyi engelleyebilir ya da geciktirebilir. Suya ve gaza karşı geçirmezlik tohum kabuğu dormansisinin en yaygın şeklidir ve *Fabaceae* familyasında karakteristiktir (KRUGMAN ve ark., 1974). Çalışmada kullanılan *H. pogonocarpum*'a ait örnek meyveler Şekil 3.3'de gösterildi.

Tohumlar çok durağan ve karşılaştırılabilir bitki aşaması özelliği gösterdiklerinden dolayı izoenzim çalışmaları için oldukça uygundur (BOULTER ve THURMAN 1968; HORNERO ve PEREZ, 1997'den). Genç dokular düşük miktarlarda fenolik bileşikler taşıdıklarından dolayı daha fazla enzim aktivitesi gösterirler. Fenollerin ve diğer ikincil bileşiklerin konsantrasyonları bitki yaşlandıkça artar. Bu yüzden, materyal olarak tohumun çimlendirilmesiyle elde edilen genç dokular kullanıldı.

Bu çalışmada tohumların çimlendirilmesi için kullanılan bütün araç-gereçler önceden steril edildi. Çimlendirme işleminden önce tohumların öncelikle meyve kabuğu soyuldu ve daha sonra su içinde 48 saat bekletilerek testanın yumuşaması sağlandı. Bu şekilde elde edilen genç embriyolar ADH enzim sistemini çalışmak için kullanıldı. Diğer enzim sistemlerini çalışmak için ise çimlendirme işlemine devam edildi. Petri kabı içine konulan filtre kağıdı, distile su ile ıslatıldıktan sonra içerisine çimlendirilmeye hazır hale getirilen tohumlar konuldu. Her bir populasyondan alınan örnekler ayrı petri kaplarında çimlendirildi. Çimlendirme işlemi 24 °C sabit sıcaklıkta, havalandırılmalı etüvde, 3-4 günde yapıldı (AKPINAR ve YILDIZ, 1999). Çimlendirilmiş ve çalışmaya hazır hale getirilmiş *H. pogonocarpum* tohumları Şekil 3.4'deki gibidir.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan *H. pogonocarpum*'a ait meyve örnekleri (ölçek: cm)



Şekil 3.4. Çimlendirilip elektroforetik çalışma için uygun hale getirilmiş *H. pogonocarpum* tohumları (ölçek: cm)



### 3.2.2. Örneklerin Hazırlanması

Enzim sistemlerini analiz etmek için çimlendirilmiş tohumlar kullanıldı. Çimlendirilmiş her bir tohumun tohum kabuğu bir pens yardımıyla çıkarıldı. Geriye kalan plumula, kotiledon ve radikuladan oluşan embriyo dokusu elektroforetik analizler için kullanıldı. Enzimlerin hücrelerden serbest kalmasını sağlamak için genç fidenin özütlenmesinde boyutları 12x8x1.4 cm ve üzerinde 0.7 cm çapında ve 1 cm derinliğinde kuyucuklar yer alan pleksiglas özütleme kabı kullanıldı.

Özütleme sırasında enzimlerin bozulmalarını ve aktivitelerini kaybetmelerini engellemek için özütleme işlemi bir buz kabı üzerinde yapıldı. Her bir kuyucuğa birer tane embriyo yerleştirildi ve üzerlerine 75 µL özütleme tamponu eklendi. Özütleme tamponu bazı modifikasyonlar ile CONKLE ve ark. (1982)'na göre yapıldı ve hazırlanışı Çizelge 3.3'de gösterildi. Özütleme tamponu her elektroforez deneyi için taze olarak hazırlandı. Dokular cam bir çubuk yardımıyla iyice ezildi. Elektroforezin ne zaman tamamlanacağına karar vermek için ayrıca % 0.5 oranında sulandırılmış brom fenol mavisi belirleyici olarak kullanıldı. Brom fenol mavisi örneklerin uygulama noktasından yaklaşık 8 cm uzaklaştığında elektroforez işlemi tamamlandı. Örnekler jele uygulanmadan hemen önce özütlendi.

Çizelge 3.3. Özütleme Tamponu (CONKLE ve ark., 1982'den modifiye edilerek)

Bileşenler	Miktar
0.2 M Fosfat tamponu*, pH: 7.5	5 mL
Bovin serum albumin (BSA)	4 mg
Polivinilpirolidin (PVP)	25 mg
Triton x-100	10 µL

\* Hazırlanışı için Ek 2'ye bakınız.

Enzim elektroforezinde kullanılan özütleme tamponunun içeriği oldukça önemlidir. Dokuların ezilmesi sırasında proteinler ve sekonder ürünler arasındaki uygun etkileşimleri sağlayan hücresel kompartımanlaşma bozulur. Özellikle fenoller olmak üzere terpenler, pektinler, resinler, kumarinler ve hatta karotenoid pigmentler proteinlerle kompleks kurarak enzimatik aktiviteyi düşürürler. Bu nedenle özütleme tamponuna fenollerle kompleks oluşturan maddeler konur. Bu amaçla kullanılan PVP ve BSA fenoliklerle hidrojen bağı kurarak çözünemez bileşikler meydana getirir. Böylece fenollerin proteinlere bağlanma yeteneğini sınırlarlar. BSA ayrıca yağ asitlerini de bağlar. Bir deterjan olan Triton X-100 ise hücre zarına bağlı organellerden enzimleri serbest bırakmak için kullanılır (KEPHART, 1990).

### 3.2.3. Enzim Elektroforezi

Elektroforez, enzim gibi belirli bir elektrik yüküne sahip moleküllerin, molekül büyüklüklerine ve elektrik yüklerine bağlı olarak elektriksel alanda, hareket etmelerini sağlayan bir tekniktir. Protein içeren kompleks karışımların elektroforezle yürütülmesi, nişasta, poliakrilamid, silika, agaroz jel ile selüloz asetat gibi çeşitli destek maddelerinden oluşan ortamlarda gerçekleşir. Her jel ortamının, çalışmanın amacına bağlı olarak birbirlerine göre daha avantajlı olan yönleri vardır (BREWER ve SING, 1970). Bu çalışmada nişasta jel elektroforezi tekniği uygulandı. Çünkü nişasta jelin hazırlanması kolaydır, kullanılan madde toksik değildir, daha ucuzdur ve jel üzerine örnek yüklenmesi kolaydır. Ayrıca birçok bireyin çok sayıdaki enzim fenotipi kısa zamanda belirlenebilmektedir (RUSSEL, 1996).

Jel elektroforezinde, içine homojenize edilmiş örnekler yüklenen nişasta jele elektrik akımı uygulanır. Jeldeki proteinler net elektrik yüklerine, ağırlıklarına ve şekillerine göre ayrılırlar. Negatif yüklü moleküller (anyonlar) pozitif yüklü elektroda (anot) doğru hareket ederken pozitif yüklü moleküller (katyonlar) negatif yüklü elektroda doğru (katod) hareket ederler (HARTL and CLARK, 1989; MAY, 1998). Hareket eden her bir molekülün uygun şekilde dağılımı için belirli bir akım ve voltaj ile zamana gereksinim duyulur (McDONALD, 1985). Bu süre, kullanılan tamponun iyonik kuvveti, pH, izoenzimlerin izoelektrik noktaları, moleküler büyüklüğü ile elektrik akımından etkilenir (STUBER ve ark., 1988).

Son aşamada nişasta jel, enzimlerin görünür hale gelmesi için boyanır. Bu amaçla enzim substratını ve boyayı içeren solüsyon jel üzerine dökülür. Böylece enzim substratını kataliz ederek reaksiyonunu gerçekleştirir. Bu şekilde jeldeki enzim-substrat kompleksinin pozisyonu renkli bantlar halinde açığa çıkar (SHAW ve PRASAD, 1970).

Bu çalışmada, Yatay Nişasta Jel Elektrofrez tekniği kullanılarak 3 enzim sistemi incelendi. Çalışılan enzim sistemlerine ait bilgiler Çizelge 3.4'de verildi.

Enzim sistemlerine uygun olarak pH'ları 7.0 ile 8.4 arasında değişen üç farklı jel ve elektrot tamponu kullanıldı. Bu sistemler I, II ve III olarak simgelenildi. Çalışılan enzimler için hangi tampon sisteminin kullanıldığı Çizelge 3.4'de gösterildi.

Jel ve elektrot tamponlarının özellikleri şunlardır:

**Sistem I:** Tris-Sitrat, pH: 7.0

Jel tamponu: 0.009 M tris-baz, 0.003 M sitrik asit.H<sub>2</sub>O ile pH: 7.0'a ayarlandı.

Elektrot tamponu: 0.135 M tris-baz, 0.043 M sitrik asit (monohydrate) ile pH: 7.0'a ayarlandı. (WENDEL ve WEEDEN, 1989; KEPHART, 1990; STUBER ve ark., 1988)

**Sistem II:** Tris-Sitrat-EDTA, pH: 7.1

Jel tamponu: 0.009 M tris-baz, 2.6 mM sitrik asit (monohydrate), 1.3 mM EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (disodium salt) ile PH: 7.1'e ayarlandı.

Elektrot tamponu: 0.135 M tris-baz, 0.04 M sitrik asit (monohydrate), 1.3 mM EDTA (disodium salt) ile PH: 7.1'e ayarlandı (MURPHY ve ark., 1996'dan modifiye edildi).

**Sistem III:** Lityum-Borat pH: 8.1/Tris-Sitrat pH: 8.4

Jel tamponu: %90 0.03 M tris-baz, 0.05 M sitrik asit üzerine, %10 elektrot tamponu ilave edilerek pH: 8.4'e ayarlandı.

Elektrot tamponu: 0.06 M LiOH, 0.3 M borik asit ile pH: 8.1'e ayarlandı (RIDGWAY ve ark., 1970; RAELSON ve GRANT, 1989'dan).

Çizelge 3.4. *H. pogonocarpum*'un embriyo dokusunda çalışılan enzimler hakkında bilgiler

No	Enzimin Adı	Kısaltması	E. C. No*	Tampon sistemi
1	Alkol dehidrogenaz	ADH	1.1.1.1	I
2	Malat dehidrogenaz	MDH	1.1.1.37	II
3	Fosfogluko mutaz	PGM	5.4.2.2 2.7.5.1(eski)	III

\*Enzim Komisyonu referans numarası. Enzim sınıflandırması için IUB (International Union of Biochemists) tarafından verilen numara

### 3.2.3.1. Nişasta-Jel Hazırlanması

Jelin hazırlanmasında elektroforeze uygun olarak hazırlanmış hidrolize patates nişastası kullanıldı. Nişasta jel, farklı büyüklük ve iyonik kuvvetteki protein moleküllerinin elektrik akımı altında birbirinden ayrılması için, örneklerin uygulandığı bir destek dolgu maddesidir (BREWER ve SING, 1970; SHIELDS ve ark., 1983; STUBER ve ark., 1988; ANDREWS, 1990).

Nişasta jel % 12.5'lik olarak elektroforezden bir gün önce hazırlandı. Jel tamponunun 3/2'lik kısmı 1000 mL'lik bir nuçe erleni içine konuldu. Erlen içerisindeki tampon, ateş üzerinde 3-4 dakika ısıtıldıktan sonra ısınan tamponun havası vakum pompası ile uzaklaştırıldı ve 1-2 dakika daha ısıtmaya devam edildi. Bu arada tamponun geri kalan 1/2'lik kısmı tartılarak 100 mL'lik bir beher içerisine konulmuş olan nişasta üzerine boşaltıldı ve bir cam çubuk yardımıyla iyice karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Nişasta çözüldükten sonra, ısınan tampon ile birleştirildi ve berraklaşmaya kadar ateş üzerinde karıştırılarak kaynatıldı. Kaynatma sırasında oluşan hava kabarcıkları tekrar vakum pompası ile uzaklaştırıldı. Hazırlanan jel, cam plakalar üzerine sabitleştirilmiş 15x14x0.3 cm ebatlarında pleksiglas çerçeveler içerisine boşaltılarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Yaklaşık yarım saat sonra jelin üzeri donduğunda kurumasını engellemek için streç film ile kapatıldı ve gece boyunca oda

sıcaklığında tutuldu. Ertesi sabah, jel elektroforez işlemi uygulanmadan bir saat önce +4 °C'ye alındı (CONKLE ve ark., 1982).

### 3.2.3.2. Jele Örnek Yüklenmesi ve Yürütülmesi

İzoenzim özellikleri bakımından iki populasyon arasındaki benzerlik ya da farklılıkların belirlenebilmesi için, her iki populasyona ait örnekler jele, yan yana olacak şekilde uygulandı. Böylece populasyonlar arasında daha doğru ve daha kolay karşılaştırmalar yapılabilmesi sağlandı.

Çalışılacak örneklerin özütlenmesinden hemen sonra, bir gün önceden hazırlanan ve elektroforezden bir saat önce +4 °C'ye alınan jel, bir buz kabı üzerine konuldu. Jel, katodal kısımdan anodal kısma doğru yaklaşık 2.5 cm öteden bir bistüri ile kesildi ve jelin kesilen iki parçası birbirinden ayrıldı. Özütleme kabının her bir kuyucuğundaki örnekler 0.3x1 cm ebatlarında kesilmiş Whatman No:3 kromatografi kağıtlarına emdirilerek jelin kesilen kısmına ince uçlu bir pens yardımıyla uygulandı (LATNER ve SKILLEN, 1968; MURPHY ve ark., 1990). Tüm örnekler jele yüklendikten sonra, kontrol olarak kullanılan brom fenol mavisi de kromatografi kağıdına emdirilerek jele uygulandı. Daha sonra jelin her iki parçası tekrar birleştirildi ve anodal uca konulan bir cam çubuk ile sıkıştırıldı. Elektroforez tankının her iki bölmesine çalışılacak enzime uygun elektrot tamponu konuldu. Jel, elektroforez tankına yerleştirildi. Jel ve elektrot tamponu arasındaki bağlantılar sünger bezler ile sağlandı. Jelin elektroforez sırasında buharlaşarak su kaybetmesini önlemek için jel streç film ile örtüldü. Güç kaynağının + ve - çıkışları ile elektroforez tankının + ve - girdileri arasındaki bağlantı sağlandı. Çalışılan enzime uygun elektrik akımı ve zaman ayarlandı. I. Jel ve elektrot tampon sistemi için 3 saat 50 mA akım, II. Jel ve elektrot tampon sistemi için 3 saat 55 mA akım, III. Jel ve elektrot tampon sistemi için 4 saat 40 mA akım uygulandı (RAELSON ve GRANT, 1989). Elektroforez işlemi, akım uygulandığında oluşan ısınmadan dolayı enzimlerin aktivitelerini kaybetmemeleri için düşük sıcaklıklarda yapılmaya çalışıldı. Bu amaçla elektroforez tankının her iki yönüne buz paketleri konuldu. Her 2 saatte bir, bu buz paketleri başkalarıyla değiştirildi (BREWER ve SING, 1970; SHAW ve PRASAD, 1970).

