

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *LATHYRUS L.* TÜRLERİNDE TOHUM
DEPO PROTEİNLERİNİN (ALBÜMİN, GLOBÜLİN, PROLAMİN VE
GLUTELİN) SDS-PAGE YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

İrfan EMRE

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu doktora tezi FÜBAP tarafından 1136 nolu proje ile desteklenmiştir.

ELAZIĞ, 2007

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *LATHYRUS* L. TÜRLERİNDE TOHUM
DEPO PROTEİNLERİNİN (ALBUMİN, GLOBULİN, PROLAMİN VE
GLUTELİN) SDS-PAGE YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

İrfan EMRE

Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez/...../.....tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile başarılı /başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN

Üye: Prof. Dr. Harun EVREN

Üye: Doç. Dr. Fikret KARATAŞ

Üye: Doç. Dr. Eyüp BAĞCI

Üye: Yard. Doç. Dr. Songül AYDEMİR

Bu tez Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/...../..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca arazi çalışmalarım da dahil olmak üzere tezimin laboratuvar çalışmalarında ve hazırlanışında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN'e ve gerek laboratuvar çalışmalarım da gerekse tezin yazımı aşamasında her türlü desteği aldığım Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda arazi çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Burdur Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Yard. Doç. Dr. Hasan GENÇ'e, Biyoloji Bölümü doktora öğrencisi Murat KÜRŞAT'a ve yüksek lisans öğrencisi Hakan SEPET'e teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım da tecrübelerinden yararlandığım Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Yard. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya da teşekkürü borç bilirim. Aynı zamanda 1136 nolu projeye tezime destek veren FÜBAP yönetim birimine de teşekkür ederim.

İrfan EMRE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	III
TABLolar LİSTESİ	V
SEMBOLLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1.GİRİŞ	1
2.BAKLAGİLLER	3
3. TOHUM DEPO PROTEİNLERİ	6
3.1. Tohum depo proteinlerinin birikmesi ve depolanması	8
3.2. Tohum depo proteinlerinin sentezlenmesi ve uğradıkları değişimler	10
3.3. Tohum depo proteinlerinin proteolizi	13
4. TOHUM DEPO PROTEİNİ ALT FRAKSİYONLARI	15
4.1. Albuminler	15
4.2. Globulinler	16
4.2.1. Legümin tipi globulinler (11S globulinler)	17
4.2.2. Vicilin tipi globulinler (7S globulinler)	18
4.2.3. Legümin tipi ve vicilin tipi globulinlerin karşılaştırılması	19
4.3. Prolaminler	21
4.4. Glutelinler	22
5. PROTEİNLERİN ELEKTROFOREZİ	24
6. MATERYAL-METOD	26
6.1. Materyalin temini	26
6.2. Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının eldesi	28
6.3. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezin uygulanması	28
6.3.1. Poliakrilamid jellerin hazırlanması	28
6.3.1.1.Ayrırma jelinin hazırlanması	28
6.3.1.2.Yükleme jelinin hazırlanması	29
6.3.2. Protein örneklerinin hazırlanması	29
6.3.3.Örneklerin uygulanması	29
6.3.4.İstatistiksel analizler	30
7. BULGULAR	31
7.1. Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarını belirlemede kullanılan standartların absorbands değerleri	31

7.2.Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarları	32
7.3.Benzerlik matrisi	34
7.4.Türlere ait Rf değerleri	40
7.5.Tohum depo proteinlerinin yüzde değerleri	44
8.TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Prolamin ve glutelinlerin sentezlenmesi ve uğradıkları değişimler	9
Şekil 3.2. Tohum depo proteinlerinin uğradıkları bazı değişimler	13
Şekil 4.1. Legüminin biyosentezi ve geçirdiği değişimler	18
Şekil 4.2. <i>Pisum sativum</i> 'da vicilinin uğradığı değişimler	19
Şekil 4.3. Legümin ve vicilinlerin ortak atasal genden oluşmaları	21
Şekil 5.1. Akrilamid monomerlerinin birleşerek poliakrilamidi oluşturmaları	25
Şekil 7.1. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların depo proteinlerinin miktarlarını belirlemede kullanılan standartların absorpsiyon değerleri	31
Şekil 7.2. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin depo proteinlerinin miktarlarını belirlemede kullanılan standartların absorpsiyon değerleri	31
Şekil 7.3. Çalışılan on yedi taksona ait tohum depo proteinlerinin ortalama yüzde oranları	44
Şekil 7.4. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin örneklerinin elektroforez görüntüleri	45
Şekil 7.5. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A örneklerinin elektroforez görüntüleri	46
Şekil 7.6. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerinin elektroforez görüntüleri	47
Şekil 7.7. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin örneklerinin elektroforez görüntüleri	48
Şekil 7.8. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin örneklerinin elektroforez görüntüleri	49
Şekil 7.9. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A örneklerinin elektroforez görüntüleri	50
Şekil 7.10. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B örneklerinin elektroforez görüntüleri	51
Şekil 7.11. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin örneklerinin elektroforez görüntüleri	52
Şekil 8.1. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin örneklerine göre oluşturulan dendogram	54
Şekil 8.2. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A örneklerine göre oluşturulan dendogram	55
Şekil 8.3. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerine göre oluşturulan dendogram	56
Şekil 8.4. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin örneklerine göre oluşturulan dendogram	57

Şekil 8.5. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin örneklerine göre oluşturulan dendogram	59
Şekil 8.6. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A örneklerine göre oluşturulan dendogram	60
Şekil 8.7. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B örneklerine göre oluşturulan dendogram	61
Şekil 8.8. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin örneklerine göre oluşturulan dendogram	62
Şekil 8.9. Rf değerleri kullanılarak oluşturulan dendogram	64

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Farklı bitkilerdeki bazı tohum proteinlerinin amino asit kompozisyonları ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilen oranları	4
Tablo 2.2. Çeşitli baklagil tohumlarındaki farklı proteinlerin etkileri	5
Tablo 3.1. Çözünürlüklerine göre tohum depo proteinleri ve bazı özellikleri	8
Tablo 3.2. Farklı depo proteinlerinin hücredeki çeşitli kompartımanlarda uğradıkları değişimler	11
Tablo 6.1. <i>Lathyrus</i> taksonlarının alındığı lokaliteler	27
Tablo 7.1. Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarları	33
Tablo 7.2. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin örneklerinin benzerlik matrisi	34
Tablo 7.3. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A örneklerinin benzerlik matrisi	35
Tablo 7.4. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerinin benzerlik matrisi	35
Tablo 7.5. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin örneklerinin benzerlik matrisi	36
Tablo 7.6. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin örneklerinin benzerlik matrisi	37
Tablo 7.7. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A örneklerinin benzerlik matrisi	38
Tablo 7.8. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B örneklerinin benzerlik matrisi	38
Tablo 7.9. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin örneklerinin benzerlik matrisi	39
Tablo 7.10. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin proteinlerinin Rf değerleri	40
Tablo 7.11. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A proteinlerinin Rf değerleri	40
Tablo 7.12. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B proteinlerinin Rf değerleri	41
Tablo 7.13. <i>Orobus</i> , <i>Platystylis</i> ve <i>Pratensis</i> seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin proteinlerinin Rf değerleri	41
Tablo 7.14. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin proteinlerinin Rf değerleri	42

Tablo 7.15. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A proteinlerinin Rf değerleri	42
Tablo 7.16. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B proteinlerinin Rf değerleri	43
Tablo 7.17. <i>Orobon</i> , <i>Lathyrus</i> ve <i>Orobastrum</i> seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin proteinlerinin Rf değerleri	43

SEMBOLLER LİSTESİ

α -:	Alfa
Å:	Angstron
β -:	Beta
δ -:	Delta
γ -:	Gama
HCl:	Hidroklorik asit
kDa:	Kilodalton
μ g:	Mikrogram
μ l:	Mikrolitre
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
M:	Molar
nm:	Nanometre
cm:	Santimetre
NaOH:	Sodyum hidroksit
NaCl:	Sodyum klorür

KISALTMALAR LİSTESİ

BIP:	Bağlayıcı protein (Binding protein)
ER:	Endoplazmik Retikulum
GER:	Granüllü Endoplazmik Retikulum
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)
M _r :	Nisbi moleküler kütle (Molecular mass)
PC-ER:	Endoplazmik retikulum kökenli protein cisimciği
PC-V:	Vakuolden kökenlenmiş olan protein cisimciği
PDV:	Protein depo vakuölü
pI:	İzoelektrik nokta (Isoelectric point)
RAPD:	Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
Rf:	Proteinlerin jel üzerindeki oransal hızları (Relative front)
RFLP:	Kesilmiş Fragmentlerin Uzunluğundaki Polimorfizm (Restriction Fragment Length Polymorphism)
S:	Sedimentasyon katsayısı
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
S-fakir:	Kükürtçe fakir
SH-EP:	Sistein endopeptidaz (Cysteine endopeptidase)
SPSS:	Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal bilimler için istatistiksel paket programı)
S-S köprüsü:	Disülfid köprüsü
S-zengin:	Kükürtçe zengin
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin
UPGAMA :	Unweighed Pair-Group Arithmetic Mean
VPE:	Vakuolar süreç enzimi

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI *LATHYRUS* L. TÜRLERİNDE TOHUM DEPO PROTEİNLERİNİN (ALBUMİN, GLOBULİN, PROLAMİN VE GLUTELİN) SDS-PAGE YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

İrfan EMRE

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

2007, sayfa: 76+X

Fabaceae familyasına ait diğer cinsler gibi *Lathyrus* L. tohumları da yüksek protein içeriğine sahiptir ve gelişimleri esnasında büyük miktarda protein biriktirirler. Bu proteinlerin pek çoğu katalitik aktiviteye sahip değildir, çimlenme ve tohum gelişimi esnasında amino asit sağlamaya hizmet ederler. Bu proteinler “depo proteinleri” olarak isimlendirilirler. Tohum depo proteinleri oldukça stabildirler, çevre şartlarından etkilenmezler ve kolaylıkla elde edilirler. Bu yüzden tohum proteinleri çeşitli literatürlerde önemli oranda dikkat çekmişlerdir ve elektroforetik teknikler taksonomik olayların önemli kaynağı olarak kabul edilerek cins ve tür seviyelerinde genetik akrabalıkları göstermek için kullanılırlar.