### 3.2.3.3. Jellerin Kimyasal Boyanması

Çözünebilir proteinlerin büyük çoğunluğu renksiz olduğundan, elektroforezin ardından jel, enzimleri görünür hale getirmek için boyandı. Elektroforez tamamlandıktan sonra, güç kaynağı kapatılarak jel elektroforez tankından uzaklaştırıldı. Jel bir misina ipi yardımıyla yatay dilimlere ayrıldı. Her zaman en üstteki ve en alttaki dilim atıldı. Geri kalan jel dilimi boyama için 22x15x4 cm ebatlarındaki bir cam boyama kabına alındı. Boyama işlemi, enzimlere uygun olarak hazırlanan boyama çözeltilerinin, jel dilimlerinin üzerine dökülmesiyle yapıldı. Boyama çözeltisi, enzim aktivitesinin meydana gelmesi için enzime özgü substrat ve koenzim, iyi bir enzim aktivitesi sağlaması amacıyla çalışılan enzime özgü bir pH'da boyama tamponu, ayrıca elektron taşıyıcısı olarak PMS ve boya olarak NBT (ya da MTT) kullanılarak hazırlandı. Meydana gelen kimyasal reaksiyonda enzim, substratı ile reaksiyona girip onu ürüne dönüştürdüğü sırada koenzime bağlanan bir hidrojen atomu, PMS tarafından NBT ya da MTT gibi bir tetrazolium tuzuna aktarılarak "Formazan" adı verilen mavi renkte bir çökeltinin meydana gelmesini sağladı. Boyamada bazı modifikasyonlar ile CONKLE ve ark. (1982)'nin metodu uygulandı. PGM enzimi için GAUR ve SLINKARD (1990) tarafından önerilen boyama tamponu kullanıldı. Boyama tamponlarının içeriği Ek 2'de, enzimlerin boyama tamponu ve boya maddeleri Çizelge 3.5'de gösterildi. Ayrıca, enzimlerin boyanma reaksiyonları Ek 3'de verildi (HARRIS ve HOPKINSON, 1976; PASTEUR ve ark., 1988).

Jellerin kimyasal boyanmasında kullanılan boya maddeleri, boyama işleminden hemen önce boyama tamponuna katıldı. İyice karıştırıldıktan sonra cam kap içerisindeki jelin üzerine boşaltılarak 37 °C'de, karanlıkta yaklaşık bir saat boyanmaya bırakıldı. Oda sıcaklığından daha yüksek olan sıcaklık, enzim reaksiyon oranını arttırarak daha kısa zamanda boyamayı sağladı. ADH enziminde substrat olarak kullanılan etanolün buharlaşarak uzaklaşmaması için cam kap bir streç film ile örtüldü.

Boyanan jeller hafifçe yıkandıktan sonra, bantlaşma modellerinin genetik yorumları yapılarak kaydedildi. Daha sonra 50 ASA, Kodak renkli negatif film ile fotoğraflandı ve uzun süre korunabilmelerini sağlamak amacıyla sabitleştirici solüsyonda (4 Metanol: 5 Distile su: 1 Asetik asit) saklandı (PASTEUR ve ark., 1988).

Çizelge 3.5. Çalışılan enzimlerin boyama tamponu ve boya maddeleri (CONKLE ve ark., 1982'dan modifiye edilerek)

Enzim	Boyama tamponu	Boya maddeleri
ADH	0.05 M Tris-HCl, pH: 8.3 40 mL	% 95'lik Etil alkol 0.8 mL <sup>1</sup> NAD 0.4 mL <sup>1</sup> NBT 0.4 mL <sup>2</sup> PMS 0.2 mL
MDH	0.05 M Tris-HCl, pH: 8.3 40 mL	1 M Malik asit, pH: 7.5 0.8 mL NAD 0.4 mL NBT 0.4 mL PMS 0.2 mL
PGM	0.1 M Tris-HCl, pH: 7.5 40 mL	% 10'luk $\alpha$ -D-glukoz 1,6-difosfat 0.4 mL $\alpha$ -D-glukoz-1-fosfat 100 mg % 1 MgCl 0.8 mL 6PGDH 10 U NADP 0.4 mL <sup>1</sup> MTT 0.4 mL PMS 0.2 mL

<sup>1</sup> 10 mg/mL

<sup>2</sup> 5 mg/mL

### 3.2.3.4. Sonuçların Yorumlanması

Enzim elektroforezinden elde edilen bilgi, spesifik enzimler için boyanma yoluyla jellerde meydana getirilen bant modelleridir. Farklı bant modelleri farklı lokuslardaki allelleri (izoenzim), ya da bir gen lokusundaki farklı allelleri (allozim) göstermektedir (CRAWFORD, 1990). Elektroforetik olarak incelenen enzimlerin çoğu, monomerik ya da enzimin fonksiyon göstermesi için bir araya gelmek zorunda olan alt birimlerin birleşmesiyle oluşan ve genellikle dimer veya tetramer olan multimerik yapıda bulunurlar. Hangi yapıda olursa olsun, bir enzimi oluşturan alt birimlerin aynı alleller tarafından kodlanması durumunda, jelde tek bir bant gözlemlendi ve böyle bantlar homozigot olarak değerlendirildi. Allozimlerin çoğu kodominant olarak kalıtıldığı için, diploid dokularda heterozigot bireyler her bir allel tarafından kodlanan polipeptidlerin çoklu bantlaşma modelini gösterirler. Bu yüzden, heterozigotlarda görülen bantların sayısı enzimin monomerik ya da multimerik olup olmadığını belirlemek için önemlidir. Heterozigot bireyler jelde, monomerik enzimlerde iki (1a, 1b), dimerik enzimlerde üç (1aa, 2ab, 1bb), tetramerik enzimlerde beş bant (1aaaa, 4aaab, 6aabb, 4abbb, 1bbbb) oluştururlar (KEPHART, 1990; QUICKE., 1993; MURPHY ve ark., 1996; MAY, 1998). Monomerik ve dimerik enzim sistemlerinin nişasta-jel elektroforezinde meydana getirdikleri zimogramları Şekil 3.5'deki gibidir.

Jel üzerinde gözlenen lokuslar uygulama noktasına olan hareket uzaklığına göre adlandırıldılar. Elektroforetik hareket sonucunda, anodal uca en yakın olarak bulunan izoenzim lokusu 1, diğeri 2 ve bu şekilde devam eden numaralandırma yöntemiyle simgelenildi (KOENIG ve GEPTS, 1989; KAZAN ve MUEHLBAUER, 1991). Her bir lokustaki elektroforetik bantlar yaygın olarak bulunan allele olan nispi hareket oranına göre adlandırıldılar. En yaygın allel 100 olarak simgelenildi. Diğerleri için ise şu yol takip edildi. Örneğin, elektroforez sırasında uygulama noktasından 25 mm ötede gözlenen bant 100 ile adlandırdığımız yaygın allel olarak kabul edildiyse, 15 mm ötedeki ikinci bant  $15/25 \times 100 = 60$  şeklinde belirlendi. Ayrıca, anoda en yakın olan allel hızlı (H), katoda en yakın olan allel yavaş (Y), H ve Y allelleri arasında bulunan allel ise orta (H+Y) olarak kabul edildi (RAELSON ve GRANT, 1989).





Şekil 3.5. Monomerik (A) ve dimerik (B) enzimlerin nişasta-jel elektroforezinde meydana getirdikleri zimogramlar: 1,4 ) Homozigot hızlı; 3,6) Homozigot yavaş; 2,5) Heterozigot (hızlı+yavaş)

### 3.2.4. İstatiksel Yöntem

Farklı populasyonları ve farklı genleri karşılaştırabilmek için genetik çeşitlilikle ilgili bazı uygun kantitatif ölçümlere gereksinim vardır (HARTL ve CLARK, 1989). Populasyonlardaki genetik çeşitlilik ile populasyonların genetik yapılarının karşılaştırılabilmesi, elde edilen verilerin ancak uygun istatistiksel metodlar kullanılarak analiz edilmesiyle sağlanabilir. Genetik çeşitlilik, allel frekansı ve heterozigotlukla ilgili parametrelerin belirlenmesiyle ölçülebilir (WILKINSON, 1966). Çünkü NEI (1987)'e göre, bir populasyondaki genetik değişiklik, genellikle allel frekanslarındaki değişiklik yoluyla tanımlanır.

Enzimler genlerin birincil ürünleri olduğuna göre, jel üzerinde enzime özgü boyama yoluyla varlığı tespit edilen her bir enzim, o enzimi kontrol eden allel ya da allellerin varlığını gösterir. Bu nedenle, analiz edilen her bir enzim için her iki populasyonun sahip olduğu alleller nispi hareket hızlarına göre belirlendi ve allel frekansları ayrı ayrı hesaplandı. Populasyonların genetik çeşitliliğini belirlemede çok güvenilir ve anlaşılabilir sonuçlar sağladıkları ve farklı populasyonların karşılaştırılmasını mümkün kıldıkları için aşağıdaki parametreler hesaplandı.

- Polimorfik lokusların belirlenmesi,
- Polimorfik lokusların yüzdesi,
- Polimorfik lokuslardaki ortalama allel sayısı,
- Gözlenen ortalama heterozigotluk (Hg),
- Hardy-Weinberg (H-W) şartlarında beklenen ortalama heterozigotluk (Hb).

En yaygın allelinin frekansı 0.95'i geçmeyen lokuslar polimorfik olarak kabul edildi.

Polimorfik lokusların toplam lokus sayısına bölünmesiyle polimorfizm yüzdesi belirlendi. Ortalama allel sayısı, çalışılan her bir populyasyondaki her bir lokusun sahip olduğu allel sayısının aritmetik ortalaması alınarak belirlendi. Gözlenen ortalama heterozigotluk ise heterozigot bireylerin toplam birey sayısına bölünmesiyle belirlendi.

Populasyonların genetik yapısını karşılaştırabilmek ve populasyonlardaki farklılaşmanın özellikle hangi lokuslardan kaynaklandığını belirleyebilmek için Wright'ın F-istatistiği kullanıldı (JAIN ve WORKMAN, 1967; NEI, 1973; WEIR ve COCKERHAM, 1984; HARTL ve CLARK, 1989). Eşleşme katsayısı ya da fiksasyon indeksi olarak bilinen F-istatistiği, gözlenen genotip oranlarında Hardy-Weinberg koşullarında beklenen genotip oranlarından sapmaları gösterir. Altbölümlere ayrılmış bir populyasyon üç farklı seviyede komplekse sahiptir: bireysel organizmalar (I), alt populyasyonar (S) ve toplam populyasyon (T). Populasyonlardaki gametlere oranla bireyleri oluşturmak için birleşen gametler arasındaki korelasyonun, her bir populyasyon göz önüne alındığında ortalaması olan  $F_{IS}$ , populyasyon içindeki gerçek heterozigotluk düzeyinde Hardy-Weinberg koşullarından beklenen düzeyden sapma olup olmadığını gösterir. Tüm populyasyonların gametlerine oranla bireyleri üretmek için birleşen gametler arasındaki korelasyon olan  $F_{IT}$ , bütün populyasyonlar bir bütün olarak göz önüne alındığında gözlenen heterozigotluk düzeyinde Hardy-Weinberg koşullarından beklenen düzeyden sapma olup olmadığını gösterir. Tüm populyasyonların gametlerine oranla her bir populyasyon içindeki rastgele gametler arasındaki korelasyon olan  $F_{ST}$  ise populyasyonlar arasındaki gen farklılaşmasının derecesini gösterir (NEI, 1973; NEI, 1987). Populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma derecesini ölçen diğer bir istatistik NEI'nin  $G_{ST}$  istatistiğidir. NEI'nin  $G_{ST}$  istatistiği WRIGHT'ın  $F_{ST}$  istatistiğine eşittir (NEI, 1973).

$F_{ST}$  değeri aynı zamanda WRIGHT'ın 1931'de ortaya koyduğu populyasyonların Island Modeli'ne göre, her bir kuşaktaki gen akımının düzeyini ( $N_e m$ ) tahmin etmek için de kullanıldı (SLATKIN, 1985; SLATKIN ve BARTON, 1989). 1993'te SLATKIN'i takiben "gen akımı miktarı" olarak göz önünde bulundurulanan  $N_e m$  değeri, tek bir parametre ile (M) gösterilmeye başlandı [ $M = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$ ] (NEIGEL, 1997).

Populasyonlar arasındaki genetik farklılıkları ve benzerlikleri belirleyebilmek için NEI (1972, 1978) 'nin genetik mesafe (D) ve genetik benzerlik (I) ortalaması hesaplandı. Genetik farklılık ve benzerlik katsayılarının ölçümü, allozim bilgisinin populasyonlar arasındaki karşılaştırmaları için kullanılmasına imkan vermektedir. Bu ölçüm her ne kadar başlangıçta tür içi çalışmalarda uygulanmışsa da (yani, gamma düzeyindeki sistematik çalışmalarda) daha sonra, tür seviyesindeki ve daha yüksek kategorilerdeki taksonların karşılaştırılması çalışmalarında (yani, beta düzeyindeki sistematik çalışmalarda) da kullanılmıştır (BUTH, 1984). İstatistiki hesaplamalarda BIOSYS (IBM PC version 1.7) bilgisayar programı kullanıldı (SWAFFORD ve SALENDER, 1981). İstatistiki hesaplamalara ilişkin ayrıntılı bilgiler ve ilgili formüller Ek 4'te sunuldu.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Enzim Fenotipleri

*H. pogonocarpum*'un iki alttürünün (*H. pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum* ve *H. pogonocarpum* subsp. *haradjani*) doğal yayılış gösterdikleri lokalitelerden (sırasıyla Malatya ve Kahramanmaraş) toplanan örnekler (YILDIZ ve AKTOKLU, 1996), türle ilgili bazı sistematik problemleri çözümlenebilmek için elektroforetik olarak incelendi. ADH, MDH ve PGM enzimlerinden elde edilen enzim fenotipleri her bir alttür (her bir alttür birer populasyon olarak düşünüldü) için ayrı ayrı belirlendi.

Takson	Kısaltması
<i>H. pogonocarpum</i> subsp. <i>pogonocarpum</i>	subsp. <i>pogonocarpum</i>
<i>H. pogonocarpum</i> subsp. <i>haradjani</i>	subsp. <i>haradjani</i>

#### 4.1.1. ADH

ADH zimogramları kullanılan dokuya, dokunun yaşına ve elektroforetik sisteme oldukça bağlı bulundu. Optimal olmayan koşullarda iyi olmayan, çarpık modeller gözlemlendi. ADH enzimi her iki populasyonda tek bir zona sahip bulundu. Bu zonda toplam 2 allel gözlemlendi. Bunlar, nispi hareket hızlarına göre Adh-100 ve Adh-75 olarak adlandırıldı. Bu zonda Adh-100/Adh-100 (homozigot hızlı) ve Adh-75/Adh-100 (heterozigot) olmak üzere 2 farklı genotip belirlendi. Çalışılan hiçbir populasyonda Adh-75/Adh-75 (homozigot yavaş) genotipine sahip bireyler gözlenmedi.

Bu çalışmadakine benzer olarak bir lokus tarafından kontrol edilen enzim fenotipi, *Fabaceae* familyasındaki *Prosopis* cinsinin *P. ferox* türünde görülmüştür (SAIDMAN ve ark., 1996). Fakat ADH'nin, *Fabaceae* familyasına ait olan bazı *Phaseolus* türleri (GARVIN ve ark., 1989), *Vigna* türleri (JAASKA, 1999) ile bazı *Cicer* türlerinde (AHMAD ve ark., 1992) ve ayrıca *Vigna unguiculata*'nın bazı populasyonlarında (PASQUET, 1993) iki lokus tarafından kontrol edildiği bulunmuştur. ADH enzimine ait örnek zimogramlar Şekil 4.1 ve 4.2'de sunuldu.

#### 4.1.2. MDH

MDH enziminde aktif olarak boyanan iki zon belirlendi: MDH-1 ve MDH-2. Bu zonlar aynı katalitik reaksiyonu gerektiren birden fazla hücresel altbölüm (kloroplast, mitokondri, sitozol, plastid gibi) olduğunu gösterir. Her bir zon farklı genler tarafından kodlanan ürünlerdir ve birbirlerinden bağımsızdır (GOTTLIEB, 1982).

Çalışılan tüm örneklerde katoda yakın olan MDH-2 lokusu tek bantlı olarak gözlemlendi ve monomorfik olarak değerlendirildi. Bu lokusta sadece Mdh-100/Mdh-100 (homozigot) genotipi gözlemlendi. Her iki popülasyonun anoda yakın olan MDH-1 lokusu hem monomorfik hem de polimorfik olarak bulunabildi. Polimorfik lokuslarda 5 ile 7 arasında değişen sayıda bant gözlemlendi. Fakat NAD'a bağlı olarak aktivite gösteren MDH dimerik bir enzimdir. Bu nedenle heterozigot genotiplerde 3 tane bant görülmesi gerekir. Bu çalışmada açığa çıkan enzim fenotipi MDH lokuslarının jel üzerinde üst üste çakışmış olmasından ileri gelebilir. Çünkü, MDH enzimi diploid bitkilerde genel olarak 3 izoenzime (WEEDEN ve WENDEL, 1990) ya da 4 izoenzime (GOTTLIEB, 1982) sahiptir. Bu nedenle MDH-1 lokusundaki fazla bantlar jel üzerinde tespit edilemeyen diğer lokus ya da lokusların allelleri olabilir.

Bundan başka, gözlenen fazla bantların sebebi olarak Malik Enzim (ME) düşünülebilir. Çünkü ME'in kullandığı substrat MDH ile ortaktır. Boyama çözeltisinde bulunan malik asit, jel üzerinde bulunan malat dehidrogenaz enzimi ile reaksiyona girdiği sırada malik enzim ile de reaksiyona girebilir. Böylece her iki enzime ait bantlar açığa çıkarak, enzim modelini bozabilir.

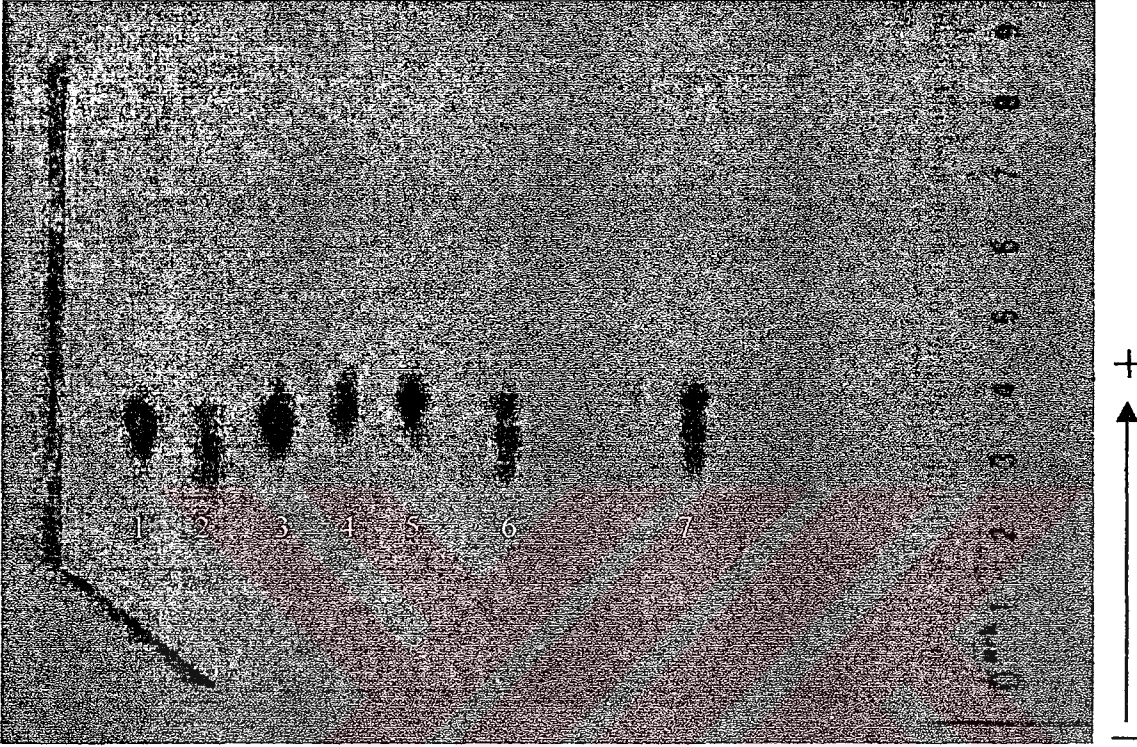
Ayrıca, proteinlerin translyasyon sonrası modifikasyonları, ya da belirli izoenzim lokusundaki allellerin duplikasyonu da gözlenen fazla allellerin sebebi olabilir (GOTTLIEB, 1982; KEPHART, 1990). Bu çalışmada MDH-1 lokusundaki bantlaşma modelleri her popülasyon için farklı bulundu. Subsp. *pogonocarpum* için; Mdh-100/Mdh-100 (homozigot) ile Mdh1-80/Mdh1-100 (heterozigot) genotipleri belirlendi. Subsp. *haradjani* için ise; Mdh1-120/Mdh1-120 (homozigot) ve Mdh1-100/Mdh1-120 (heterozigot) genotipleri bulundu.

Böyle bir MDH fenotipi KAZAN ve MUEHLBAUER (1991) tarafından yapılan çalışmada da görülmüştür. Araştırmacılar bazı *Cicer* türleriyle yaptıkları elektroforetik çalışmada 4-7 arasında bant taşıyan izoenzim lokusları belirlemişlerdir. Genetik olarak

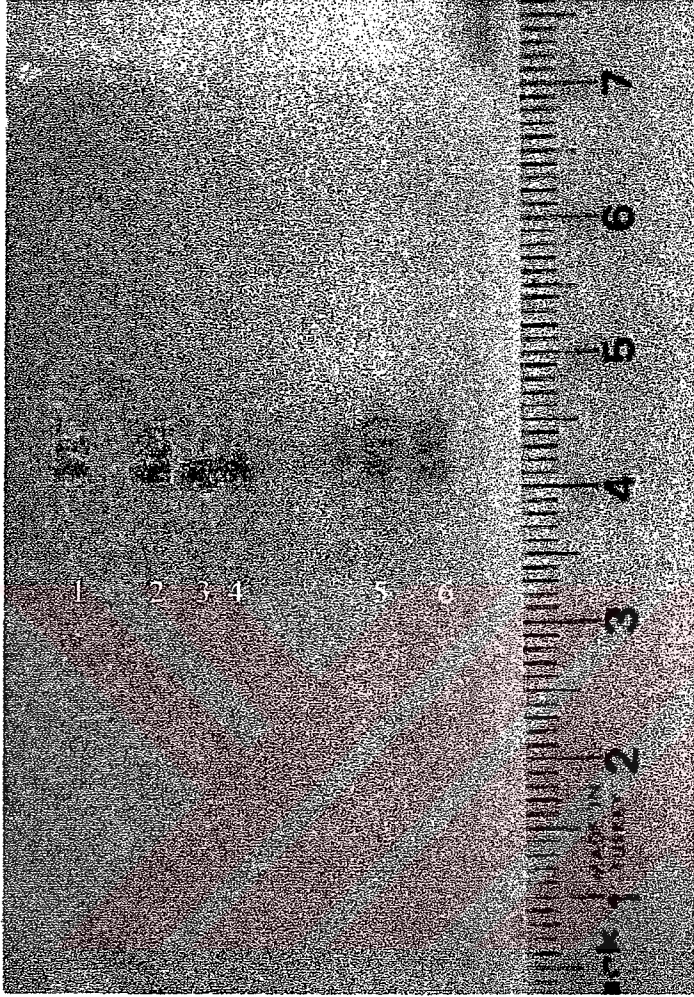
iki lokus tarafından kontrol edilen MDH enzimi JAASKA (1999) tarafından çalışılan *Phaseolus* türlerinde de gözlenmiştir. Ayrıca KOENIG ve GEPTS (1989) adlı araştırmacılar da *Phaseolus* türleriyle yaptıkları elektroforetik çalışmada, MDH enziminde 2 lokus tespit etmişler ve bunlardan MDH-2 lokusunun, Güney Peru ve Arjantin'den toplanan tüm örneklerde bu çalışmadakine benzer şekilde monomorfik olarak sabitlendiğini belirlemişlerdir. MDH enzimi için örnek zimogramlar Şekil 4.3 ve 4.4'teki gibidir.

#### 4.1.3. PGM

PGM enziminde biri daha aktif olarak boyanan iki zon görüldü. PGM-1 ve PGM-2. Fakat PGM-1'in mobilitesi çok hızlıydı ve çoğu zaman jelde gözlenemediğinden dolayı fenotipler belirlenemedi. Gözlenebildiği durumlarda anodal uca çok yakın, zayıf boyanmış ve heterozigot olarak bulundu. Bununla beraber katodal uca yakın olarak bulunan ve PGM-1'e göre çok daha yavaş mobiliteye sahip olan PGM-2 lokusu ise bütün örneklerde çok belirgin bantlar açığa çıkardı. Her iki alttürde hem monomorfik hem de polimorfik PGM-2 lokusları belirlendi. Her iki populasyon birlikte göz önüne alındığında toplam 3 farklı allel bulundu. Bunlar subsp. *pogonocarpum* populasyonu için, Pgm2-100, Pgm2-85; subsp. *haradjani* populasyonu için Pgm2-100 ve Pgm2-110 olarak adlandırıldı. Her iki popülasyonda ortak olan ve en yaygın olarak bulunan allel 100 olarak numaralandırılan alleldi. Fakat, subsp. *pogonocarpum*'da yaygın olarak bulunan allelin dışında sadece Pgm2-85 alleleline rastlanırken Pgm2-110 alleli hiç gözlenmedi. Benzer şekilde subsp. *haradjani*'de de Pgm2-85 alleli belirlenmedi. Bu çalışmadakine benzer PGM fenotipi KAZAN ve MUEHLBAEUR (1991) tarafından bazı *Cicer* türlerinde yapılan izoenzimatik çalışmada görülmüştür. Araştırmacılar bu çalışmada olduğu gibi sadece PGM-2 lokusunu belirleyebilmişlerdir. Fakat tüm popülasyonlarda PGM-2 lokusunu monomorfik olarak bulmuşlardır. Oysa bu çalışmada çoğu lokuslar polimorfikti. *V. unguiculata*'nın bazı alttürlerinde ise her iki PGM lokusu da aktif olarak boyanmış ve PGM-1 ile PGM-2 lokusu belirlenebilmiştir. Çalışılan popülasyonlar bu çalışmadakine benzer olarak hem monomorfik hem de polimorfik bantlaşma göstermişlerdir (PASQUET, 1993). PGM enzimine ait örnek zimogramlar Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterildi.

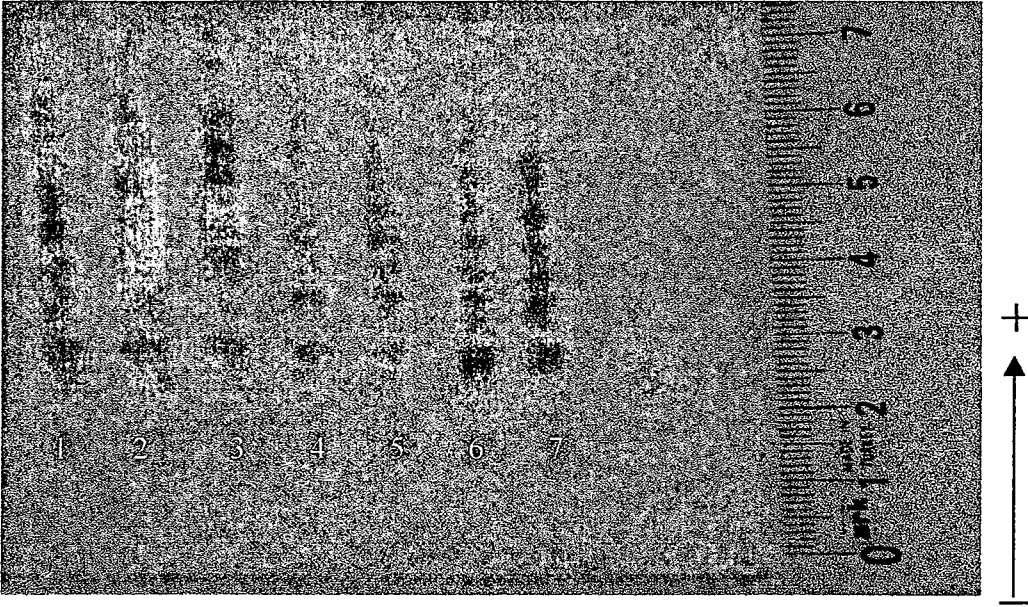


Şekil 4.1. ADH enziminin zimogramı. 1,2,3,4,5) subsp. *pogonocarpum*; 6,7) subsp. *haradjani*



Şekil 4.2. ADH enziminin zimogramı. 1,2,3,4) subsp. *pogonocarpum*; 5,6) subsp. *haradjani*

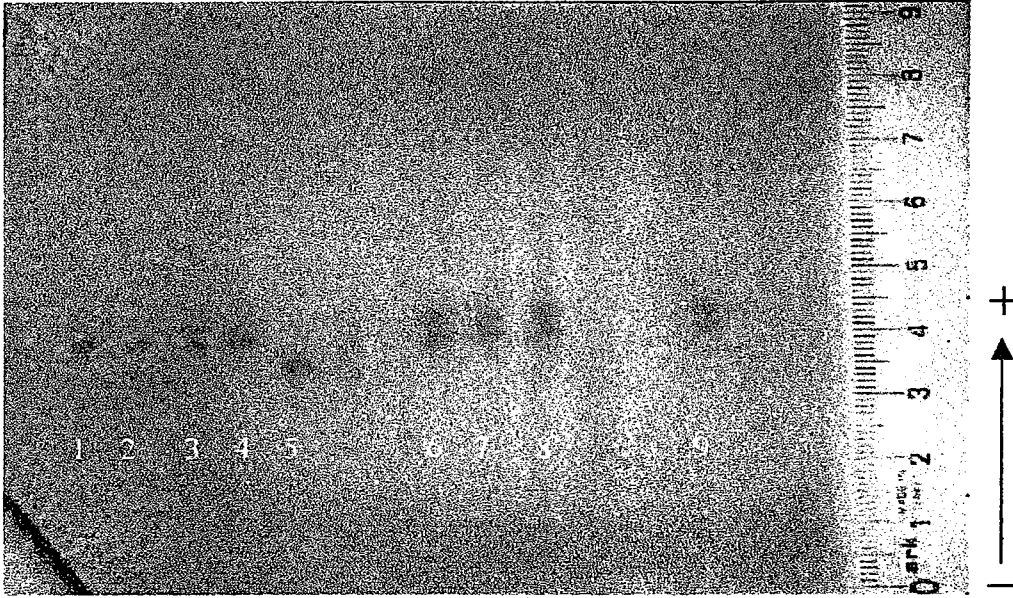




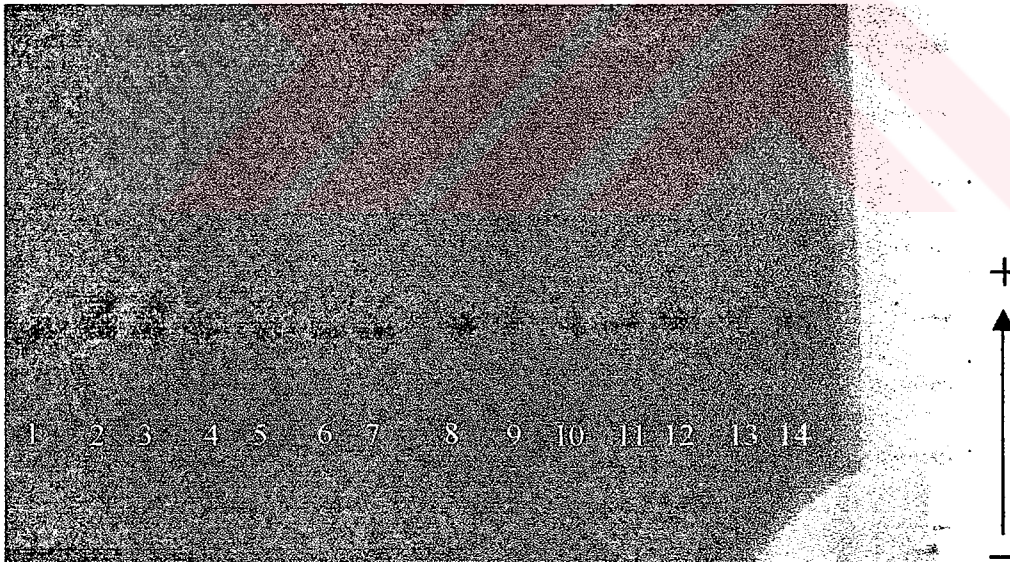
Şekil 4.3. MDH enziminin zimogramı. 1,2,3) subsp. *haradjani*; 4,5,6,7) subsp. *pogonocarpum*