Bu tezde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak Türkiye’nin değişik bölgelerinden toplanan toplam on yedi taksonun aralarındaki genetik akrabalığı araştırmak için tohum depo proteini alt fraksiyonu profillerinin analizi çalışıldı. Tohum kabukları ekstraksiyondan önce uzaklaştırıldı ve kotiledonlar elde edildi. Bunlar tohum protein alt fraksiyonlarını elde etmek amacıyla dört farklı solüsyonla homojenize edildi ve daha sonra her bir alt fraksiyonun protein miktarları belirlendi. Elektroforetik veriler jel dökümantasyon sistemi kullanılarak belirlendi ve Quantity 1-D programı ile analiz edildi ve aynı zamanda dendogramlar UPGAMA ile oluşturuldu. *Lathyrus* L. cinsinin *Orobus*, *Platystylis*, *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarının çalışılan bütün taksonları tohum proteini benzerliklerine göre önceki morfolojik sınıflandırmayla düzenlendiği gibi birlikte kümelendiler. Göze çarpan en önemli sonuçlardan biri Türkiye için endemik ve poliploid olan ($2n:28$) *L. brachypterus* var. *brachypterus*’un (sırasıyla 3.495 µg/ml ve 2.752 µg/ml) albumin ve globulin A miktarlarının düşük olmasıdır. Bunun sebebi albumin ve globulin A’nın genlerinin suskunluğundan dolayı oldukça düşük çıkmış olabilir. Bu tezin diğer bir önemli sonucu da çalışılan *Lathyrus* taksonlarındaki glutelin band paternlerinin globulin B band paternleriyle benzerliğidir.

Anahtar kelimeler: *Lathyrus*, tohum depo proteinleri, albuminler, globulinler, prolamınler, glutelinler, SDS-PAGE, poliploidi, UPGAMA

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF SEED STORAGE PROTEINS (ALBUMIN, GLOBULIN, PROLAMIN and GLUTELIN) IN SOME *LATHYRUS* L. SPECIES GROWING IN TURKEY BY SDS-PAGE METHOD

İrfan EMRE

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

2007; page: 76+X

Alike other genus belong to *Fabaceae*, *Lathyrus* seeds have a high protein content and accumulate large amounts of proteins during their development. Most of these proteins don't have catalytic activity, serve to provide amino acids for use during germination and seed growth. These seed proteins termed "storage proteins". Seed storage proteins are highly stable, unaffected by environmental conditions and easy to handle. Therefore seed proteins have extensive attention in several literatures and electrophoretic techniques for total seed protein analysis have been recognized as a important source of taxonomic evidences and were used to adress genetic relationships at the generic and specific levels.

In this thesis total seventeen taxa collected from different regions of Turkey have been studied for the analysis of seed storage protein subfraction profiles to examine their genetic relationship by using sodium dodecyl sulphate polyacrilamde gel electrophoresis technique (SDS-PAGE). Seed coats were removed prior to extraction and cotyledons were obtained. These were homogenised in four different solution to obtain seed protein subfractions and then protein amounts of every subfractions were quantified. Electrophoretic data were determined by using a gel documentation system and analysed by Quantity 1-D analysis software and also dendograms were formed in UPGAMA. All studied taxa of genus *Lathyrus* L. sections *Orobus*, *Platystylis*, *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus* and *Orobastrum* cluster together on the basis of seed protein similarities as designed by previous morphological classification. One of the prominent result is albumin and globulin A quantities of *L. brachypterus* var. *brachypterus* (3.495 µg/ml and 2.752 µg/ml respectively) which is endemic for Turkey and polyploidy (2n:28) were low. This could be because of gene silencing of albumin and globulin A being quite low. Other important result of this thesis is similarity of glutelin band patterns with globulin B band patterns in studied *Lathyrus* taxa.

Key words: *Lathyrus*, Seed storage proteins, albumins, globulins, prolamins, glutelins, SDS-PAGE, polyploidy, UPGAMA

1. GİRİŞ

Lathyrus L. cinsi, yurdumuzun hemen hemen bütün bölgelerinde ve daha çok *Fabaceae* üyelerinin gen merkezi olarak kabul edilen Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yayılış göstermektedir. *Lathyrus* L. cinsine ait bazı türlerin ekonomik değere sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin *L. sativus* L., *L. hirsutus* L., *L. cicera* L., *L. odoratus* L. gibi önemli besin değerine sahip olan bazı türlerin kültürleri yapılmaktadır [1,2].

Lathyrus L. cinsine ait türler morfolojik olarak gerek kendi aralarında gerekse de *Vicia* cinsine ait türlerle benzerlikler gösterdiklerinden dolayı sistematik açıdan problemler yaşamakta ve bu yüzden sınıflandırmada morfolojik karakterlere ilaveten sitolojik (genellikle kromozomlarla ilgili), anatomik, moleküler ve biyokimyasal parametreler de kullanılmaktadır [1]. Örneğin *L. aureus*, *Vicia croceae* ile karıştırılmakta aynı zamanda bu tür *L. libani* ile de problemler yaşamaktadır. Aynı şekilde *L. digitatus* sistematik problemlere iyi bir örnek olarak verilmektedir. Şöyle ki *L. digitatus*, *L. cyaneus* ile sistematik problemler yaşamakta yine görünürde *L. spathulatus*'la ve *L. tukhtensis*'in dar yapraklı formlarıyla benzerlik göstermektedir. *L. roseus* ise *Lathyrus* seksiyonu ile *Orobus* seksiyonu arasında bir yerde bulunmaktadır [3]. Sistematik pozisyonu da şüpheli olan *L. saxatilis* ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda bu tür *Orobastrum* seksiyonundan çıkarılmış ve *Viciopsis* adlı monotipik bir seksiyona dahil edilmiştir [4]. Şahin ve Altan 1991 yılında yaptıkları kromozom çalışmasıyla *L. saxatilis*'in kromozom özelliklerinin *Orobastrum* seksiyonundaki diğer türlerden farklı olduğunu bulmuşlardır [5]. Benzer şekilde *L. sativus* görünüş ve çiçek şekli olarak *L. cicera* ile karıştırılmakta ayrıca meyve yapısı bakımından da *L. amphicarpos*, *L. blepharicarpus* ve *L. marmoratus* ile benzerlik göstermektedir [3]. Davis, *L. articulatus*'u bir tür olarak *L. clymenum*'dan ayırt etmenin imkansız olduğunu belirtmiştir [3].

Sistematik problemleri gidermek amacıyla yaygın olarak kullanılan biyokimyasal metodlardan biri de tohum depo proteinlerinin elektroforetik analizidir [6]. Depo proteinleri oldukça stabil olduklarından ve çevresel şartlardan etkilenmediklerinden tohum proteinlerinin elektroforezi sistematik veriler için geçerli bir kaynak olarak kabul edilir ve gerek cins seviyesinde gerekse de daha spesifik seviyelerde sistematik problemleri çözmek amacıyla kullanılır [7]. Örneğin *Astragalus* [8], *Pisum* [9], *Phaseolus* [10], *Lathyrus* [11-13] gibi pek çok baklagilde sistematik amaçlar için elektroforetik analiz kullanılmıştır. Aiken ve arkadaşları da SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez)'in;

- 1) eşitli cinslere ait tırlerin band profillerini ortaya koymak amacıyla,
- 2) Farklı coğrafik bėlgelerdeki tırler arasındaki karşılaştırmayı yapabilmek amacıyla,
- 3) Sistematik açıdan faydalı tanımlamalar sağlamak amacıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir [14]. El-Shanshoury 1997 yılında SDS-PAGE tekniğini kullanarak yaptığı çalışmada *Lathyrus* tohumlarının depo proteinlerince çok zengin olduğunu ve çok sayıda stabil bantlara sahip olduğunu ifade etmiştir [2].

Bu doktora tezinde *Lathyrus* cinsine ait 17 takson arasındaki sistematik problemlere çözüm bulmak ve morfolojik sistematiğe yardımcı olmak amacıyla FÜBAP (Fırat Üniğiversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) 1136 nolu proje çerçevesinde SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez) tekniği kullanılarak tohum depo proteinlerinin analizi yapılmıştır. Bėylece tohum depo proteini alt fraksiyonları (albumin, globulin, prolamin ve glutelin) yardımıyla taksonlara ait protein bantları elde edilmiş ve bunlardan yararlanılarak kümeleme analizi yöntemiyle taksonlar arasındaki benzerlikler ortaya çıkarılmıştır.