Şekil 4.4. MDH enziminin zimogramı. 1,2,3) subsp. *pogonocarpum*; 4,5,6,7) subsp. *haradjani*



Şekil 4.5. PGM enziminin zimogramı. 1,2,3,4,5) subsp. *pogonocarpum*; 6,7,8,9) subsp. *haradjani*



Şekil 4.6. PGM enziminin zimogramı. 1,2,3,4,5,6,7) subsp. *haradjani*; 8,9,10,11,12,13,14) subsp. *pogonocarpum*

#### 4.2. Allel Frekansları ve Genetik Çeşitlilik

*H. pogonocarpum*'da incelenen 3 enzim sisteminde toplam 4 lokus belirlendi. Bu 4 lokusta toplam 9 allel gözlemlendi. Gözlenen 9 allelin frekansları Çizelge 4.1'de verildi. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi 4 lokustan sadece biri (MDH-2) her iki alttürde monomorfik olarak bulundu. Diğer tüm lokuslar (ADH, MDH-1, PGM-2) ise polimorfik olarak gözlemlendi. Çalışmada en düşük 0.148 ile en yüksek 0.852 arasında değişen allel frekansı değerleri gözlemlendi.

Çizelge 4.1. Çalışılan *Hedysarum pogonocarpum* alttürlerinde, 4 lokusta, gözlenen allel frekansları

LOKUS/ALLEL	TAKSON	
	subsp. <i>pogonocarpum</i>	subsp. <i>haradjani</i>
ADH *N=	33	16
100	0.333	0.344
75	0.667	0.656
MDH-1 N=	58	33
120	0.000	0.606
100	0.595	0.394
80	0.405	0.000
MDH-2 N=	58	33
100	1.000	1.000
PGM-2 N=	64	53
110	0.000	0.179
100	0.852	0.821
85	0.148	0.000

\*N: Analiz edilen örnek sayısı

Tüm lokuslar göz önüne alındığında, her iki alttür arasında ADH ve MDH-2 lokuslarındaki allel frekansları bakımından belirgin bir farklılık gözlenmedi. Oysa MDH-1 ve PGM-2 lokuslarında iki alttür arasında allel farklılıkları belirlendi. Allel frekansı 0.606 olan Mdh1-120 ile allel frekansı 0.179 olan Pgm2-110 alleli sadece subsp. *haradjani*'de gözlemlendi. Aynı şekilde allel frekansı 0.405 olan Mdh1-80 ile allel frekansı 0.148 olan Pgm2-85 alleli sadece subsp. *pogonocarpum*'da gözlemlendi. Böylece alttürler arasında allel farklılıkları olduğu belirlenmiştir. Bu şekildeki bir allel farklılığı *Leucaena leucocephala*'nın (*Fabaceae*) iki alttürü subsp. *leucocephala* ile subsp. *glabrata* arasında bulunmuştur. Bu iki alttür, subsp. *leucocephala*'da AAT (Aspartat aminotransferaz) izoenzimine ait C ve D allellerinin bulunmasıyla birbirlerinden farklılaşmışlardır (HARRIS ve ark., 1994).

*H. pogonocarpum*'un iki alttüründe her bir lokusu çalışmak için kullanılan ortalama örnek sayısı (analiz edilen çimlendirilmiş tohum sayısı) Çizelge 4.2'de verildi. Ayrıca populasyonlar içindeki genetik çeşitliliğin belirlenmesi için her bir alttürdeki polimorfizm oranı, her bir lokus için ortalama allel sayısı ve ortalama heterozigotluklar hesaplandı (Bkz. Çizelge 4.2). İncelenen 4 lokustan 3'ünün her iki alttürde de polimorfik olduğu görüldü. Bir lokusta en yaygın allelin frekansı 0.95 veya daha düşük olduğu durumlarda (% 95 kriterine göre) polimorfizm oranı her iki taksonda %75 olarak ölçüldü. Polimorfizm oranı bakımından iki alttür de oldukça yüksek değerlere sahipti. Her bir lokus için ortalama allel sayısı da her iki alttür için 1.8 olarak aynı değerde bulundu. Genetik çeşitliliğin bir diğer parametresi olarak her bir alttür için heterozigotluk değerleri belirlendi. Populasyonların doğrudan olarak genotip frekanslarından hesaplanan heterozigotlukları subsp. *haradjani*'de subsp. *pogonocarpum*'a göre biraz daha yüksek (0.365) bulunmasına rağmen, bu değer subsp. *haradjani*'de Hardy-Weinberg koşullarında beklenen heterozigotluk oranından düşük bir değerdi.

Çizelge 4.2. Çalışılan *Hedysarum pogonocarpum* alttürlerinde, 4 lokusta, populasyon içi çeşitliliğe ait parametreler

Takson	Her bir lokus için ortalama örnek sayısı	Her bir lokustaki ortalama allel sayısı	Polimorfik lokusların yüzdesi*	Ortalama heterozigotluk	
				Hg	Hb**
subsp. <i>pogonocarpum</i>	53.3 (±6.9)	1.8 (±0.3)	75.0	0.352 (±0.176)	0.298 (±0.112)
subsp. <i>haradjani</i>	33.8 (±7.6)	1.8 (±0.3)	75.0	0.365 (±0.162)	0.312 (±0.112)

\* Eğer en yaygın allelin frekansı 0.95'i geçmedi ise, o lokus polimorfik lokus olarak kabul edildi.

\*\* Tarafsız tahminler (NEI, 1978)

±: Standart hata

Hg: Gözlenen heterozigotluk (Gözlenen heterozigot bireyler/Toplam bireyler)

Hb: Hardy-Weinberg (H-W) şartlarında beklenen heterozigotluk

Bitki türleri genel olarak populasyonları içindeki allozim çeşitliliğini yüksek oranlarda korurlar ve genetik çeşitlilik düzeyi bakımından omurgalı ve omurgasız hayvanlar arasında yer alırlar (NEVO, 1978). Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, diğer canlı grupları ile karşılaştırıldığında açık tohumlu bitkiler (Gymnospermae) genel olarak en yüksek düzeyde genetik çeşitlilik göstermektedirler. Monokotil bitki türleri ile yapılan çalışmalarda polimorfizm düzeyi ortalama % 39, heterozigotluk düzeyi, ortalama 0.16'dır. Dikotil bitki türleri ile yapılan çalışmalarda polimorfizm düzeyi ortalama % 31, heterozigotluk düzeyi ortalama 0.11'dir (HAMRICK ve ark., 1979). Genetik çeşitlilik düzeyi en düşük canlı grubu omurgalılar olup, omurgasız hayvanlardaki genetik çeşitlilik seviyesi monokotil ve dikotil bitkileri kapsayan kapalı tohumlu bitkilere (Angiospermae) yakındır (NEVO, 1978).

Çizelge 4.3. Değişik canlı gruplarının polimorfizm ve heterozigotluk düzeyleri hakkında bilgiler

Grup adı	Ortalama polimorfizm düzeyi	Ortalama allel sayısı	Ortalama heterozigotluk düzeyi	Kaynak
Açık tohumlular	% 67.0	2.12	0.270	HAMRICK ve ark., 1979
Dikotiledonlar	% 31.2	1.46	0.113	HAMRICK ve ark., 1979
Monokotiledonlar	% 39.7	2.11	0.165	HAMRICK ve ark., 1979
Omurgasızlar	% 39.7	-	0.112	NEVO, 1978
Omurgalılar	% 17.3	-	0.049	NEVO, 1978

Bu çalışmada subsp. *pogonocarpum* ve subsp. *haradjani* için elde edilen polimorfizm düzeyi (polimorfik lokusların oranı) diğer dikotil bitkilere göre oldukça yüksektir (Bkz. Çizelge 4.3). Elde edilen değer (% 75), genel olarak beklenen yaklaşık değerden (% 31) çok daha fazla olması, çalışılan lokus sayısının az olmasından ileri gelebilir. Çalışılan lokus sayısı az olduğunda, polimorfik lokusların oranı örnekleme hatasından dolayı populasyon içindeki genetik çeşitliliği doğru bir şekilde gösteremez hale gelebilir. Ayrıca çalışılan örnek sayısının az olması da bu parametrenin kullanılabilirliğini azaltır (NEI, 1987). Bundan başka seçilen enzim sistemine bağlı olarak da polimorfizm oranı değişebilir. Örneğin, çalışmadaki 4 lokustan 3'ünün polimorfik olması sebebiyle % 75 olarak ortaya çıkan polimorfizm oranı, başka 4 enzim sistemi daha çalışılırdı ve varsayılan 4 lokustan 3'ü monomorfik olsaydı % 50 olacaktı. Bu nedenle genetik çeşitliliğin belirlenmesinde ortalama allel sayısı ve Hardy-Weinberg şartlarında tahmin edilen heterozigotluk düzeyi polimorfizm oranından daha iyi bir parametredir (NEVO, 1978). Heterozigotluk ortalaması (ya da gen çeşitliliği) polimorfizmin tanımlanmasındaki keyfiyete bağlı değildir; gen frekansına dayanarak şüphesiz bir şekilde doğrudan belirlenebilir (NEI, 1987). Nitekim, bu çalışmada ortalama allel sayısı her iki alttür için 1.8, heterozigotluk ortalaması subsp. *pogonocarpum* için 0.352, subsp. *haradjani* için 0.365 olarak ölçüldü. PASQUET (1993) tarafından yapılan *V. unguiculata* 'nın 7 alttürünü kapsayan izoenzimatik

çalışmada, polimorfik lokusların oranı bizim çalışmada elde edilen değere yakın olarak (% 78) bulunmuştur. Fakat bu çalışmada ADH, MDH ve PGM'de dahil olmak üzere 22 enzim sistemi çalışılmış ve varsayılan 37 lokustan 29'u polimorfik olarak bulunmuştur. Ayrıca heterozigotluk ortalaması da 0.307 olarak ölçülmüştür ki yine bu değer genel olarak dikotil bitkilerde gözlenen ortalama düzeyden yüksek fakat bizim çalışmadakine yakın bir değerdir. CHAMBERLAIN ve ark. (1996)'nın odunsu bir *Fabaceae* türü olan *Leucaena salvadorensis*'in birkaç alttürüyle yaptıkları genetik çeşitlilik çalışmalarında, *Leucaena salvadorensis* subsp. *shannonii*'de bizim çalışmada elde edilen değere yakın heterozigotluk ortalaması 0.335 ve polimorfik lokusların oranı 71.4 olarak bulunmuştur. Ayrıca BROWN ve ark. (1990)'da yaptıkları çalışmada, diploid ve çok yıllık bir *Fabaceae* türü olan *Glycine canescens*'de de polimorfik lokusların oranını % 81, heterozigotluk ortalamasını 0.31 olarak oldukça yüksek miktarlarda belirlemişlerdir.

#### 4.3. Genetik Yapının Belirlenmesi

Populasyonların polimorfik lokuslar bakımından Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadıklarını belirleyebilmek için  $\chi^2$  (ki kare) testi yapıldı. Elde edilen sonuçlar subsp. *pogonocarpum* için Çizelge 4.4'de, subsp. *haradjani* için Çizelge 4.5'de gösterildi. Ayrıca populasyonların dengeden sapma gösteren lokuslarında dengenin hangi yönde bozulduğu fiksasyon indeksi kullanılarak belirlendi (Bkz. Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7).

Çizelge 4.4. *H. pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum*'un polimorfik lokuslarında Hardy-Weinberg dengesinden sapmaları gösteren ki kare ( $\chi^2$ ) testi

Lokus	Genotipik sınıf	Gözlenen frekans	Beklenen frekans	$\chi^2$	DF	P
ADH	100-100	4	3.554	0.123	1	0.726
	100-75	14	14.892			
	75-75	15	14.554			
MDH-1	100-100	11	20.400	26.265	1	0.000
	100-80	47	28.200			
	80-80	0	9.400			
PGM-2	100-100	49	46.346	7.109	1	0.008
	100-85	11	16.307			
	85-85	4	1.346			

Çizelge 4.5. *H. pogonocarpum* subsp. *haradjani*'nin polimorfik lokuslarında Hardy-Weinberg dengesinden sapmaları gösteren ki kare ( $\chi^2$ ) testi

Lokus	Genotipik sınıf	Gözlenen frekans	Beklenen frekans	$\chi^2$	DF	P
ADH	100-100	3	1.774	1.875	1	0.171
	100-75	5	7.452			
	75-75	8	6.774			
MDH-1	120-120	7	12.000	13.333	1	0.000
	120-100	26	16.000			
	100-100	0	5.000			
PGM-2	110-110	0	1.629	2.377	1	0.123
	110-100	19	15.743			
	100-100	34	35.629			

DF: Serbestlik derecesi (Degrees of freedom)

P: Olasılık (Propability)



Ki kare testine göre MDH-1 lokusu her iki alttürde Hardy-Weinberg dengesinden istatistiki bakımdan önemli derecede ( $P < 0.001$ ) sapma gösterdi. ADH lokusu ise her iki alttürde Hardy-Weinberg dengesinde bulundu. PGM-2 lokusu için ise iki populasyon birbirinden farklı ki kare değeri verdi. Elde edilen verilere göre; subsp. *haradjani*'yi oluşturan populasyon Hardy-Weinberg dengesindeyken subsp. *pogonocarpum* Hardy-Weinberg dengesinden önemli derecede ( $P < 0.01$ ) sapma gösterdi.

*H. pogonocarpum*'un iki alttürünün genetik yapısını belirleyebilmek ve alttürleri birbirleriyle karşılaştırabilmek için Wright'ın F istatistiği (Fiksasyon indeksi) kullanıldı. Böylece, populasyonların dengeden sapma gösteren lokuslarında dengenin hangi yönde bozulduğu gösterildi. Ayrıca, populasyonların polimorfik lokuslarında gözlenen heterozigotluğun, Hardy-Weinberg şartlarında beklenen heterozigotluğa göre eksiklik ya da aşırılık miktarı belirlendi. Subsp. *pogonocarpum* populasyonu için heterozigotluktaki eksiklik ya da aşırılıkları gösteren fiksasyon indeksi Çizelge 4.6'da, subsp. *haradjani* için ise Çizelge 4.7'de sunuldu.

Çizelge 4.6. *H. pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum*'da heterozigotluktaki eksiklik ya da aşırılıkları gösteren Fiksasyon İndeksi

Lokus	Heterozigotlar		Fiksasyon İndeksi (F)	$\chi^2$	P
	Gözlenen	Beklenen			
ADH	14	14.892	0.045	0.12	0.7267
MDH-1	47	28.200	- 0.681	26.23	0.0000
PGM-2	11	16.307	0.320	6.89	0.0087

Çizelge 4.7. *H. pogonocarpum* subsp. *haradjani*'de heterozigotluktaki eksiklik ya da aşırılıkları gösteren Fiksasyon İndeksi

Lokus	Heterozigotlar		Fiksasyon İndeksi (F)	$\chi^2$	P
	Gözlenen	Beklenen			
ADH	5	7.452	0.307	1.85	0.1743
MDH-1	26	16.000	- 0.650	13.29	0.0003
PGM-2	19	15.743	- 0.218	2.31	0.1284

Çalışılan lokuslarda F-istatistiği değerleri  $-1$  ve  $+1$  arasında değişti. Negatif değerler Hardy-Weinberg oranlarına kıyasla heterozigotlukta aşırılık, pozitif değerler ise Hardy-Weinberg oranlarına kıyasla heterozigotlukta eksiklik anlamına gelir.  $F=0$  olması durumu ise popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu gösterir (JAIN ve WORKMAN, 1967; ALONSO ve REGUERA, 1989).

Beklenen heterozigot bireylere oranla, gözlenen heterozigot bireylerdeki eksiklik veya aşırılıkları ölçen fiksasyon indeksine göre, her iki popülasyon ADH lokusu bakımından beklenen ve gözlenen heterozigot bireyler arasında uygunluk gösterdi. Yani ADH lokusunda heterozigotlukta aşırılık veya eksiklik yoktu ve popülasyonlar Hardy-Weinberg oranlarından sapma göstermedi. MDH-1 lokusu için ise her iki popülasyon heterozigotlukta istatistiki açıdan önemli ( $P<0.001$ ) miktarda aşırılık gösterdi. MDH-1 lokusu bakımından fiksasyon indeksi  $-0.681$  olan subsp. *pogonocarpum* ve fiksasyon indeksi  $-0.650$  subsp. *haradjani* birbirine yakın oranlarda heterozigot bireyler bakımından aşırılık gösterdi. Oysa PGM-2 lokusundaki heterozigotluk için alttürler arasında farklılık gözlemlendi. Fiksasyon indeksi  $0.320$  olan subsp. *pogonocarpum*'da istatistiki açıdan önemli ( $P<0.01$ ) miktarda heterozigotlukta eksiklik (bundan dolayı homozigotlukta aşırılık) gözlemlendi. Fiksasyon indeksi  $-0.218$  olan subsp. *haradjani*'de heterozigotlukta aşırılık (bundan dolayı homozigotlukta eksiklik) gözlemlendi, fakat bu popülasyon için heterozigotlukta aşırılık istatistiki açıdan önemli bulunmadı.

Her iki alttür birer altpopülasyon olarak düşünüldüğünde, *H. pogonocarpum* popülasyonunda, 3 lokusta, Wright'ın F-istatistiği değerleri Çizelge 4.8'de gösterildi.

*H. pogonocarpum*'da,  $F_{IS}$  en düşük MDH-1 lokusunda  $-0.6699$  ile en yüksek ADH lokusunda  $0.1318$  değerini aldı. Tüm lokuslar göz önüne alındığında  $F_{IS}$  ortalama  $-0.2067$  idi.  $F_{ST}$  en düşük ADH lokusunda  $0.0001$  ile en yüksek MDH-1 lokusunda  $0.2158$  değerlerini aldı. Bütün lokuslar göz önüne alındığında  $F_{ST}$  ortalama  $0.1085$  idi.  $F_{IT}$  en düşük MDH-1 lokusunda  $-0.3096$  ile en yüksek ADH lokusunda  $0.1319$  değerlerini aldı ve tüm lokuslar göz önüne alındığında ortalama  $-0.0758$  olarak bulundu.

Çizelge 4.8. *H. pogonocarpum* alttürlerinin, 3 lokusta, Wright'ın F-istatistiği değerleri

LOKUS	F <sub>IS</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IT</sub>
ADH	0.1318	0.0001	0.1319
MDH-1	- 0.6699	0.2158	- 0.3096
PGM-2	0.0558	0.0479	0.1010
Ortalama	- 0.2067	0.1085	- 0.0758

Çalışılan bütün lokuslar göz önüne alındığında bulunan - 0.2067 ortalama F<sub>IS</sub> değeri populasyonlarda ortalama olarak heterozigotlukta % 20'lik bir aşırılığı (beklenen oranlardan fazlalığı) göstermektedir. PGM-2 lokusundaki F<sub>IS</sub> değerinin (0.0558) sıfıra çok yakın bulunması, Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu, bununla beraber bu lokusta çok düşük polimorfizm olduğunu gösterir. F<sub>IT</sub> ise ortalama - 0.0758 olarak bulundu. Bu değer ise populasyonlar bir bütün olarak göz önüne alındığında genelde *H. pogonocarpum*'da heterozigotlukta % 7.5'lik bir aşırılığı göstermektedir.

F<sub>IS</sub> değerinin sıfırdan negatif yönde sapması (heterozigotların aşırılığı) birbirine benzemeyen genotipler arasında eşleşmenin tercih edilmesi (negative assortative mating) ve heterozigotların yararına olan bir seçim sonucu oluşabilir. F değerinin sıfırdan pozitif yönde sapması (homozigot aşırılığı) ise, Wahlund etkisi (Hardy-Weinberg dengesindeki iki altpopulasyonun birleştiği yerdeki karışık populasyon diğer iki altpopulasyona göre çok daha düşük homozigotluk ortalaması gösterir yani altpopulasyonlar, tüm populasyona kıyasla daha fazla heterozigot eksikliği gösterir), birbirine benzeyen genotipler arasında eşleşmenin tercih edilmesi (positive assortative mating), homozigotlar yararına seçim gibi faktörler neden olabilir (BROWN, 1979; EL-KASSABY ve ark., 1987; FADY ve CONKLE, 1993).

Bununla beraber tesadüfi olmayan eşleşmeler ve Wahlund etkisi tüm genom üzerine etkilidir ve tüm lokusları aynı yolla etkilerler. Bu yüzden, bütün lokuslarda ya heterozigot eksikliğin ya da heterozigot aşırılığının yaklaşık aynı oranda olması beklenir (ALONSO ve REGUERA, 1989). Fakat bu çalışmada her iki alttürde de ADH lokusu bakımından Hardy-Weinberg dengesinden sapmalar gözlenmezken, MDH-1 lokusu için heterozigot aşırılığı belirlendi. PGM-2 lokusu bakımından ise, subsp. *pogonocarpum*'da önemli miktarda heterozigot aşırılığı, subsp. *haradjani*'de istatistiki bakımdan önemsiz de olsa bir miktar heterozigot eksikliği bulundu (Bkz. Çizelge 4.6 ve 4.7). Bu durum, tesadüfi olmayan eşleşmelerin ve Wahlund etkisinin, fiksasyon indeksi

( $F_{IS}$ ) değerlerini açıklamasını olanaksız yapar. Böyle bir durumda, sadece homozigotlar yararına seçilim (negative heterosis) homozigot aşırılığını; benzer şekilde, heterozigotlar yararına seçilim (heterosis) de heterozigot aşırılığını açıklayabilir (BROWN, 1979). Eğer doğal seleksiyon ile, populasyonlarda homozigotlar yararına bir seçilim yapılıyorsa heterozigot eksikliğinin, heterozigotlar yararına bir seçilim yapılıyorsa heterozigot aşırılığının ortaya çıkması mümkün olur.

Bundan başka, 1985'te SCHAEFFER ve ark. başka bir açıklama ileri sürmüştür: Eğer doğal seleksiyon heterojen bir çevrede etkiliyse, şiddetli bir heterozigot eksikliği meydana gelebilir. Böyle bir etki, Wahlund etkisinde olduğu gibi bir ya da daha fazla lokus üzerine etkilidir fakat genomun tamamında etkili değildir (ALONSO ve REGUERA, 1989). Bu durumda, subsp. *haradjani*, subsp. *pogonocarpum*'a göre biraz daha heterojen bir çevrede bulunuyor olabilir ve seleksiyon baskısı subsp. *haradjani*'deki özellikle PGM-2 lokusu üzerinde etkili olmuş olabilir. Böylece, subsp. *haradjani*'de PGM-2 lokusunda gözlenen heterozigot eksikliği homozigotlar yararına seçilim ve/veya heterojen bir çevrede etkili seleksiyon ile açıklanabilir. Fakat subsp. *haradjani*'nin bulunduğu populasyonun subsp. *pogonocarpum*'a göre çok daha fazla heterojen bir çevrede olmaması gerekir. Çünkü, her iki alttür MDH-1 lokusu bakımından istatistiki açıdan önemli miktarda heterozigot aşırılığı açığa çıkarırken, subsp. *haradjani*'de gözlenen homozigot aşırılığı istatistiki açıdan önemli değildi.

Aynı materyaldeki farklı lokuslarda çeşitlilikle ilgili birbirinin zıddı olan modellerin bulunması lokusların bazılarında seleksiyon baskısının daha etkili olmasından kaynaklanır (CHRISTIANSEN ve FRYDENBERG, 1974; BROWN, 1979'dan).

Birçok çalışma heterozigot aşırılığının çevreye göre değiştiğini ortaya koymuştur. Genel olarak "ekstrem" (kserik, marjinal) çevrelerde heterozigot aşırılığı yüksek oranlardadır (BROWN, 1979).

$F_{ST}$  değerinin gözlenen ortalama değeri (0.1085) incelenen populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın orta seviyelerde olduğunu gösterir. Bu değer türdeki genetik çeşitliliğin % 10'unun populasyonlar arası genetik farklılıklardan kaynaklandığını ifade eder. Türdeki toplam genetik çeşitliliğin geri kalan % 90'lık kısmı populasyon içi çeşitlilikten gelmektedir. Elde edilen  $F_{ST}$  değeri incelenen lokuslar bakımından *H. pogonocarpum*'un populasyonlarının coğrafik olarak güçlü bir şekilde

farklılaşmadığını gösterir. Bu sonuçlar açıkça populasyonlar arasında bir miktar genetik benzerliğin olduğunu gösterir.

Genel olarak populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma derecesi dikotil bitkilerde monokotil ve açık tohumlu bitkilere göre daha fazladır. Ayrıca, populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma; eşleşme sistemi, tozlaşma şekli, yaşam formu ve tohum dağılımı gibi türün diğer yaşamsal özelliklerine de oldukça bağlıdır. Bireyler arasında polen hareketini arttıran eşleşme sistemleri, tür içindeki farklılaşmayı azaltır ve allellerin populasyonlar arasında geniş bir şekilde paylaşılmasına izin verir. Bu nedenle, dışarıdan döllen (outcrossing), rüzgarla tozlaşma yapan koniferlerde populasyonlar arasındaki genetik farklılık derecesinin % 10'dan daha aşağı olması tipiktir. Hayvanlar aracılığı ile tozlaşma yapan dışarıdan dölenen türlerin populasyonları arasında ise daha orta seviyelerde (0.197) farklılaşma gözlenir. En yüksek  $F_{ST}$  değerine (0.510) kendi kendini döleyen türlerde rastlanır (LOVELESS ve HAMRICK, 1984; HAMRICK ve GODT 1990). *H. pogonocarpum* dışarıdan dölenen entomofil bir dikotil bitkidir. Bu çalışmada elde edilen  $F_{ST}$  değeri HAMRICK ve GODT (1990) tarafından bildirilen değere yakın olmakla beraber biraz daha küçüktür. Bunun sebebi, türün endemik olmasından ileri gelebilir. Çünkü, endemik türlerin bölgesel dağılımı populasyonlar arasındaki gen akışını arttırarak, farklılaşmayı azaltabilir (HAMRICK ve GODT, 1990) ya da geniş populasyonlara sahip olan endemik türler, genetik sürüklenmenin etkisine karşı gelerek populasyon farklılaşmasını azaltabilirler (LOVELESS ve HAMRICK, 1984). Ayrıca tohumların dağılım mekanizması da populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma derecesini etkileyen faktörlerden biridir. *H. pogonocarpum*'da tohum dağılımı, otlatma sırasında hayvanların tüylerine yapışan meyvelerin uzak mesafelere taşınması ve yerçekimine bağlı olarak daha yakın mesafelere taşınması şeklinde olur. Özellikle otlatma mevsiminde tohum hareketinin devamlı gerçekleşmesi populasyonlar arasındaki farklılık seviyesini azaltabilir. Bunun yanında yerçekimine bağlı tohum dağılımı ise yere düşen tohumların ana populasyonun çevresinde çimlenip fide oluşturabilmesi sebebiyle populasyonlar arasındaki farklılaşma derecesini arttırabilir. Bu şekilde, alttürler arasındaki genetik farklılaşma derecesinin orta seviyelerde olması açıklanabilir. Bundan başka, çalışılan lokus sayısının az olması da genetik farklılaşmayı düşüren etkenlerden biri olabilir. Bu yüzden, populasyonlar arasında belirlenen % 10'luk genetik farklılaşma derecesi, her ne kadar düşük bir değer gibi görünse de,

populasyonların coğrafik olarak izole edilmiş olması ve her bir populasyonun farklı mikrohabitatlara uyumu, onları *H. pogonocarpum*'un farklı alttürleri olarak kabul etmemizi sağlayabilir.

$F_{ST}$  değerinin büyüklüğü ayrıca bir lokusun populasyonlar arasındaki farklılıklara yaptığı katkı derecesinin bir göstergesidir. Elde edilen sonuçlara göre, polimorfik olan bazı lokuslar genetik çeşitliliğe oldukça fazla katkıda bulunurken monomorfik olan MDH-2 ise hiç katkıda bulunmamaktadır.  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  ve  $F_{ST}$ 'nin çalışılan tüm lokuslarda farklı değerlerde olması, her bir populasyondaki her bir lokusun çevresel faktörlerdeki değişimlerden bağımsız olarak etkilendiğini ifade eder. Çizelge 4.8'de de populasyonlar arasındaki farklılaşmaya en büyük katkı sağlayan lokusun MDH-1 ( $F_{ST}=0.2158$ ) olduğu görülmektedir.

Populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmayı etkileyen faktörlerden birisi gen akımıdır.  $F_{ST}$  (veya  $G_{ST}$ ) değeri kullanılarak populasyonlar arasındaki gen akımının miktarını (M) belirlemek mümkündür. İzoenzim lokusları gen akımı çalışmaları için seçkin özelliklerdir. Çünkü izoenzimler, tohumu dağıtan ajanların davranışlarından ya da polinatör aktivitelerinden etkilenmezler (HAMRICK, 1990). Çalışmada elde edilen verilere göre,  $M= 2.05$ 'tir. Bu değer *H. pogonocarpum*'un her iki alttürü arasındaki gen akımı oranının her bir kuşakta yaklaşık 2 olduğunu gösterir. Tohumlu bitkilerde populasyonlar arasındaki gen akımı hem polen hem de tohum aracılığı ile olabilir. HAMRICK ve GRISWOLD 1988'de çeşitli bitki gruplarındaki gen akımı miktarını hesaplamışlardır. Bu çalışma sonucunda, gen akımı miktarını kendi kendini döleyen türlerde 0.265, dışarıdan döllen, tohum ve polenlerini rüzgar veya hayvanlar aracılığı ile uzak mesafelere yayan türlerde ise 4.750 olarak bulmuşlardır (HAMRICK, 1990). *H. pogonocarpum* da dışarıdan dölenen ve polenlerini böcekler aracılığı ile nispeten uzak mesafelere yayan bir türdür. Populasyonlar ya da altpopulasyonlar arasındaki gen hareketi, genetik çeşitliliğin dağılımı üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Gen hareketi kısıtlı türlerin, polen ya da tohumları geniş ölçüde yayılan türlere göre daha fazla genetik farklılaşma göstermesi gerekir. Böceklerle tozlaşma polen hareketini rüzgarla tozlaşmaya göre daha fazla kısıtlayacağından çalışmada elde edilen M değeri beklenen bir değerdir. Fakat bu değer populasyonlar arasında çok önemli bir farklılaşma olduğunu gösterecek kadar küçük değildir.