2. BAKLAGİLLER (LEGÜMENLİLER)

Bitki tohumları protein, lipid ve karbohidrat bakımından zengin olduklarından dolayı, kıymetli besin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar [15]. Son yıllarda artan protein talebine karşılık alternatif ve yeni protein kaynakları aramak ve ayrıca marjinal topraklarda yetişen bitkiler üretmek veya yüksek kalitede besin içeriğine sahip bitkiler yetiştirmek oldukça popüler konulardan biri haline gelmiştir. Bunlar arasında protein değerinin yanı sıra vitaminler, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi biyolojik yöndende aktif bileşikler içeren baklagil tohumları önemli yer işgal etmektedir [16,17]. Baklagil tohumlarında, kotiledonlar, tohum kabuğu ve embriyonik eksen olmak üzere üç farklı kısım ayırt edilmektedir ki bu yapıların toplam tohum ağırlığına göre yüzde oranları sırasıyla ortalama % 89, % 10 ve % 1'dir. Kotiledon, ana rezerv maddelerini ihtiva ederken, tohum kabuğu ise (yüksek oranda fenolik bileşiklere sahiptir) kotiledon için koruyucu görev yapmaktadır [17].

Yapılan araştırmalara göre insan besininin yaklaşık olarak % 70'ini tahıllar ve baklagiller meydana getirmekte geri kalan % 30'luk kısım ise hayvansal besinlerden karşılanmaktadır. Ancak hayvansal proteinler esansiyal amino asitler bakımından denge halindelerken baklagil ve tahıl proteinlerinde genellikle bir dengesizlik söz konusudur. Örneğin tahıl proteinleri genellikle lizin ve triptofan amino asidince eksiklik yaşarken baklagil proteinleri ise sülfür içeren metiyonin ve sistein amino asitlerince fakirdirler. Ayrıca lektinler, enzim inhibitörleri gibi bileşiklerin bulunması baklagil tohumlarının besin kalitesini kısmen etkilemektedirler [18]. Yüksek besin değerlerinin yanı sıra baklagiller, *Rhizobium* familyasına ait bakterilerle ve mikorizal funguslarla simbiyotik ilişki kurarak biyolojik azotun üretilmesine katkıda bulunmalarından dolayı tarımsal rotasyonun gerekli elemanları ve başlıca organik gübre kaynağıdırlar [19].

Tablo 2.1. Farklı bitkilerdeki bazı tohum proteinlerinin amino asit kompozisyonları ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilen oranları [18]

Amino asit	Dünya Sağlık Örgütü	Mısır bitkisindeki zein proteini	Bezelye bitkisindeki legümin proteini
Alanin	-	13.7	6.0
Arginin	-	1.2	10.0
Sistein	-	İz miktarda	1.2
Glisin	-	2.1	6.9
Histidin	-	0.9	1.8
Lösin	7.0	20.0	7.6
Metiyonin	3.5	İz miktarda	0.7
Valin	5.0	3.6	5.0
İzolösin	4.0	4.1	4.0
Lizin	5.5	0.2	4.2
Threonin	4.0	2.4	3.1

Fabaceae 700'den fazla cinsi ve yaklaşık 19.000 türü ihtiva eden yüksek bitkilerin üçüncü büyük familyasını oluşturmaktadır [19,20]. *Fabaceae* familyası; *Phaseoleae*, *Vicieae*, *Cicereae*, *Aeschynomeneae* ve *Gemistae* olmak üzere beş tribusa ayrılarak incelenmektedir [21]. *Lathyrus* L. genusu da *Vicieae* tribusuna aittir ve 13 seksiyona ayrılmaktadır [4]. Tüm dünyada yayılım gösteren 152 türe sahip olan *Lathyrus* L. genusu ülkemizde de tür, alt tür ve varyete seviyesinde 76 takson ile temsil edilmekte ve 10 seksiyona ayrılmaktadır [3,22-27].

Baklagillerin bu denli önem arz etmelerinin bir diğer sebebi de sahip oldukları farklı kimyasal yapılarıdır. Örneğin baklagillerin kandaki kolesterol miktarını azaltıcı etkilerinin yanı sıra hipoglisemik etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte çeşitli baklagiller, lektinler, tripsin inhibitörleri gibi farklı bileşikler üretirler [28]. Bu tür bileşiklerin bulunması bitkinin doğal şartlar altındaki hayat döngüsünde daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır [29]. Bu tür proteinlerin önemli bir familyası olan lektinler, pek çok bitkide özellikle de *Leguminosae*'de bolca bulunan karbohidrat bağlı proteinlerdir [30]. Lektinler, alyuvarları agglutine etme bakımından antikorlara benzer olsalar da yapıları oldukça farklıdır ve onların özgüllükleri karbohidratlarıyla sınırlandırılmıştır [29]. Yapılan çalışmalarla lektinlerin etkileri ortaya konulmuştur. Örneğin lektinlerin bağırsak tümörlerinin büyümesini azalttığı bulunmuştur [31]. Valentiner ve arkadaşları ise 2003 yılında yaptıkları çalışmada *in vitro* olarak lektinlerin kanser hücrelerinin büyümesini engellediklerini göstermişlerdir [32]. Ayrıca baklagillerin, doymuş yağ asidince fakir besinlerle birlikte alınmasıyla birlikte lipid homeostazisini kontrol ettiği ve kalp damar hastalıkları riskini azalttığı belirtilmiştir [29]. Ancak bu denli faydalarının

yanında *Lathyrus* türlerinin fazla tüketimi sonucunda Lathyrism adı verilen rahatsızlık ortaya çıkmaktadır. Lathyrism'in Osteolathyrism ve Neurolathyrism şeklinde iki formu vardır. İskelet deformasyonlarına sebep olan Osteolathyrism *L. odoratus*, *L. hirsutus* ve *L. roseus* gibi türlerin tüketimiyle ortaya çıkmaktadır. Neurolathyrism ise çeşitli *Lathyrus* türlerinin ve bazı *Vicia* türlerinin tüketimiyle ortaya çıkarak kasların katılaşması ve felce sebep olan rahatsızlıktır [33].

Tablo 2.2. Çeşitli baklagil tohumlarındaki farklı proteinlerin etkileri [29]

Peptid/Protein	Baklagil tohumu	Esas aktivite	Biyolojik aktivite
7S globulin α' zinciri	Soya fasulyesi	Belirlenmedi	• LDL-reseptörlerinin düzenlenmesi • Plazma kolesterolü ve trigliserit azalması
α -amilaz inhibitörü	Çeşitli kaynaklar	α -amilaz inhibitörü	• Kilo kontrolü • Obezite • Diyabet
Conglutin γ	Lupin	Belirlenmedi	• Hipoglisemik • Kolesterolün düşürülmesi
Lektinler	Çeşitli kaynaklar	Glikozil kısım bağlanması	• Antikanserojen • Bağışıklık modülasyonu

3. TOHUM DEPO PROTEİNLERİ

Başlıca ve önemli depo materyallerinden biri olan proteinler tohum gelişiminin ikinci safhasında yüksek miktarlarda birikmeye başlar [34]. İlk gelişim esnasında zigotun bölünmeleri sonucunda globular embriyo, embriyonik eksen ve kotiledonlara farklılaşır. Bu safhada monokotillerde ve dikotillerde endosperm ve kotiledonların akibeti farklıdır. Monokotillerde endosperm başlıca depo dokusu olarak görev yaparken pek çok dikotilde ise endosperm sadece geçici olarak vardır ve kotiledonlar başlıca depolama görevini üstlenirler [35]. İkinci safhada ise hücre genişlemesi meydana gelir ki böylece embriyo büyür ve ayrıca besin rezervleri biriktirilir ve hızlı bir sentez meydana gelir. Genellikle bu periyotta birkaç gün içerisinde depo proteinlerinde hızlı bir artış meydana gelir [18]. Bundan sonraki aşamada ise dormansi için hazırlık yapılmaktadır. Tohum su içeriğinin % 90'ından fazlasını kaybederek RNA ve protein sentezine son verilir ve embriyonik dormansi başlar. Dormansi, tohum çimlenmesi esnasında depo proteinleri tüketildiği zaman sonlanır [34,36]. Baklagil tohumları da gelişimleri esnasında büyük miktarlarda protein biriktirirler. Bu proteinler ne katalitik etkiye ne de kotiledonlarda yapısal bir role sahiptirler. Depo vakuelleri ya da protein cisimciği adı verilen yapılarda biriktirilen proteinler çimlenme esnasında proteolize uğrarlar ve böylece serbest amino asit kaynağı olarak görev yaparlar. Bu tohum proteinleri “depo proteinleri” olarak isimlendirilirler [29].

Tohum proteinleri genel olarak metabolik proteinler ve depo proteinleri olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Metabolik proteinler, normal hücre metabolizmasının devamlılığından sorumludurlar [37]. Ancak son zamanlarda yapılan sınıflandırmada ise proteinler; depo, yapısal ve biyolojik olarak aktif olan proteinler şeklinde incelenmektedirler [38]. Başlıca biyolojik yönden aktif olan proteinler, lektinleri, enzimleri ve enzim inhibitörlerini içermektedir. Bu proteinler minor proteinlerdir ve amino asit kompozisyonu açısından depo proteinlerinden daha dengeli bir durumdadırlar. Diğer taraftan depo proteinleri de enzimatik olmayan proteinlerdir ve amaçları yeni bitkinin oluşumu esnasında ve çimlenme esnasında ihtiyaç duyulan proteinleri (azot ve sülfür kaynağı) sağlamaktır [18]. Tohum depo proteinleri, çözünürlük karakterlerine göre aşağıdaki şekilde dört grup altında sınıflandırılırlar [16,18,39];

1. Albuminler: suda çözünürler (1.6S-2S)
2. Globulinler: sulu tuz solüsyonunda çözünürler (7S-13S)
3. Prolaminler: alkol/su karışımında çözünürler

4. Glutelinler: çözünmeleri çok zordur; zayıf asidik, bazik ya da sulu SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) solüsyonunda çözünürler.

Albumin ve globulinler dikotillerde depo proteinleri olarak genelde fazla miktarda bulunurken, prolaminler ve glutelinler ise monokotillerdeki başlıca proteinlerdir (örneğin tahıllarda) [40]. Fide için azot kaynağı olan depo proteinleri genellikle asparajin, glutamin, arginin ve prolince zengindirler [41]. Ancak çoğunlukla 7S ve 11S globulinler olmak üzere baklagil proteinleri sülfür içeren sistein, metiyonin ve aynı zamanda triptofan amino asidi bakımından eksiktirler [18].

Tohum depo proteinleri diğer proteinlerden bazı özellikleriyle ayrılmaktadırlar. Bu özellikler aşağıda özetlenmiştir [18,42-44];

1. Bu proteinler, sadece tohumda (kotiledonda veya endospermde) sentezlenirler.
2. Depo görevleri dışında başka fonksiyonel bir aktiviteye sahip değildirler.
3. Depo proteinleri protein cisimciği ya da depo vakuolleri adı verilen özel depo organellerinde biriktirilirler ve çimlenme esnasında tüketilirler. Protein cisimciklerinin kökeni protein tipine göre farklıdır ve tür içi ve türler arasında çeşitlilik gösterebilmektedir.
4. Bütün depo proteini fraksiyonları karışık komponentlerdir ve hem ek bir genotip içerisinde ve hem de aynı türün genotipleri arasında polimorfizm gösterirler. Bu polimorfizm çoklu gen ailesinin olmasından ve de bazı durumlarda da proteolitik süreç ve glikozilasyondan kaynaklanmaktadır. Örneğin dikotil tohum globulinleri çoklu gen ailesinin ürünüdürler. Yine monokotillerdeki, örneğin mısırdaki, iyi çalışılmış olan zein proteinlerinin her biri 3-10 gene sahip olan on kadar prolamin ailesi tarafından sentezlendiği ifade edilmektedir. Tohum proteinlerinin çoklu gen aileleri muhtemelen karmaşık gen dublikasyonu serileri sonucunda meydana gelmişlerdir.

Tablo 3.1. Çözünürlüklerine göre tohum depo proteinleri ve bazı özellikleri [45]

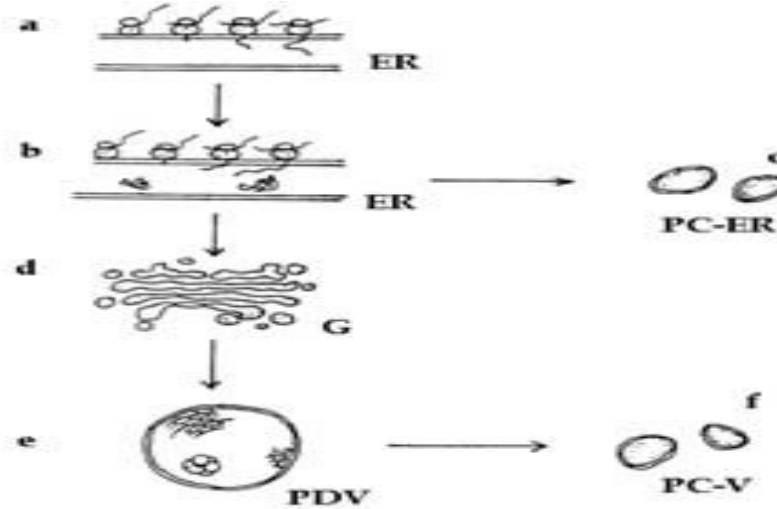
	Albuminler	11S Globulinler	7S Globulinler	Prolaminler	Glutelinler
Çözünürlük	Suda çözünürler	Tuzlu çözelti	Tuzlu çözelti	Alkolde çözünür (%) (70-90)	Zayıf asidik ya da bazik çözeltielerde
Mr	10-20.000	300-400.000	150-190.000	10-90.000	19.000-36.000
Alt ünite yapısı	Monomerler ve heterodimerler halinde	Hekzamer alt üniteleri	Trimer alt üniteleri halinde ki bunlar ayrılabilir	Monomerler veya polimerler halinde	Disülfid bağıyla bağlanmış olan asidik ya da bazik alt üniteler halinde
Glikozilasyon	Yok	Nadiren	Sıkça	Yok	Yok
Kompozisyon	Metiyonince zengin (bazı türlerde)	S-amino asitlerince eksik	S-amino asitlerince eksik	Lizince eksik	Glutamin ve prolin amino asitlerince zengin

3.1. Tohum depo proteinlerinin birikmesi ve depolanması

Depo proteinleri, başlıca embriyo ve endospermin son derece farklılaşmış hücrelerinin protein depo vakuollerinde veya doğrudan endoplazmik retikulum içinde oluşan protein cisimciklerinde biriktirilirler. Geçmişte protein cisimciği ve protein depo vakuolu terimleri birbirinin yerine kullanılmakta iken şimdilerde protein depo vakuolleri endoplazmik retikulundan kökenlenmiş olan ve depo proteinlerini taşıyan protein cisimciklerini içeren farklılaşmış vakuoller için kullanılmaktadır [46]. Mısır, pirinç gibi bazı türlerde depo proteini ihtiva eden protein cisimcikleri (prolamin ihtiva edenler) doğrudan endoplazmik retikulundan meydana gelirler. Ayrıca hem baklagiller gibi dikotil bitkilerde ve hem de pirinç ve yulaf gibi monokotiledonlardaki globulinler ise vakuollerden kökenlenmiş olan protein cisimciklerinde depolanırlarken, tahıllarda ise depo proteini birikimi (özellikle prolaminler) vakuol aracılı protein cisimciklerinde meydana gelir [42,47-51]. Pek çok yazar vakuol oluşum mekanizmasının da ER (endoplazmik retikulum)'den başladığını belirtmektedir. Böylece ER doğrudan ya da dolaylı olarak her iki tip protein cisimciği oluşumuna katkıda bulunmaktadır [52].

Olgun tohumlar, protein depo vakuollerini tamamen kaplayan yoğun şekilde paketlenmiş protein depolarına sahiptirler. Bu vakuollerdeki protein depoları, amorf veya

farklılaşmış alt alanlara sahiplerdir ki bu yapılar farklı proteinleri ihtiva ederler. Bu alt alanlar, protein matrisi, kristaloid, phytin inklüzyonları ve otofajiden kökenlenmiş olan intravakuolar keseciklerdir [46]. Örneğin 7S depo proteinleri protein depo vakuollerindeki periferal matrikste depolanırken 11S depo proteinleri ise kristaloid yapının başlıca bileşenidir [53]. Ancak bazı türlerde de 7S ve 11S proteinler protein depo vakuolleri içinde birlikte bulunmaktadırlar [46]. Bunun aksine tahılların prolamini ise büyük oligomerik yapılar halinde endoplazmik retikulumda birirmektedirler. Örneğin mısır ve pirinçte, bu proteinler endoplazmik retikulum içinde birikirken buğdayda ise proteinik yapılar endoplazmik retikulumdan kökenlenmiş olan protein cisimcikleri içerisinde depolanırlar [54-56]. Ayrıca bazı türlerde çeşitli tiplerdeki sülfürce zengin ve sülfürce fakir prolamini endoplazmik retikulum içindeki farklı protein cisimciklerinde birikme eğilimlerinden buğday gibi bazı türlerde ise sülfürce zengin ve fakir prolamini ise protein cisimciği içinde birlikte entegre olmuş haldedirler [57-58]. Pirinç bitkisiyle yapılan mRNA çeşitlenmesi olayına baktığımız zaman da benzer bir olayı görmekteyiz [55]. Li ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada prolamini ve glutelin mRNA'sının da granüllü endoplazmik retikulum polizomlarında bulunduğunu ancak prolamini transkriptlerinin prolamini ihtiva eden protein cisimciklerini kuşatan membranlarda lokalize olduklarını ve glutelin mRNA'larının ise sisternal endoplazmik retikulumdaki polizomlarla bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir [55].