#### 4.4. Genetik Benzerlik ve Genetik Mesafe

NEI'nin (1972) genetik benzerlik (I) ve genetik mesafesi (D) ile daha az sayıdaki örnekler için hazırlanmış olan NEI'nin (1978) tarafsız genetik benzerlik (I) ve genetik mesafe (D) katsayısı kullanılarak populasyonlar arasındaki genetik farklılaşmanın düzeyi belirlendi. Çizelge 4.1'deki allel frekansları, NEI'nin benzerlik ve tarafsız genetik mesafe metodu ile populasyonlar arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkların ölçümü için kullanıldı. 4 lokusa dayanarak elde edilen I ve D değerleri NEI (1972) için Çizelge 4.9'da, NEI (1978) için Çizelge 4.10'da gösterildi.

Çizelge 4.9. *H. pogonocarpum* alttürleri arasındaki genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri (NEI, 1972). (sol alt diagonal: genetik benzerlik (I), sağ üst diagonal: genetik mesafe (D) değerleri)

TAKSON	subsp. <i>pogonocarpum</i>	subsp. <i>haradjani</i>
subsp. <i>pogonocarpum</i>	*****	0.119
subsp. <i>haradjani</i>	0.888	*****

Çizelge 4.10. *H. pogonocarpum* alttürleri arasındaki tarafsız genetik benzerlik ve genetik mesafe değerleri (NEI, 1978). (sol alt diagonal: genetik benzerlik (I), sağ üst diagonal: genetik mesafe (D) değerleri)

TAKSON	subsp. <i>pogonocarpum</i>	subsp. <i>haradjani</i>
subsp. <i>pogonocarpum</i>	*****	0.112
subsp. <i>haradjani</i>	0.894	*****

Allelik frekans genellikle bitki populasyonları, türüstü taksonlar, türler vs. arasındaki farklılıkları ya da benzerlikleri ölçmek için kullanılmaktadır. NEI'nin (1972) genetik benzerlik istatistiği populasyonlar arasındaki benzerliğin bir ölçüsü olmaktadır. Herhangi iki populasyon için bu değer 0.0'dan 1.0'a kadar sıralanmaktadır;

populasyonlar arasında ortak alleller yoksa 0.0 değerini verir, oysa her iki populasyonda aynı alleller aynı frekansta meydana gelirse bu değer 1.0 olur. Genel olarak aynı taksona ait bitki populasyonları allozimik olarak çok benzerdir. Bu populasyonlar için genetik benzerlik miktarı çoğunlukla 0.90'nın üzerindedir. GOTTLIEB 1977'de aynı cinse ait populasyonların aynı türün populasyonlarına göre allozimik olarak birbirlerine daha az benzer olduklarını bildirmiştir. Dışarıdan döllenmiş bitkiler için herhangi bir populasyonda tespit edilen allellerin frekansı ve sayısı çoğunlukla aynı taksonun diğer populasyonlarına çok benzerdir. Kendi kendini döleyen türlerde ise genetik farklılık tipik olarak türlerin populasyonları içindeki çeşitlilikten ziyade populasyonları arasında bulunur (GOTTLIEB, 1981; CRAWFORD, 1990'dan). CRAWFORD'un 1983'te yaptığı birkaç çalışmada bir türün coğrafik ırkları arasındaki allozimik benzerlikler ölçülmüştür. Coğrafik ırklar çoğu zaman taksonomik olarak alttür ya da varyete olarak tanımlanırlar. Genel olarak türüstü taksonların populasyonları, aynı taksonun populasyonlarında olduğu kadar elektroforetik olarak benzerdir. Bununla beraber belirli örneklerde türüstü taksonların genetik benzerlikleri aynı cinse ait türlerde görülen genetik benzerlikten daha düşüktür. Farklı çalışmalarda coğrafik ırklar arasında belirlenen allozim benzerliklerin farklı olması şaşırtıcı değildir. Çünkü, biyolojik koşulların farklı durumlarda tamamen farklı olması şüphe götürmez (CRAWFORD, 1990).

Koniferlerin alttürleri tipik olarak tek bir taksonun populasyonları arasında bulunan yüksek benzerliğin aynısı kadar genetik benzerlik açığa çıkarırlar. HAMRICK 1981'e göre, alttürler arasında genetik farklılığın olmaması; dışarıdan döllenme, tohum ve polenlerin çok uzaklara dağılması ve alttürlerin yeni yayılmış olması sebebiyledir (CRAWFORD, 1990).

Tamamen ya da büyük ölçüde allopatrik olan türüstü taksonlar için 1979'da WHALEN, 1981'de CRAWFORD ve BAYER; 1983'te McNEILL ve JAIN tarafından daha düşük miktarlarda genetik benzerlikler gösteren çalışmalar da bildirilmiştir. Bu çalışmalarda genetik farklılığın yüksek değeri homojenleştirici bir etki olan gen akımının yokluğundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bu durum populasyonlar arasındaki gen akımının kesilmesinden sonra daha fazla zaman geçmesinin bir yansıması da olabilir. Türüstü taksonlardaki morfolojik özelliklerdeki farklılıklar çoğu kez izoenzimlerin gen lokuslarında farklılık meydana getirmeksizin gelişebilirler. Bu durum



en iyi ıslah edilmiş bitkiler ile onların gen atalarında (progenitörlerinde) gözlenir. Türüstü seviyede farklı olarak tanımlanan bu taksonlarda uygun morfolojik değişiklikler vardır. Fakat allozimlerinde çok az ya da hiç farklılaşma meydana gelmeyebilir. İnsanlar tarafından kültürleşmeyle birlikte bazı özellikler için seleksiyon baskısı öyle hızlı fenotipik değişiklikler meydana getirir ki özgül enzimleri kodlayan genlerde mutasyon meydana getirecek zaman yoktur (CARWFORD, 1990).

#### 4.5. Türleşme Modeli

Bitki sistematigindeki elektroforetik kanıtların en etkili yönlerinden biri türleşme modelini gösterebilme yeteneğidir (GOTTLIEB, 1981; CRAWFORD, 1985'den). Türleşmenin yönü belirlenirken hem populasyonlar arasındaki genetik farklılaşma miktarı hem de populasyonların genetik yapısı bir ölçüm haline getirilmelidir (TEMPLETON, 1980).

Bitkilerin türleşme sürecinde en azından şu özellikler olmalıdır (CRAWFORD, 1985).

- 1) Genellikle morfolojik olarak bazı özellik ya da özelliklerde farklılık olmalıdır. Böyle bitkiler kolaylıkla ayırt edilebilirler.
- 2) Bu ayırt edici özelliklerin korunması için yeterli üreme izolasyonu gelişmelidir. Farklılık ve izolasyonun her ikisi genetik ve/veya kromozomal bir temele sahip olmalıdır. GOTTLIEB (1984), bitkilerin taşıdığı karakterlerdeki morfolojik özelliklerin genetik temelini taksonlar arasında farklı olduğunu göstermiştir. Türleşmeyle ilgili herhangi bir çalışmada türler arasındaki genetik farklılığın miktarı ve türleri izole eden faktör(ler) göz önünde tutulmalıdır.

Türleşmenin coğrafik modeli populasyonların zamanla çeşitli özellikler bakımından derece derece ayrıldığını varsayar. 1981'de GRANT tarafından bildirildiğine göre, coğrafik türleşme yavaş aşamalı bir süreç görünümündedir. Bu modele göre, populasyonlar zamanla spatial (uzamsal, uzaysal) olarak ayrılırlar, sonunda üreme izolasyonunun gelişmesiyle türleşme süreci tamamlanır. Araştırmacıya göre, coğrafik ırkların (alttür ya da varyete) gelişmesi coğrafik türleşme sürecindeki bir aşamayı gösterir. Yapılan çalışmalar coğrafik ırklar arasındaki farklılığın aynı ırkın populasyonlarına göre çok ya da en azından biraz daha fazla olduğunu göstermiştir.

Bununla beraber farklı alttürlerde daha düşük genetik farklılaşma ortaya koyan çalışmalar da vardır (CRAWFORD, 1985).

LISTON (1992) tarafından *Astragalus*'un (*Fabaceae*) bazı taksonlarıyla yapılan izoenzimatik temele dayalı sistematik çalışmada, aynı türün farklı coğrafik ırkları arasında çok düşük genetik farklılaşma belirlenmiştir. Araştırmacı tarafından, *Astragalus rattanii* var. *rattanii*'nin populasyonları arasındaki genetik benzerlik miktarı (I) 0.997, *A. rattanii* var. *jepsonianus*'un populasyonları arasındaki I değeri ise 0.999 olarak bildirilmiştir. Her iki varyete arasındaki genetik benzerlik miktarı 0.995 olarak oldukça yüksek miktarda ölçülmüştür. Benzer şekilde *A. tener* var. *tener* ile *A. tener* var. *titi* taksonları arasındaki genetik benzerlik miktarı da 0.998'dir (NEI 1978'e göre). *Astragalus*'un coğrafik ırkları için bildirilen bu değerler *H. pogonocarpum*'un coğrafik ırkları arasında gözlenen genetik benzerlik miktarına göre (0.894) oldukça yüksektir.

WAIN 1982'de, *Helianthus debilis* (*Asteraceae*) türünün 3 alttüründeki izoenzimleri çalışmıştır. *Helianthus debilis*, *H. pogonocarpum*'da olduğu gibi diploid, otsu, dışarıdan döllen ve böceklerle tozlaşma yapan bir bitki türüdür. Araştırmacı, *H. debilis*'in alttürleri olan subsp. *vestitus* ve subsp. *tardiflorus*'un populasyonlarını karşılaştırdığında ortaya çıkan genetik benzerlik ortalamasının, 3 alttürün her birinin içindeki populasyonların karşılaştırılmasıyla ortaya çıkan genetik benzerlik ortalamasıyla aynı olduğunu göstermiştir (yaklaşık 0.99). Bunun aksine, subsp. *debilis*'in populasyonlarını subsp. *vestitus* ve subsp. *tardiflorus* ile karşılaştırıldığında benzerlik ortalamaları subsp. *debilis* ile subsp. *vestitus* arasında 0.886 ve subsp. *debilis* ile subsp. *tardiflorus* arasında 0.902 olarak bulmuştur. Araştırmacı subsp. *vestitus* ve subsp. *tardiflorus*'un ortak bir ata populasyondan son zamanlarda türediklerini ileri sürmüştür. Bunun aksine hem morfolojik hem de izoenzim bilgisi subsp. *debilis*'in çok uzun zamandır coğrafik olarak izole edilmiş olduğu hipotezini desteklemiştir. *Helianthus*'la ilgili çalışmalar populasyonlar arasındaki gen akımı kesildiğinde allozim farklılığı başlayacağını ve morfolojik ve diğer özelliklerin aşamalı olarak coğrafik ırkları meydana getireceğini ispatlamıştır. Buna göre, izoenzimleri kodlayan genlerde farklılık türleşme olmadan meydana gelebilir (CRAWFORD, 1985).

Coğrafik modele uygun olarak türleşmenin ilk aşamasındaki allopatrik populasyonları gösteren *Helianthus debilis*'in alttürleri arasındaki genetik mesafe miktarı WAIN (1983) tarafından çalışılmıştır. Araştırmacı tarafından *Helianthus*

*debilis*'in 5 alttürü arasındaki genetik mesafe (D) ortalama olarak 0.08 olarak bildirilmiştir. *Helianthus debilis*'in alttürleri arasındaki genetik mesafe değeri (0.08), *Hedysarum pogonocarpum* alttürleri arasındaki genetik mesafe miktarına (0.11) göre daha düşüktür. Bu nedenle subsp. *pogonocarpum* ve subsp. *haradjani*'nin *Helianthus debilis*'in alttürlerine göre birbirlerinden daha fazla farklılaştıkları düşünülebilir.

Bu çalışmada her biri ayrı bir alttürü göstermek üzere sadece iki populasyon çalışıldı. Bu yüzden her bir taksonun kendi populasyonları arasındaki genetik benzerlik ya da farklılıklar ölçülemedi. Bunun yanında iki taksonun populasyonları arasında gözlenen genetik benzerlik değeri (0.88), 1982'de WAIN tarafından *Helianthus debilis* subsp. *debilis* ile *Helianthus debilis* subsp. *vestitus* için bildirilen değere yakın ve *Helianthus debilis* subsp. *debilis* ile *Helianthus debilis* subsp. *tardiflorus* için bildirilen değerden daha düşüktür. Ayrıca *Hedysarum pogonocarpum*'un alttürleri arasında belirlenen genetik mesafe değeri (0.11) *Helianthus debilis*'in alttürleri arasında gözlenen genetik mesafe ortalamasından (0.08) daha yüksektir. Her ne kadar her bir taksona ait daha fazla sayıda populasyon ile çalışılarak daha kesin sonuçlar elde edilebilecek olsaydı da *Hedysarum pogonocarpum* subsp. *pogonocarpum* ile *Hedysarum pogonocarpum* subsp. *haradjani* arasında gözlenen genetik farklılık miktarı onları *H. pogonocarpum*'un alttürleri olarak kabul etmemizi sağlayabilir. Ayrıca, populasyonların coğrafik olarak ayrılmış olması ve elde edilen genetik benzerlik miktarının (0.88), tek bir türün populasyonları arasında gözlenebilecek benzerlik miktarına yakın fakat farklı iki türün populasyonları arasında gözlenebilecek benzerlik miktarına göre oldukça yüksek olması bu fikri destekler. Bundan başka, elde edilen genetik benzerlik değerinin yüksek olması subsp. *haradjani*'nin *H. pogonocarpum* türünden son zamanlarda ayrılmış olabileceğini düşünmemizi sağlar. Kısacası, elde edilen veriler coğrafik türleşme modeline uygunluk gösterir ve coğrafik olarak izole edilmiş iki populasyonun zamanla farklı iki tür haline gelecekleri görüşünü destekler. Çünkü; diploid, otsu, dışarıdan döllen bitki türlerinde gözlenen yüksek genetik benzerlikler, onların farklı ekolojik koşullara uyum sağlayarak ayırıcı süreç içine girdiklerini gösterir. Yani tür çiftlerine evrimsel bir açıdan bakıldığında ayrılmanın ilk aşamalarında ve gen akımına zaman bariyerinin girmesiyle (yani zamanla gen akımının engellenmesiyle) tam olarak farklı türler haline gelirler. Kısacası, aynı cinse ait türlerin aynı türe ait populasyonlar gibi genetik bakımdan benzerlik göstermesi türleşmenin yeni olmasından

kaynaklanır. Yani, bunlar nispeten “yeni” türlerdir. Türleşme sürecinde “yeni” ya da “son zamanlarda” terimlerini açıklamak zor, hatta çoğu örneklerde imkansızdır. Türleşme süreci her ne kadar bazı taksonlar için 20-50 yıl kadar kısa olabilse de muhtemelen bu süre 1 milyon yıl kadar uzundur (CRAWFORD, 1990).