Şekil 3.1. Prolamin ve glutelinlerin sentezlenmesi ve uğradıkları değişimler [18]. Glutelin ve prolamini mRNA'ları granüllü endoplazmik retikulumun (GER) farklı bölgelerinde translyasyona uğrarlar. a: N-terminal sinyal peptidi proteinin endoplazmik retikulumun (ER) lümenine geçmesini sağlar. b: Sinyal peptid daha sonra yapıdan ayrılır. Protein ise ER'den ayrılmadan önce glikozilasyon, şaperon yardımıyla katlanma, disülfid köprüsü oluşması ve oligomerizasyon gibi çeşitli değişimlere maruz kalır. c: Pirinç, mısır gibi bitkilerin prolamini doğrudan ER'den kökenlenen protein cisimciklerinde depolanırlar. d: Ancak dikotillerin globulinleri (legüminler gibi), glutelinler ve bazı tahılların prolamini golgiye taşınır. Golgide de kısa N-terminal ve C-terminal hedef sekanslarının ayrılması ve benzeri işlemler gerçekleşir. e, f: Bunlar daha sonra vakuolden kökenlenmiş olan protein cisimciklerinde depolanırlar. PC-ER: Endoplazmik retikulum kökenli protein cisimciği; PDV: Protein depo vakuölü; PC-V: Vakuolden kökenlenmiş olan protein cisimciği.

3.2. Tohum depo proteinlerinin sentezlenmesi ve uğradıkları değişimler

Tohum proteinleri, genellikle sentezlendiği bölgeden depo organeline gitmek, bir takım işlemlerden geçmek ve taşınma gibi olayları meydana getirmek için lider pre-peptid ve pro-peptid sekanslarına sahip olan öncü yapılar olarak sentezlenirler [18].

Depo proteinlerinin endoplazmik retikulum girişi translayonla birlikte meydana gelir ve bu giriş N-terminal sinyal peptid ile belirlenir ki bu yapı, gelişen polipeptidin lümene geçmesinden sonra yapıdan ayrılmaktadır [59]. Endoplazmik retikulum içindeki depo proteinleri sinyal peptidin ayrılmasından sonra glikozilasyon, disülfid izomeras katalizli disülfid bağı oluşumu, şaperonlar yardımıyla katlanmalar, oligomerizasyon ve protein cisimciklerine taşınma gibi çeşitli olaylara maruz kalırlar [18].

Depo proteini öncüllerinin propeptid segmentlerinin bazen geçici olarak glikan yan zincirleri taşıdıkları ifade edilmiş ve bunların proteinin olgunlaşması esnasında ise ayrıldıkları bazen de kalıcı olarak glikozilasyona uğradıkları tespit edilmiştir [60-62]. Örneğin vejetatif depo proteinlerinde olduğu gibi 7S (vicilin tipi globulinler) globulinlerinin de dahil olduğu çeşitli depo proteini ailesinin üyeleri translayonla eş zamanlı olarak endoplazmik retikulum içerisinde glikozile olurlar [63-65]. Farklı türlerde glikozilleşme oranları değişik olmaktadır. Şöyle ki, *Phaseolus vulgaris*'in vicilin proteini glikozilasyona uğrarken *Pisum sativum*'daki vicilin proteininin ise az bir kısmının glikozilasyona uğradığı görülmektedir [52]. Ayrıca legüminler (lupinlerden elde edilen legüminler dışında) ise genellikle glikozilasyona uğramazlar [67,68]. Yine tahıl prolamini ve glutelinlerinin de glikozilasyona uğramadıkları belirtilmektedir. Depo proteinlerinin glikozilasyona uğrayıp uğramamaları tohum depo proteinlerinin hücre içi transferinde önemli rol oynamaktadır [52]. Yapılan çalışmalarla glikozilasyonun bazı depo proteinlerinin endoplazmik retikulumdaki oligomerizasyon (phaseolin gibi), proteolitik bölünmeye karşı direnç, proteinin doğru katlanmasına destek gibi çeşitli rollerinin olduğu da tespit edilmiştir [68,69].

Disülfid köprülerinin oluşturulması da depo proteinlerinin endoplazmik retikulundan ayrılmadan önce uğradıkları bir başka değişimdir. Bakıldığı zaman çoğu 2S albuminlerin, pek çok lektinin ve bütün legüminlerin, bir (legüminler ve lektinler) veya daha fazla (2S albuminler) disülfid köprüsüyle bağlı olan α - ve β - zincirleri olarak isimlendirilen iki farklı hacimdeki polipeptidden oluştuğu görülmektedir. Zincirler arasındaki disülfid bağına ilaveten aynı zamanda zincir içinde de disülfid bağları vardır ve bunlar bu depo proteinlerinin tersiyer yapılarına katkıda bulunurlar [42,52,70]. 11S globulinlerle yapılan bir çalışmada zincirler arası disülfid köprüsünün yokluğunun hekzamer yapının oluşmasını engellediği görülmüştür [52].

Çeşitli bitkilere ait depo proteinleriyle (özellikle prolaminlerle) yapılan çalışmalar sonucunda şaperonların protein cisimciklerinde proteinlerin depolanmalarına ve katlanmalarına katkısının olduğu tespit edilmiştir [49,71]. Yapılan çalışmalarla endoplazmik retikulum proteini olan ve depo proteinlerinin birleşmesini ve katlanmasını sağlayan BIP (binding protein: bağlayıcı protein)'in pirinç prolamin zincirleri sentezlenirken bağlandığı ve bu proteinin prolamin zinciri tamamlanıncaya kadar bağlı kaldığı bulunmuştur [52]. Benzer şekilde mısırdaki endoplazmik retikulumdan kökenlenen zein ihtiva eden protein cisimciklerinin membranının alt tabakalarında yine BIP adlı proteinin bulunduğu tespit edilmiştir [72].

Tohum depo proteinlerinin ER'de maruz kaldıkları olaylardan biri de oligomerizasyondur. Pek çok yardımcı depo proteinleri gibi 7S ve 11S gibi başlıca proteinler endoplazmik retikulum lümeninde sentezlendikten kısa bir süre sonra tetramer, trimer ve dimer formlarını kazanırlar [18,73-75]. Örneğin gelişen baklagil kotiledonlarının endoplazmik retikulum lümenlerinde prolegümin ve vicilinlerin trimerize halde oldukları belirlenmiştir. Aynı şekilde hücre parçalama teknikleri de vicilin ve prolegümin trimerlerinin gelişen bezelye, soya fasulyesi gibi bitkilerin endoplazmik retikulumlarında lokalize olduklarını göstermiştir [73,76]. Yine phaseolin depo proteiniyle yapılan deney sonucunda sadece trimerize olmuş phaseolinin protein depo vakuölüne transfer olabildiği tespit edilmiştir. Trimerize olmayan proteinlerin endoplazmik retikulumda kaldığı ve parçalandığı tespit edilmiştir [77].

Tablo 3.2. Farklı depo proteinlerinin hücredeki çeşitli kompartımanlarda uğradıkları değişimler [42]

Kompartıman	Gerçekleşen olay	2S Albuminler	Prolaminler	7S Globulinler	11S Globulinler
Endoplazmik retikulum	Sinyal peptid ayrılması	+	+	+	+
	Şaperon aracılı katlanma	-	-	-	-
	S-S bağı oluşumu	-	+	-	+
	N-glikozilasyon	-	-	+	-
Golgi	Kompleks glikan eklenmesi	-	-	+	-
Vakuol	Propeptid işlenmesi (proteazlar yardımıyla asparajin bölgelerinde ayrılma)	+	-	-	+

Depo proteinleri, uğradıkları bu değişimlerden sonra transfer veziküllerine girmek için mutlaka spesifik hedef bilgisi taşınmalıdır. Çeşitli durumlarda, depo proteinlerinin sınıflandırma bilgisi depo proteini polipeptidlerinin primer yapısında gösterilmektedir. Şimdiye kadar üç farklı tipte vakuolar hedef bilgisi tespit edilmiştir. Bunların ikisi N-terminusta ya da C-terminusta yer alan kısa hedef peptidleridir ki sınırlı proteoliz sonucunda olgun polipeptidin olduğu depo vakuolüne polipeptidin varmasından sonra yapıdan ayrılmaktadır. Üçüncü durumda ise hedef bilgisi olgun polipeptidde hala var olan uzun dahili sekans uzamasının bütünlüğüne bağlıdır [52].

Tohum depo proteinlerinin pek çoğu protein depo vakuollerine transfer olduktan sonra da ilave işlemlere maruz kalırlar. Bu işlemler muhtemelen konformasyonda meydana gelen değişimlerdir ki bu şekilde proteinlerin taşınması ve etkili şekilde depolanması gerçekleşmektedir. Örneğin phaseolinde glikan yan zinciri kesilmesinin protein depo vakuollerinde meydana geldiği belirtilmiştir [68]. Yine gelişen bezelye tohumlardaki vicilinlerin bazılarının sınırlı proteolize maruz kaldıkları tespit edilmiştir. Ancak polimorfik vicilin alt ünitelerine sahip olan pek çok türde ise bu proteinlerin glikozilasyon ve sınırlı proteoliz gibi ilave işlemlere maruz kalmadan depolandıkları bulunmuştur. Muhtemelen protein depo vakuolündeki spesifik kimyasal çevre konformasyon değişimlerine katkıda bulunmakta ve bu durum proteinlerin depolanma özelliği kazanmasını sağlamaktadır [78,79]. Ayrıca prolegümin trimerlerinin α - ve β - zincirlerine ayrılması protein depo vakuollerinde meydana gelir. Prolegüminlerin α - ve β - zincirlerine ayrılması prolegümin trimerlerinin legümin heksamerlerine dönüşmesi içindir ve bu tür ayrımı göstermeyen prolegüminlerin de heksamerik yapı oluşturmadıkları ifade edilmiştir. Aynı şekilde napin benzeri 2S albuminlerin de prolegüminlerden daha fazla komplike vakuolar işlemlere maruz kaldıkları belirtilmektedir. Bu proteinler endoplazmik retikulumda sinyal peptid ayrılmasına uğradıktan sonra vakuolde sadece propeptidin ayrılması değil aynı zamanda α - ve β - zincirlerinin ve kısa C-terminal peptidi arasındaki kısa bağlayıcı peptidin ayrılması şeklindeki proteolitik işleme maruz kalırlar [52].

No	Değişimler	Alt ünite	Türler
1		Legümin benzeri 12 S globulinlerin alt üniteleri	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Glycine max</i>
		Çeşitli lektinler	<i>Pisum sativum</i> , <i>Ricinus communis</i>
		(Sinyal peptidaz, vakuolar süreç enzimi)	
2a		Zein, hordein, gliadin, prolamın, vicilin (Sinyal peptidaz)	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Pisum sativum</i>
2b		Phaseolin, vicilin (Sinyal peptidaz)	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i>
2c		Vicilin (Sinyal peptidaz, bilinmeyen enzimler)	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia faba</i>

Şekil 3.2. Tohum depo proteinlerinin uğradıkları bazı değişimler [52]

3.3. Tohum depo proteinlerinin proteolizi

Tohum depo proteinlerinin proteolizi proteazların sentezine bağlıdır. Bu görüş çeşitli baklagil kotiledonlarında ve tahılların alevron tabakalarında çalışılarak gösterilmiştir. Örneğin *Vigna radiata*'nın protein depo vakuollerindeki depo proteinlerinin parçalanmasının Cys proteaz adı verilen enzimin biyosentezine bağlı olduğu bulunmuştur. Vicilin peptidohidrolaz olarak isimlendirilen bu proteaz granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir ve stoplazmik merkezde birikmeye başlar [80]. Cys proteaza homolog SH-EP (sistein endopeptidaz) olarak adlandırılan bir diğer enzimin ise 43 kDa (kilodalton)'luk ve inaktif zimogen granülleri halinde sentezlendiği görülmüştür [81]. Toyooka ve arkadaşlarının 2000 yılında SH-EP antikorlarıyla yaptıkları çalışma sonucunda proenzim/enzim yapılarının 0.2 -0.5 µm çapındaki ER türevli granüllerde biriktikleri tespit edilmiştir [82]. *Ricinus communis* endosperminde de paralel bir çalışmayla depo proteinlerinin hidrolizinin SH-EP'a bağlı olduğu gösterilmiştir [83]. Bu bitkinin endospermelerinde SH-EP'ın sentezlenip 0.5 µm'den daha büyük çaptaki yoğun organeller halinde depolandıkları belirtilmiştir. Araştırmacılar bu organellere "Ricosom" adını vermişlerdir. Ricosomlar, görünüşte glioksizoma benzeseler de yapılan detaylı çalışmalar sonucunda farklı organellerden kökenlendikleri belirtilmiştir. Ricosomların, endoplazmik retikulum ile yakın bir bağlantısı olduğu ve ondan türevlenmiş olabileceği belirtilmiştir [80,83].

Hordeum vulgare'nin alevron hücrelerinde yapılan çalışmayla da protein depo vakuollerindeki depo proteinlerinin degradasyonunun aleurain proteaza bağlı olduğu belirtilmiştir [80]. Bu Cys proteaz enzimi de 42 kDa'luk proaleurain olarak sentezlendikten sonra uğradığı değişiklikler neticesinde 32 kDa'lık aleurain'e dönüşür [84]. Aleurain diğer Cys proteazlar gibi öncü olarak sentezlenir ve daha sonra da öncü proteaz vakuollerinin protein depo vakuollerinin birleşmesi sonucunda depo proteinlerinin degradasyonuna neden olur [80].

4. TOHUM DEPO PROTEİNİ ALT FRAKSİYONLARI

4.1. Albuminler

Albuminler, globulinlerle birlikte yaygın olarak dikotil tohumlarında bulunmaktadır. Suda çözünen albuminler, disülfid köprüsüyle bağlanan 8-12 kDa ile 3-5 kDa ağırlığındaki iki polipeptid zincirinden oluşmuştur. Çoklu gen ailesi tarafından kodlanan albuminlerin çalışmalar sonucunda çeşitli proteolitik işlemlere maruz kalan öncü proteinler olarak sentezlendikleri bulunmuştur. Bu proteolitik işlemler, sinyal peptidin ayrılması, gibi ilave amino terminal fragmentinin ayrılması ve birkaç karboksil terminal residuellerinin eliminasyonu gibi çeşitli değişikliklerdir [85]. 2S albuminler, küçük globuler proteinlerdir ve arginin, glutamin, asparagin ve çoğu kez sistein amino asitlerince zengin olmalarının yanı sıra yüksek oranda lizin ve metiyoninede sahiptirler. Ancak buna rağmen 2S albuminlerin kompozisyonlarında önemli değişiklikler vardır [86,87]. Örneğin ayçiçeğinden saflaştırılan sekiz albumin fraksiyonunda lizin % 1 ile % 10 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. Olgun proteinlerin M_r 'si ise 10.000-20.000 arasında değişmektedir [45]. Yapılan çalışmalarla başlangıçta büyük bir öncül olarak sentezlenen 2S albuminler, sinyal peptidten başka en az üç peptid parçasının yapıdan uzaklaştırılmasıyla iki alt ünite haline dönüşmektedir [88]. Ayrıca 2S albuminler, alerjenik cevap sağlamak, güçlü tripsin inhibitörü olmak, antifungal özellik göstermek gibi önemli fonksiyonel özelliklere de sahiptirler [89,90]. Başlangıçta vakuoller içinde birikmeye başlayan albuminler daha sonra protein cisimciklerinin oluşmasıyla ayrı olarak depolanırlar [90].

Albuminlerin elektroforez çalışmaları çeşitli baklagil türlerinde iyi bir şekilde araştırılmıştır. Örneğin *Lupin*'de selüloz asetat elektroforeziyle yapılan çalışmalar sonucunda *Lupinus albus* ve *Lupinus angustifolius*'ta en az beş komponent ayrılmıştır. *Lupinus luteus*'un albuminlerinin de izoelektrik noktalarına göre 4.1 ve 5.5 arasında değişen altı komponente ayrıldığı gözlenmiştir ki bunlar asidik proteinlerdir. *Lupinus albus*'un ve *Lupinus angustifolius*'un SDS-PAGE örneklerine göre de yaklaşık olarak 20 polipeptid ayrılmıştır ki bu polipeptidlerin molekül ağırlıkları 117 kDa ile 6 kDa arasında değişmektedir. Bezelyenin albumin fraksiyonları ise SDS-PAGE analizlerine göre iki büyük polipeptid sınıfı ve nispeten küçük miktarlarda olan diğer komponentlerden oluşmuştur [87].

4.2. Globulinler

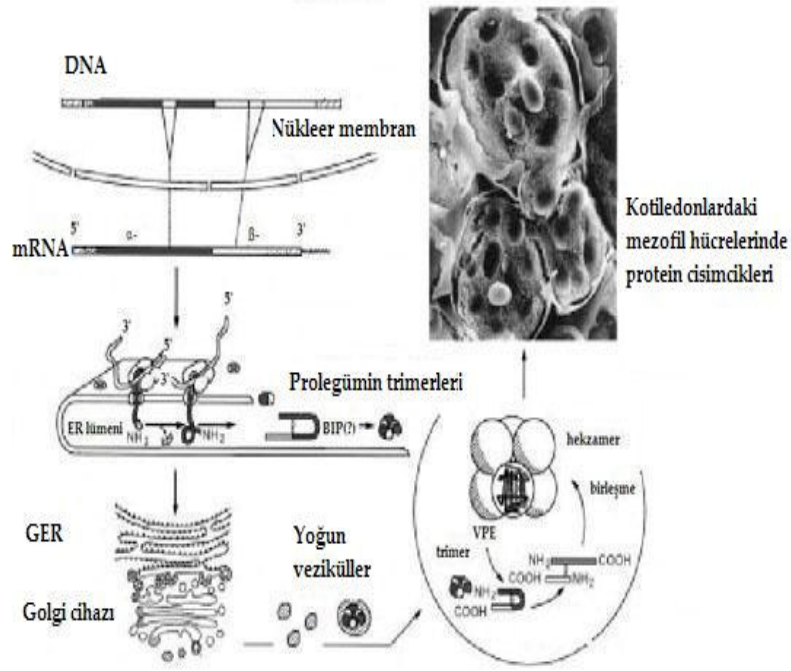
Globulinler, bitkilerde yaygın olarak bulunan depo proteinleridirler. Bunlar sadece dikotillerde değil aynı zamanda monokotillerde ve eğrelti sporlarında da bulunmaktadır [42]. *Leguminosae* familyasına ait türlerde Osborne ve Campbell 1898 yılında ilk olarak *Pisum sativum*'da sedimentasyon katsayılarına göre globulinleri vicilin ve legümin olmak üzere iki farklı protein türü olarak ayırt etmişlerdir. Benzer fraksiyonların varlığı daha sonra çeşitli baklagil türlerinin tohumlarında gösterilmiştir [40,91]. Danielson 1949 yılında çalıştığı 34 baklagil türünün tohumunda birkaç istisna dışında bütün türlerin sedimentasyon katsayılarına göre yaklaşık olarak 7S ve 11S olmak üzere iki globulin komponenti ihtiva ettiklerini bulmuştur [92]. Bu globulinler, bitki türlerine göre *Vicia faba* ve *Pisum sativum*'da vicilin ve legümin, *Vicia sativa*'da δ -vicinin, γ -vicinin, β -vicinin, α -vicinin, *Lupinus albus*'ta α -conglutin, β -conglutin ve γ -conglutin, *Glycine max*'ta conglycinin ve glycinin, *Arachis hypogea*'da conarachin ve arachin, *Lathyrus sativus*'da α -lathyrin, β -lathyrin ve γ -lathyrin olmak üzere çeşitli şekillerde isimlendirilirler [16,93]. *Lathyrus sativus*'a baktığımız zaman α -lathyrin yaklaşık olarak total globulinlerin % 80'ini oluşturmaktayken, β -lathyrin ve γ -lathyrin ise total globulinlerin sırasıyla % 14'ünü ve % 6'sını meydana getirmektedirler. γ -lathyrin, iki polipeptid zincirinden oluşmakta (20 ve 24 kDa) ve disülfid bağı bulundurmamaktadır. β -lathyrin ise farklı oranlardaki moleküler kütlelerden (14-66 kDa) oluşmuş çeşitli polipeptidleri kapsamaktadır ve yaklaşık olarak 45 kDa'luk glikozillenmiş alt üniteye iç polipeptid zincirinde disülfid bağı bulundurması dışında disülfid bağı taşımadığı bildirilmektedir. Başlıca globulin türü olan α -lathyrin ise, 50-66 kDa arasında değişen moleküler ağırlıktaki üç alt üniteye oluşmuştur ve disülfid bağı içermektedir [16].