PASQUET (1993) tarafından yapılan *Vigna unguiculata*'nın alttürlerine ait izoenzimatik çalışmada ise, alttürlerin *V. unguiculata*'dan çok daha eskiden ayrılmış oldukları ileri sürülmüştür. Çünkü elde edilen genetik benzerlik değerleri var. *spontanea* ve subsp. *pubescens* (0.77-0.90) hariç oldukça düşük miktarlarda (0.52-0.86) belirlenmiştir. Bu yüzden, alttürlerin *V. unguiculata*'dan eskiden ayrıldıkları kabul edilmiştir. Buna göre, bizim çalışmada subsp. *pogonocarpum* ve subsp. *haradjani* arasında ölçülen genetik benzerlik miktarı (0.88), subsp. *haradjani*'nin *H. pogonocarpum* türünden daha yakın zamanlarda ayrıldığı fikrini doğrular.

SAIDMAN ve ark. (1996) tarafından yapılan çalışmada, *Prosopis reptans* ile *P. strombulifera* türlerinin popülasyonları arasında NEI 1972'ye göre oldukça yüksek genetik benzerlik değerleri (0.980-0.934) bulunmuştur. Bu değerler bizim çalışmada alttürler için bulduğumuz genetik benzerlik değerinden ve genel olarak farklı türler için beklenen benzerlik değerinden oldukça yüksektir. Oysa CRAWFORD (1985)'a göre, çoğu örneklerde genetik benzerlik ortalaması aynı taksonun popülasyonları için en yüksektir, farklı varyeteler ya da alttürlerin popülasyonları için daha düşük ve farklı türler için en düşüktür. SAIDMAN ve ark. (1996) aynı çalışmada diğer *Prosopis* türleri için daha düşük genetik benzerlikler (0.315-0.666) elde etmişlerdir. Ayrıca 1976'da BURKART tarafından *P. reptans* ile *P. strombulifera*'nın morfolojik olarak birbirlerine çok benzeyen allopatrik türler olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar *P. reptans* ile *P. strombulifera* arasındaki yeterince yüksek genetik benzerlikten dolayı, onların tam türler yerine *P. strombulifera*'nın coğrafik ırkları ya da alttürleri olarak sınıflandırılmasının uygun olacağını ileri sürmüşlerdir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'ye endemik olan *H. pogonocarpum* türünün, doğal yayılış alanı Malatya ile Kahramanmaraş olan populasyonları, türle ilgili sistematik problemleri çözümlenebilmek için elektroforetik olarak çalışıldı.

İzoenzim elektroforezi sonucunda, *H. pogonocarpum*'a ait altpopulasyonlar arasında allel farklılıkları açığa çıktı. Ayrıca altpopulasyonlar arasında yaklaşık olarak % 88'lik genetik benzerlik ve %12'lik genetik mesafe katsayısı belirlendi.

*H. pogonocarpum*'un Kahramanmaraş'ta bulunan Ahır Dağı populasyonu şimdiye kadar farklı sistematikçiler tarafından farklı taksonlarda gruplandırılmış olup buradan toplanan örneklerin hangi taksona dahil edileceği hususunda değişik yorumlar ortaya çıkmıştır.

İleri sürülen görüşlerden birincisi, 1949'da RECHINGER tarafından Ahır Dağı populasyonunun *H. pogonocarpum*'dan ayrı bir tür olarak (*H. haradjani*) kabul edilmesi olmuştur (YILDIZ ve AKTOKLU, 1996). İzoenzim verileri bu görüşü desteklemez. Çünkü, iki populasyon arasında elde edilen genetik benzerlik miktarı (0.888) farklı türler arasında gözlenebilecek benzerlik miktarına göre oldukça yüksektir. Ayrıca elde edilen genetik mesafe katsayısı da (0.119) iki farklı türü gösteremeyecek kadar düşüktür. Böylece, izoenzim bilgisi, Kahramanmaraş'tan toplanan örneklerin *H. pogonocarpum* türüne ait olduğunu gösteren kuvvetli kanıtlar sağladı.

İleri sürülen ikinci görüş ise HEDGE (1970) tarafından Kahramanmaraş'taki Ahır Dağı populasyonunun *Hedysarum kotschy*'ye aktarılması olmuştur. Bu görüşü de ispatlayacak elektroforetik kanıt elde edilememiştir. Çünkü Kahramanmaraş'tan toplanan örnekler, tüm araştırmacılar tarafından *H. pogonocarpum* olarak kabul edilen Malatya'dan toplanan örneklere genetik bakımdan yeterince benzer bulundu. Çalışılan populasyonlar dışında *H. kotschy*'ye ait bir populasyon daha çalışılırdı daha kesin sonuçlar elde edilebilirdi. Fakat, morfolojik kanıtların yanında elektroforetik kanıtlar da Ahır Dağı populasyonunun *H. pogonocarpum* türüne ait olduğunu destekledi.

Bu görüşlerden üçüncüsü ve sonuncusu, YILDIZ ve AKTOKLU (1996) tarafından ileri sürülen Ahrır Dağı popülasyonunun *H. pogonocarpum*'un alttürü olarak kabul edilmesi olmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen izoenzimatik kanıtlar en çok bu görüşü destekler. Çünkü, popülasyonlar arasında belirlenen genetik benzerlik onları *H. pogonocarpum*'un birer üyesi yaparken, aynı zamanda elde edilen genetik mesafe de popülasyonlar arasında belirli genler bakımından farklılık olduğunu ifade eder. Bunun yanında  $F_{ST}$  olarak ölçülen popülasyonlar arasındaki farklılaşma derecesi de (0.10) popülasyonların birbirlerinden orta seviyelerde farklılaştıklarını kanıtlar.

Tüm bunların dışında popülasyonların coğrafik olarak izole edilmiş olması, farklı mikrohabitatlarda bulunmaları, onların allopatrik alttürler olarak kabul edilmesini destekleyen özelliklerdir. Çünkü, herhangi bir tür yer ve zamana göre dağılmış olan popülasyonlardan oluşur. Lokal bir popülasyon içindeki bireyler yakınlıklarından dolayı öncelikle baskın olarak birbirleriyle çiftleşirler, buna rağmen komşu popülasyonlara bir miktar gen akımının olması her zaman mümkündür. Komşu popülasyonlar bu yüzden çoğu kez ortak genlere ya da karakterlere sahip olurlar. Bununla birlikte uzak popülasyonlar benzer olmayan çevrelere mükemmel şekilde uyum sağlayarak farklı gen bileşimine ve farklı özelliklere, aynı zamanda yerel seçim farklılıklarından dolayı farklı allellere ya da aynı allelin farklı frekanslarına sahip olurlar. Bu nedenle türü oluşturan popülasyonları bu benzerlik ve farklılıklardan dolayı bazen ırklar ya da alttürler denilen tür içi gruplar halinde kategorize etmek uygun olmaktadır. Böylece alttürler, türün coğrafik alanının farklı alt bölümlerinde yaşayan ve bir ya da daha fazla karakteri farklı olan lokal popülasyonlara ait bir grup olarak görünürler.

Buna göre, Malatya'dan toplanan örnekler nominat alttür olarak *H. pogonocarpum* Boiss. subsp. *pogonocarpum*, Kahramanmaraş'tan toplanan örnekler *H. pogonocarpum*'dan ayrılan ve farklı bir çevreye uyum sonucu doğal seleksiyonla birtakım yeni özellikler kazanan *H. pogonocarpum* Boiss. subsp. *haradjani* (Rech. fil.) B. Yıldız & E. Aktoklu 'yi oluşturabilir. Daha kesin sonuçlar için her bir takson için daha fazla sayıda popülasyon çalışılması uygun olabilirdi. Böylece, hem her bir taksondaki popülasyonlar arasındaki genetik benzerlik, hem de farklı taksonların popülasyonları arasındaki genetik benzerlik miktarı belirlenerek, daha kolay ve daha doğru bir kıyaslama yapılabilecekti.

## KAYNAKLAR

- AHMAD, F., GAUR, P. M. and SLINKARD, A. E., 1992. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. **Theoretical and Applied Genetics**, 83: 620-627.
- AKPINAR, N. and YILDIZ, B., 1999. Nuclear DNA Contents of Some Endemic *Hedysarum* L. Species. **Turkish Journal of Botany**, 23 (2): 229-232.
- ALONSO, D. L. and REGUERA L. P., 1989. Population structure and pattern of geographic variation in *Muscari comosum* along its range of distribution. **Genetica**, 78: 39-49.
- ANDREWS, A. T., 1990. **Electrophoresis; Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications**. (2nd Edition) Oxford Science Publications, 452 p, Oxford.
- BAIRIGANJAN, G. C. and PATNAIK, S. N., 1989. Chromosomal Evolution in Fabaceae. **Cytologica**, 54: 51-64.
- BREWER, G. J. and SING, C. F., 1970. **An Introduction to Isozyme Techniques**. Academic Press Inc., 186 p, New York and London.
- BRIGGS, D. and WALTERS, S. M., 1997. **Plant Variation and Evolution**. Cambridge University Press, 512 p, United Kingdom.
- BROWN, A. H. D., 1978. Isozymes, Plant Population Genetic Structure and Genetic Conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, 52: 145-157.
- , 1979. Enzyme Polymorphism in Plant Populations. **Theoretical Population Biology**, 15: 1-42.
- , BURDON, J. J. and GRACE, J. P., 1990. Genetic structure of *Glycine canescens*, a perennial relative of soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 79:729-736.
- BUTH, D. G., 1984. The Application of Electrophoretic Data in Systematic Studies. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 15: 501-522.
- CHAMBERLAIN, J. R., HUGHES, C. E. and GALWEY, N. W., 1996. Patterns of Isozyme Variation in the *Leucaena shannonii* Alliance (Leguminosae: Mimosoideae). **Silvae Genetica**, 45 (1): 1-7.
- CONKLE, M. T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B. and HUNTER, S. C., 1982. **Starch Gel Electrophoresis of Conifer Seeds: a laboratory manual**. U.S.D.A. Gen. Techn. Rept. PSW-64, 18 p, California.
- CRAWFORD, D. J., 1985. Electrophoretic Data and Plant Speciation. **Systematic Botany**, 10 (4): 405-416.
- , 1990. Enzyme Electrophoresis and Plant Systematics. (D. E. SOLTIS and P. S. SOLTIS, Editör). In: **Isozymes in Plant Biology**. Chapman and Hall., 146-164, London.
- EL-KASSABY, Y. A., MEAGHER, M. D., PARKINSON, J. and PORTLOCK, F. T., 1987. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia. **Heredity**, 58: 173-181.

- FADY, B. and CONKLE, M. T., 1993. Allozyme Variation and Possible Phylogenetic Implications in *Abies cephalonica* Loudon and Some Related Eastern Mediterranean Firs. **Silvae Genetica**, 42 (6): 351-359.
- GARVIN, D. F., ROOSE, M. L. and WAINES, J. G., 1989. Isozyme Genetics and Linkage in Tepary Bean, *Phaseolus acutifolius* A. Gray. **Journal of Heredity**, 80: 373-376.
- GAUR, P. M. and SLINKARD, A. E., 1990. Inheritance and Linkage of Isozyme Coding Genes in Chickpea. **Journal of Heredity**, 81: 455-461.
- GONZALES-CANDALES, F. and MONTOLIO, A., 2000. Genetic Differentiation and Structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) Populations. **The Journal of Heredity**, 91 (2): 134-141.
- GOTTLIEB, L. D., 1982. Conservation and Duplication of Isozymes in Plants. **Science**, 216: 373-380.
- , 1984. Genetics and Morphological Evolution in Plants. **The American Naturalist**, 123: 681-709.
- HAMRICK, J. L., LINHART, Y. B. and MITTON, J. B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 10: 173-200.
- , 1990. Isozymes and the Analysis of Genetic Structure in Plant Populations. (D. E. SOLTIS and P. S. SOLTIS, Editör). In: **Isozymes in Plant Biology**. Chapman and Hall., 87-105, London.
- and GODT, M. J. W., 1990. Allozyme Diversity in Plant Species. (A. H. D. BROWN, M. T. CLEGG, A. L. KAHLER and B. S. WEIR, Editör). In: **Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources**. Sinauer Associates, Inc., 43-63, Sunderland, U. S. A.
- HARRIS, H. and HOPKINSON, D. A., 1976. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics** [with supplements]. American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.
- HARRIS, S. A., HUGHES, C. E., ABBOTT, R. J. and INGRAM, R., 1994. Genetic Variation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae: Mimosoideae). **Silvae Genetica**, 43 (2-3): 159-167.
- , FAGG, C. W. and BARNES, R. D., 1997. Isozyme variation in *Faidherbia albida* (Leguminosae, Mimosoideae). **Plant Systematics and Evolution**, 207: 119-132.
- HARTL, D. L. and CLARK, A. G., 1989. **Principles of Population Genetics**. (2nd Edition) Sinauer Associates, Inc., 682 p, Publishers Sunderland, Mass.
- HEDGE, I. C., 1970. *Hedysarum* L. (P. H. DAVIS, Editör). In **Flora of Turkey and the East Aegean Islands**. 3: 558.
- HORNERO, J. and PEREZ, C., 1997. Evolution of Genetic Variability in Iberian *Colutea* spp. using Isozyme Electrophoresis. **Biochemical Systematics and Ecology**, 25 (1): 13-20.
- HUNTER, R. L. and MARKERT, C. L., 1957. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. **Science**, 125: 1294-1295.



- JAASKA, V. and JAASKA, V., 1988. Isoenzyme variation in the genera *Phaseolus* and *Vigna* (Fabaceae) in relation to their systematics: aspartate aminotransferase and superoxide dismutase. **Plant Systematics and Evolution**, 159: 145-159.
- , 1999. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the African beans of the genus *Vigna* Savi (Fabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 27 (6): 569-589.
- JACOBS, M. and OLEO, M., 1990. **Isozymes as Molecular Markers in Plants**. Unesco/Icro Training Course on Applications of Cellular and Molecular Techniques to plant Germplasm Preservation. University of Lausanne, Belgium.
- JAIN, S. K. and WORKMAN, P. L., 1967. Generalized *F*-Statistics and the Theory of Inbreeding and Selection. **Nature**, 214: 674-678.
- KARA, N., 1996. **Kızılcammın (*Pinus brutia* Ten.) Doğal Populasyonlarında izoenzim çeşitliliğinin araştırılması**. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 77 s, Antalya.
- KAZAN, K. and MUEHLBAUER, F. J., 1991. Allozyme variation and phylogeny in annual species of *Cicer* (Leguminosae). **Plant Systematics and Evolution**, 175: 11-21.
- KEPHART, S. R., 1990. Starch Gel Electrophoresis of Plant Isozymes: A Comparative Analysis of Techniques. **American Journal of Botany**, 77 (5): 693-712.
- KOENIG, R. and GEPTS, P., 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 78: 809-817.
- KRUGMAN, S. L., STEIN, W. I. and SCHMITT, D. M., 1974. Seed Biology. In: **Seeds of Woody Plants in the United States**. (C.S. SCHOPMEYER, Editör). Agriculture Handbook No. 450, Forest Service, U.S. Department of Agriculture, 5-40, Washington.
- LATNER, A. L. and SKILLEN, A. W., 1968. **Isoenzymes in Biology and Medicine**. Academic Press Inc., 289 p, London and New York.
- LIENGSIRI, C., PIEWLUANG, C. and BOYLE, T. J. B., 1990. **Starch Gel Electrophoresis of Tropical Trees-A Manual**. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre, 51 p, Thailand.
- LISTON, A., 1992. Isozyme Systematics of *Astragalus* sect. *Leptocarpi* subsect. *Californici* (Fabaceae). **Systematic Botany**, 17 (3): 367-379.
- LOVELESS, M. D. and HAMRICK, J. L., 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 15: 65-95.
- MAQUET, A., ZORO BÍ, I., DELVAUX, M., WATHELET, B. and BAUDOIN, J.-P., 1997. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 95: 980-991.
- MAY, B., 1998. Starch Gel Electrophoresis of Allozymes. (A. R. HOELZEL, Editör). In: **Molecular Genetic Analysis of Populations**. Oxford University Press. 2: 1-28, Oxford, New York.

- MAYR, E., and ASHLOCK, P. D., 1991. **Principles of Systematic Zoology**. (Second Edition) (K. PRANCAN and H. GORDON, Editör). McGraw-Hill, Inc. ISBN 0-07-112701-1, 475 p, Singapore.
- McDONALD, J. H., 1985. **No bad gels-Starch gel electrophoresis for the masses**. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook, 18 p, Stony Brook, NY 11794.
- METTLER, L. E., GREGG, T. G. and SCHAFFER, H. E., 1988. **Population Genetics and Evolution**. Prentice-Hall, Inc., 325 p. Englewood Cliffs, New Jersey.
- MURPHY, R. W., SITES, J. W., BUTH, D. G. and HAUFLE, C. H., 1996. Proteins: Isozyme Electrophoresis. (D. M. HILLIS, C. MORITZ, B. K. MABLE, Editör). In: **Molecular Systematics**. Sinauer Associates Inc., 2: 51-120, Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- NEI, M., 1972. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, 106: 283-293.
- , 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 70 (12): Part I, 3321-3323.
- , 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89: 583-590.
- , 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press. 149-253, New York.
- NEIGEL, J.E., 1997. A Comparison of Alternative Strategies for Estimating Gene Flow from Genetic Markers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 28: 105-128.
- NEVO, E., 1978. Genetic Variation in Natural Populations: Patterns and Theory. **Theoretical Population Biology**, 13: 121-177.
- PASQUET, R. S., 1993. Variation at isozyme loci in wild *Vigna unguiculata* (Fabaceae, Phaseoleae). **Plant Systematics and Evolution**, 186: 157-173.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J., and BRITTON-DAVIDIAN, J., 1988. **Practical Isozyme Genetics**. Halsted Press: a division of John Wiley & Sons, 215 p, Chichester, England.
- POWEL, J. R. and TAYLOR, C. E. 1979. Genetic Variation in Ecologically Diverse Environments. **American Scientist**, 67: 590-596.
- QUICKE, D. L. J., 1993. **Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy**. Chapman & Hall, 167-189, London.
- RAELSON, J. V. and GRANT, W. F., 1988. Evaluation of hypotheses concerning the origin of *Lotus corniculatus* (Fabaceae) using isoenzyme data. **Theoretical and Applied Genetics**, 76 (2): 267-276.
- and GRANT, W. F., 1989. An isoenzyme study in the genus *Lotus* (Fabaceae). Experimental protocols and genetic basis of electrophoretic phenotype. **Theoretical and Applied Genetics**, 77 (4): 595-607.
- , LEMAITRE, P. C., STARKIE, K. M. and GRANT, W. F. 1989. An isoenzyme study in the genus *Lotus* (Fabaceae). Segregation of isoenzyme alleles in synthetic allo- and autotetraploids, and in *L. corniculatus*. **Theoretical and Applied Genetics**, 77 (3): 360-368.

- RUSSEL, J. P., 1996. **Genetics**. Happer Collins College Publishers, ISBN 0-673-52359-4, p. 694, 709-714. New York.
- SAIDMAN, B. O. and VILARDI, J. C., 1987. Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). **Theoretical and Applied Genetics**, 75: 109-116.
- , VILARDI, J. C., POCOVI, M. I. and ACRECHE, N., 1996. Genetic divergence among species of the section *Strombocarpa*, genus *Prosopis* (Leguminosae). **J. Genet.**, 75 (2): 139-149.
- SARICH, V.M., 1977. Rates, sample sizes, and the neutrality hypothesis for electrophoresis in evolutionary studies. **Nature**, 265: 24-28.
- SHAW, R. C. and PRASAD, R., 1970. Starch Gel Electrophoresis of Enzymes-A Compilation of Recipes. **Biochemical Genetics**, 4: 297-320.
- SHIELDS, C. R., ORTON, T. J. and STUBER, C. W., 1983. An Outline of General Resource Needs and Procedures for the Electrophoretic Separation of Active Enzymes from Plant Tissue. (S. D. TANKSLEY and T. J. ORTON, Editör). In: **Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A**. Elsevier Science Publishers B.V., 443-467, Amsterdam.
- SLATKIN, M., 1985. Gene Flow in Natural Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 16: 393-430.
- and BARTON, N. H., 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, 43 (7): 1349-1368.
- STUBER, C. W., WENDEL, J. F., GOODMAN, M. M. and SMITH, J. S. C., 1988. **Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.)**. Technical Bulletin 286, North Carolina Agricultural Research Service, North Carolina State University, Raleigh, 87 p, North Carolina.
- SWOFFORD, D. L. and SELANDER, R. B., 1981. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. **The Journal of Heredity**, 72: 281-283.
- TAYYAR, R. I. and WAINES, J. G., 1996. Genetic relationships among annual species of *Cicer* (*Fabaceae*) using isozyme variation. **Theoretical and Applied Genetics**, 92 (2): 245-254.
- TEMPLETON, A. R., 1980. Modes of speciation and inferences based on genetic distances. **Evolution**, 34 (4): 719-729.
- WAIN, R. P., 1983. Genetic differentiation during speciation in the *Helianthus debilis* complex. **Evolution**, 37 (6): 1119-1127.
- WEIR, B. S. and COCKERHAM, C. C., 1984. Estimating *F*-statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, 38: 1358-1370.
- WEEDEN, N. F. and WENDEL, J. F., 1990. Genetics of Plant Isozymes. (D. E. SOLTIS and P. S. SOLTIS, Editör). In: **Isozymes in Plant Biology**. Chapman and Hall., 46-72, London.
- WENDEL, J. F. and WEEDEN, N. F., 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. (D. E. SOLTIS and P. S. SOLTIS, Editör). In: **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press, 5-45, Portland, Oregon.
- WILKINSON, J. H., 1966. **Isoenzymes**. J. B. Lippincott Company, 369 p, Philadelphia.

YILDIZ, B. ve AKTOKLU, E., 1996. **Türkiye'nin *Hedysarum* L. (Fabaceae) cinsine ait türlerin revizyonu.** TÜBİTAK, Temel Bilimler Araştırma Grubu, Proje No:TBAG-1147, 65 s. Malatya.



## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Antakya'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi aynı ilde tamamladım. 1994'de girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 1998 yılında Fakülte Birincisi olarak, Biyolog ünvanıyla mezun oldum. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.



EKLER .....	66
EK 1. Elektroforetik Çalışma Sırasında Kullanılan Kimyasal Madde Listesi .....	67
EK 2. Özütleme ve Jellerin Boyanmasında Kullanılan Tamponların Bileşenleri ..	68
EK 3. Çalışılan Enzimlerin Boyanma Reaksiyonları .....	69
EK 4. İstatistiki Hesaplamalara İlişkin Bilgiler ve İlgili Formüller .....	72
EK 5. Tanımlamalar .....	74



## EK 1

## Elektroforetik Çalışma Sırasında Kullanılan Kimyasal Madde Listesi

Kimyasal Madde Adı	Katalog No	Firma
BILE Bovine	B-3883	Sigma
Boric acid	B-0252	Sigma
Bromphenol blue, sodium salt	B-8026	Sigma
Calcium chloride	C-3881	Sigma
Citric acid-1-hydrate	27102	Riedel-de Haën
DL-Malic acid (DL-Hydroxybutanedioic acid)	M-0875	Sigma
EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)	E-5513	Sigma
Etil alkol	1.00971.2500	Merck
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G-7877	Sigma
Lithium hydroxide, monohydrate	L-4256	Sigma
Magnesium chloride, hexahydrate	M-0250	Sigma
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)	M-2128	Sigma
Nitro blue tetrazolium (NBT)	N-6876	Sigma
Phenazine methosulfate (PMS)	P-9625	Sigma
Polyvinyl-Pyrrolidone	PVP-40	Sigma
Sodium phosphate, dibasic, anhydrous	S-0876	Sigma
Sodium phosphate, monobasic, anhydrous	S-0751	Sigma
Starch (potato), hydrolyzed	S-4501	Sigma
Triton X-100	T-8787	Sigma
Trizma base (Tris [hydroxymethyl] aminomethane)	T-1503	Sigma
$\alpha$ -D-glucose 1,6 diphosphate	G-5750	Sigma
$\alpha$ -D-glucose 1-phosphate	G-1259	Sigma
$\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	N-0632	Sigma
$\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)	N-0505	Sigma

## EK 2

## Özütleme ve Jellerin Boyanmasında Kullanılan Tamponların Bileşenleri

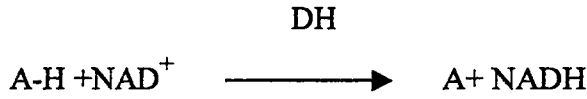
Tampon	pH	Bileşenler
0.2 M Fosfat tamponu	7.5	Sodyum fosfat monobazik 3.84 g Sodyum fosfat dibazik 23.86 g Distile su 1.0 L
0.05 M Tris-HCl tamponu	8.3	Trizma baz 6.05 g Distile su 1.0 L HCl ile pH: 8.3'e ayarlandı.
0.1 M Tris-HCl tamponu	7.5	Trizma baz 12.11 g Distile su 1.0 L HCl ile pH: 7.5'e ayarlandı.



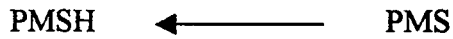
### EK 3

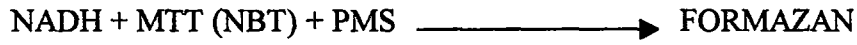
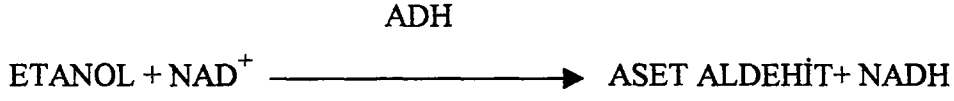
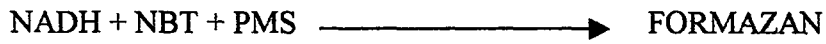
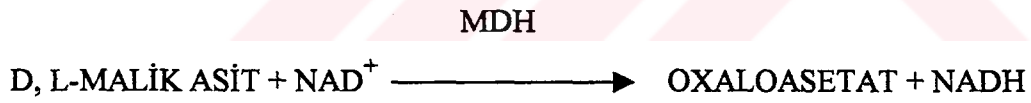
Çalışılan Enzimlerin Boyanma Reaksiyonları (HARRIS ve HOPKINSON, 1976; PASTEUR ve ark., 1988).

Dehidrogenazların çoğu (DH), substratlarından (A-H) gelen bir hidrojen atomunu koenzimine ( $\text{NAD}^+$  ya da  $\text{NADP}^+$ ) aktarmayı kataliz ederler. Böylece aşağıdaki reaksiyon gerçekleşir.



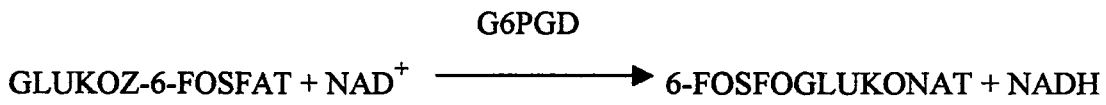
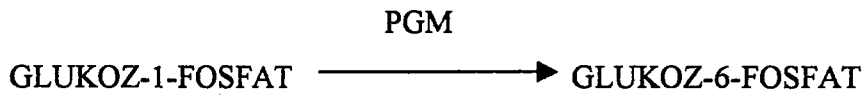
“Tetrazolium sistem” de PMS, NBT ve MTT Hidrojen alıcısı olarak görev yaparlar. PMS, NADH’dan aldığı Hidrojen atomunu NBT ya da MTT’ye aktarır. Bu şekilde çözünemeyen mavi çökelti (formazan) meydana gelir.



**ALKOL DEHİDROGENAZ (ADH)****E. C. 1.1.1.1**(Diğer adları: Aldehyde oxidase, Alcohol NAD<sup>+</sup>-oxidoreductase)**MALAT DEHİDROGENAZ (MDH)****E. C. 1.1.1.42**

**FOSFOGLUKO MUTAZ (PGM)****E.C. 5.4.2.2**

(Diğer adı: Glucose phosphomutase)



## EK 4

## İstatistiki Hesaplamalara İlişkin Bilgiler ve İlgili Formüller

## WRIGHT'IN F-İSTATİSTİĞİ

F-istatistiği ile popülasyonlarda gözlenen genotip frekanslarında ve bundan dolayı heterozigotluk düzeyinde, Hardy-Weinberg şartlarında beklenen değerden sapma olup olmadığı belirlenir. Aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

$$F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$$

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

$H_I$ , bir altpopulasyondaki bireylerin gözlenen heterozigotluk düzeyidir.

$$H_I = \sum H_{Ij} / n$$

$H_{Ij}$  = J. popülasyonun heterozigotluk düzeyi

n = popülasyon sayısı

$H_S$ , tesadüfi eşleşme koşullarında, bir altpopulasyondaki bireylerin Hardy-Weinberg şartlarında beklenen heterozigotluk düzeyidir.

$$H_S = \sum H_{Sj} / n$$

$H_{Sj}$  = J. popülasyonun beklenen heterozigotluk düzeyi

n = popülasyon sayısı

$H_T$ , tesadüfi eşleşme koşullarında, popülasyonun tamamında Hardy-Weinberg şartlarında beklenen heterozigotluk düzeyidir.

$$H_T = 1 - \sum (X_{ia})^2$$

$X_{ia}$  = bütün popülasyonlar göz önüne alındığında i. allelin ortalama frekansıdır.

$$(1 - F_T) = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

## NEI'NİN GENETİK BENZERLİK (I) VE GENETİK MESAFESİ (D)

Populasyonlar arasındaki genetik benzerlik ve farklılıkları belirlemek için yapılan bir istatistiktir. Aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$D = -\ln I$$

D= Genetik Mesafe Katsayısı

I= Genetik Benzerlik Katsayısı

$$I = [J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}]$$

$$J_{xy} = \sum x_i y_i / r,$$

$$J_x = \sum x_i^2 / r$$

$$J_y = \sum y_i^2 / r$$

$x_i$  ve  $y_i$  = X ve Y populasyonlarında i. allelin frekansı

r= lokus sayısı

## EK 5

### Tanımlamalar

- Alttür:** Bir türün coğrafik alanının altbölümlerinde yaşayan ve bir ya da daha fazla karakteri farklı olan lokal popülasyonlara ait taksonomik bir gruptur.
- Monomorfik lokus:** En yaygın allelinin frekansı % 95'den daha fazla olan lokus, monomorfik lokustur.
- Polimorfik lokus:** En yaygın allelinin frekansı % 95 veya % 95'den daha az olan lokus, polimorfik lokustur.
- Polimorfizm:** Populasyonda bir karakterin birden fazla alternatifinin bulunmasıdır.
- Semitür:** Alttür ve tür arasındaki ara taksonlar çoğu kez semitür olarak ifade edilirler (MAYR ve ASHLOCK, 1991).
- Takson:** Sınıflandırma kademelerinin herhangi birinde, belirli bir kategoriye girebilecek kadar yeterli farklılıklara sahip olan taksonomik bir gruba takson denir. Örneğin, tür bir takson değildir, fakat bir kategoridir. Oysa, *Hedysarum pogonocarpum* bir taksondur.
- Zimogram:** Enzimler substratları ile reaksiyona girdiklerinde, substratlarını ürüne dönüştürürler. Bu ürünler de boyanma yoluyla jelde renkli bantlar halinde görünürler. Enzimlerin jelde gözlenebilen bu fenotiplerine zimogram denir.