Sedimentasyon katsayılarına göre 7S (vicilin tipi globulinler) ve 11S (legümin tipi globulinler) olmak üzere iki gruba ayrılan globulinlerin her iki grubu kısmen translasyon sonrası işlemlerden dolayı önemli varyasyonlar göstermektedirler. Ayrıca her iki grup protein, sistein ve metiyonin amino asitleri bakımından eksiktirler. Ancak 11S globulinlerde bu amino asitlerin oranları diğer tip globulinlere göre biraz daha yüksek oranda bulunmaktadır. Globulinler baklagillerde oldukça detaylı olarak çalışılmıştır [42]. Son yıllarda yapılan immunohistokimyasal çalışmalara göre vicilin tipi globulinlerin mobilizasyonunun legümin tipi globulinlere göre önce meydana geldiği ve vicilin tipi globulinlerin erken büyüme ve farklılaşma süreçleri için başta kullanılan kaynak olduğu belirtilmektedir [93].

4.2.1. Legümin tipi globulinler (11S globulinler)

Legüminler, başlıca depo protenleridirler ve pek çok baklagilde bulundukları gibi aynı zamanda diğer dikotilllerde ve bazı tahıllarda da bulunmaktadır. Legüminler, örneğin *Lupin*'lerin 12S globulinleri gibi istisnaları dışında genellikle glikozilasyona uğramamışlardır [38]. Bunlar genellikle çok sayıdaki gen ailesi tarafından şifrelenirler. Örneğin bezelyenin 11S globulinlerinin minimum 11 gen tarafından şifrelendiği bulunmuştur [15,94].

11S globulinler, translasyon sonrası çeşitli modifikasyonları içeren kompleks bir süreç sonunda sentezlenir, birikir ve protein cisimciklerinde depolanırlar [94]. Bütün legümin benzeri proteinlerin neredeyse birbirine eş olan altı alt üniteden oluştuğu bulunmuştur [95]. Her bir alt ünitenin α - ve β - polipeptid zincirlerinden oluştuğu ve bu polipeptid zincirlerinin de birbirlerine disülfid bağıyla bağlandıkları bulunmuştur. α - polipeptid zincirinin 25.000-50.000 dalton arasında asidik polipeptid olduğu β - zincirinin de yaklaşık olarak 20.000 dalton ağırlığında bazik özellikte olduğu belirtilmiştir [96]. Legümin benzeri proteinlerin α - ve β - polipeptidleri pre-propeptidler olarak sentezlenirler. İlk proteolitik olay hidrofobik olan sinyal peptidin uzaklaştırılması sırasında meydana gelerek propolipeptid yapı oluşturulur ve intramoleküler disülfid köprüleri meydana gelir [97,98]. Legüminlerin protein cisimciklerinde depolanmasından sonra ise proteolitik degradasyon ile α - ve β -zincirleri arasında S-S bağlarının oluşması sağlanır [99,100]. Olgun α - ve β - zincirlerinin oluşmasına sebep olan legümin propolipeptidlerinin proteolitik modifikasyonu sonucunda trimerik propolipeptidlerin hekzamerik yapılara dönüştükleri görülmüştür [101,102].

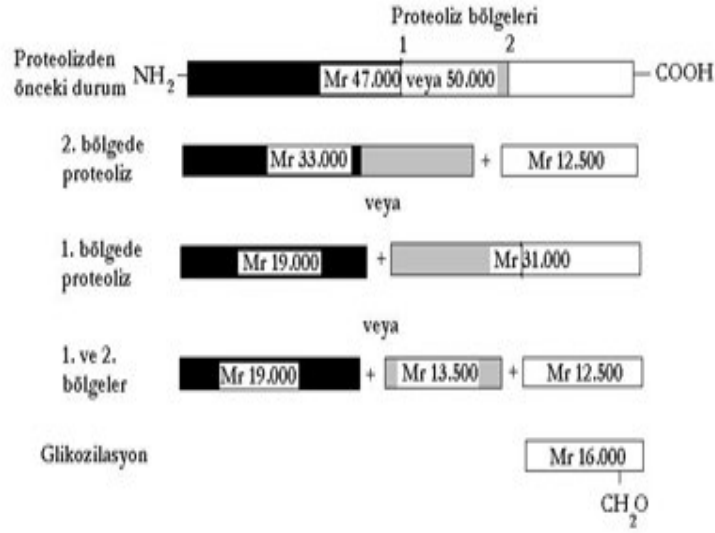


Şekil 4.1. Legüminin biyosentezi ve geçirdiği değişimler. GER; granüllü endoplazmik retikulum, BIP; bağlayıcı protein, VPE; vakuolar süreç enzimi [52]

4.2.2. Vicilin tipi globulinler (7S globulinler)

7S globulinler veya vicilin benzeri globulinlerin alt üniteleri eşit oranda glikozilasyona uğramadıklarından dolayı legümin benzeri proteinlerden çok daha heterojenik yapıdadırlar. Örneğin phaseolin farklı şekillerde glikozilasyona uğramış polipeptidlerden oluşmuştur [96].

7S globulinler, yaklaşık olarak 150 ile 190 kDa arasında olan trimerik proteinlerdir. Alt ünitelerin moleküler ağırlıkları 40 ile 80 kDa arasında değişmektedir ve vicilinler, sistein amino asidi içermediklerinden dolayı, disülfid bağı taşımazlar [103]. Vicilinlerin detaylı alt ünite kompozisyonlarına bakıldığı zaman çoklu yapısal genlerin kombinasyonları sonucunda oluştuğu ve başlıca translasyon sonrası süreçlerden dolayı (glikozilasyon, proteoliz gibi) yüksek derecede polimorfizme sahip oldukları görülmektedir. Translasyon sonrası işleme örnek olarak bezelyenin vicilin alt ünitesinin başlangıçta M_r 'si ~47.000 ve M_r 'si ~50.000 olan gruplar şeklinde sentezlemesi ve sonradan proteoliz ve glikozilasyon işlemlerinden dolayı alt ünitelerin M_r 'si ~12.500 ve 33.000 olan yapılara dönüşmelerini verebiliriz [42,43]. X ışını kristaliyografisi çalışmalarıyla çeşitli 7S globulinlerin üç boyutları belirlenmiştir. Buna göre, trimerik proteinler disk şeklinde, ~90 Å çapında ve 30-40 Å kalınlığındadırlar [42].



Şekil 4. 2. *Pisum sativum*'da vicilinin uğradığı değişimler [42]

Bununla beraber, farklı baklagil tohumlarıyla yapılan çalışmalar sonucunda vicilinlerin önemli oranda sekans homolojisi taşıdıkları ve benzer üç boyutlu yapıya sahip oldukları bulunmuştur. Legümenli bitkilerin ve diğer bitkilerin vicilin alt ünitelerinin amino asit dizileri yüksek oranda sekans benzerliği taşımaktadırlar. Vicilin sekanslarının N-terminal kısımları C-terminal kısımlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu durum vicilinlerin gen dublikasyonu sonucu oluştuğu şeklinde yorumlanmaktadır. Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları da molekülün simetrisini ortaya koymaktadır [15,42].

4.2.3. Legümin tipi ve vicilin tipi globulinlerin karşılaştırılması

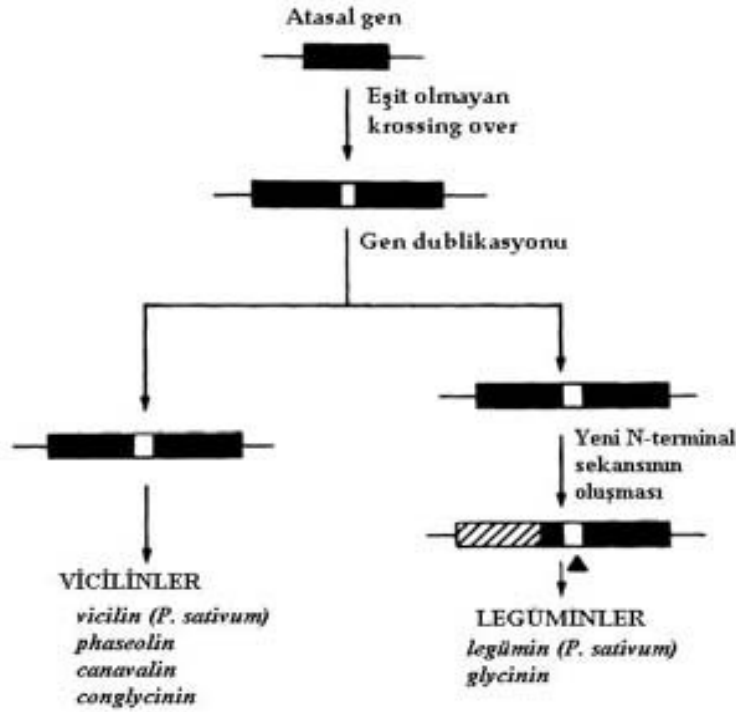
Detaylı çalışmalar sonucunda legümin ve vicilinin sentezlenmeleri, farklılaşmaları ve protein cisimciklerinde depolanmaları geniş bir şekilde araştırılmıştır. Her iki protein tipik olarak endoplazmik retikulumda preproproteinler olarak sentezlenirler, golgi vasıtasıyla taşınırlar ve daha sonra protein cisimciklerinde veya sonradan protein cisimciğine dönüşecek olan protein depo vakuollerinde depolanırlar [104]. Türler arasında ve hatta tek bir tür içerisinde bile depo proteinleri heterojen olmasına rağmen 11S ve 7S globulinlerle yapılan çalışmalar sonucunda pek çok farklı taksonun atasal formunun türleşmeden önce bu proteinlerin genlerinin ortak bir atadan kökenlendikleri moleküler ve genetik çalışmalarla gösterilmiştir [96].

7S ve 11S globulinler, hem trimerik ve hem de heksamerik yapı oluşturma yeteneklerinden dolayı benzer özelliklere sahiptirler. 7S globulinlerde olgun protein trimerik olmasına rağmen iyonik kuvvete bağlı olarak dönüşümlü agregasyona uğrayıp heksamerlere

dönüşürler [105]. Hekzamer yapıdaki 11S globulinler ise başlangıçta salgı sistemi vasıtasıyla aracı trimerler olarak taşınırlar ve birikirler [99,106]. Bu yüzden 11S ve 7S globulin alt ünitelerinin yapısal olarak birbiriyle bağlantılı olmaları şaşırtıcı değildir. Bu tür karşılaştırmada 11S legüminin C-terminal (bazik zincir) kısmının 7S vicilinlerin C-terminal bölgesiyle bağlantılı olduğu belirtilmektedir [42]. Lawrence ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada 7S globulin tipi olan phaseolinin X ışını kristal yapısını çıkartarak 7S/11S proteinleri arasındaki sekans homolojisini göstermişlerdir [107]. Aynı araştırmacılar 11S globulinlerin tersiyer yapısının 7S vicilinelere benzer olmasından dolayı 7S ve 11S globulinlerin ortak atasal proteinden kökenlendiklerini belirtmişlerdir [107].

Legümin ve vicilin arasında hem amino asit ve hem de nükleotid seviyesinde sekans benzerliği vardır [15]. Gibbs ve arkadaşları 1989 yılında yaptıkları çalışmalar sonucunda vicilin ve legümin aileleri arasında sekans benzerliği olduğunu bulmuşlardır ve şekil 4.3'te gösterilen yapıyı ortaya koymuşlardır. İlk olarak tekrarlı domainin bir kopyasını şifreleyen atasal gen ya homolog rekombinasyonla veya eşit olmayan crossing overle dublikasyona uğrar. Bu olay modern vicilin genine yapısal olarak benzeyen bir gen oluşturmakta ve bu genin dublikasyonu vicilin olarak gelişecek olan bir kopya üretmektedir [108]. *Phaseolus vulgaris* ve *Glycine max* gibi bazı türlerde vicilin proteinleri için bir gen ailesi olduğuna dair kanıtlar vardır [109,110]. Diğer türlerin proteinlerine göre tür içindeki protein sekanslarının birbirine çok yakın olmasından dolayı bunlar muhtemelen baklagil türlerinin farklılaşmasından sonra dublike olmuşlardır [108].

İkinci tip kopyanın (gen dublikasyonundan sonra) ise gelişerek legümin ailesini oluşturduğu düşünülmektedir. Gibbs ve arkadaşları, genomdaki bir başka bölgedeki sekans kaydırılmasıyla bu proteinlerin N-terminal sekanslarının türevlendiklerini belirtmişlerdir. Muhtemelen bu protein ailesinin N-terminal domaini birkaç sınırlı değişiklik geçirmiştir. Sonuçta, legümin ailesinin üyeleri tarafından sentezlenen polipeptidlerin hacminde önemli varyasyonlar görülmektedir. Bu varyasyonların pek çoğu A zincirinin uç kısmına yakın yerdeki kısa sekansların dublikasyonu ile meydana gelir. Böylece vicilinin iç tarafındaki domaini gibi legümin alt ünitesinin en az bir domaini de ortak bir öncülden kökenlenmiştir [108].



Şekil 4.3. Legümin ve vicilinlerin ortak atasal genden oluşmaları [108]

4.3. Prolaminler

Albumin ve globulinler çiçekli bitkilerde hakim durumdaki tohum depo proteinleri olmalarına rağmen prolaminler ise başlıca tahıllarda bulunan tohum depo proteinleridirler. Prolaminler alkol/su karışımında (genelde % 60-70 (v/v) etanol ve ya % 50 propan-1-ol) çözünen, glutamin ve prolin amino asitlerince zengin durumda olan depo proteinleridirler [42, 111]. Prolaminlerin moleküler ağırlıkları 10.000 ile 100.000 arasında değişmektedir. Prolaminlere bakıldığı zaman 7S ve 11/12S globulinlerden yapısal olarak oldukça farklı oldukları görülmektedir. Bununla beraber, pek çok prolamin ortak iki yapısal özellik taşımaktadır. Bu özelliklerden ilki farklı bölge veya domainlerin varlığıdır ki bunların her biri diğerinin farklı yapılarına adapte olurlar. İkinci özellik ise bir veya daha fazla kısa peptid motifine bağlı olarak tekrarlamalı bloklarda bulunan aminoasit dizisinin varlığıdır veya metiyonin gibi spesifik amino asit artışı zenginleştirilmeleridir [112]. Çeşitli tahıllardaki prolaminlerin amino asit analizleri incelemiş ve tek bir atasal gende meydana gelen dublikasyon ve mutasyonların modern tahıl varyetelerindeki çeşitliliğe sebep olduğu bulunmuştur. Özellikle cins içinde küçük amino asit sekans farklılıklarının olduğunu ve diğer tribuslar arasında ise (Örneğin *Triticeae* ve *Aveneae*) daha büyük farklılıkların olduğu bulunmuştur [111].

Amino asit dizilerine göre sülfürce zengin (S-zengin), sülfürce fakir (S-fakir) ve yüksek molekül ağırlıklı prolaminler olarak üç grup altında incelenen *Triticeae*'nin prolaminleri

kullanılarak detaylı çalışmaların sonucunda prolaminlerin muhtemelen tek bir atasal proteinden kökenlendiği ifade edilmiştir [42]. Çeşitli familyalara ait türlerin prolaminleriyle ilgili çalışmalar yapılmış ve farklı özellikler bulunmuştur. Örneğin *Sorghum*'un prolaminlerinin (kafirin) mısırdaki zeinlere benzediği ancak çözünürlük özelliği bakımından onlardan ayrıldığı belirtilmiştir. Şöyle ki bu proteinler propan-2-ol'dan daha az polar çözücü olan % 60'lık tersiyer butanol'de çözünmektedirler. Yine mısırın prolaminleri alfa, beta, gama ve delta zeinler olmak üzere dört grup altında incelenmektedir. Bunlardan alfa-zeinler başlıca prolamin fraksiyonudur fakat sistein ve metiyoninin düşük oranda olması, lizin ve triptofanın da olmaması nedeniyle besin kalitesi açısından düşük özelliktedir. Bunun aksine beta ve delta-zeinler ise sırasıyla yaklaşık olarak % 11 ve % 20'den fazla metiyonin içeriğine sahiptirler [113]. Yine pirincin prolaminlerine baktığımız zaman üç grup küçük proteinden oluştuğunu görmekteyiz. Bunların tekrarlamalı sekanslar içermedikleri birbirleriyle bağlantılı oldukları ve *Triticeae*'nin prolaminleriyle de bağlantılı oldukları tespit edilmiştir [42].

4.4. Glutelinler

Glutelinler, nötral tuz solüsyonunda çözünmeyen ancak sulandırılmış asit veya alkalın solüsyonlarında çözünebilen proteinlerdir. Bunlar, disülfid bağı ya da asidik ve bazik polipeptidlerin hidrofobik etkileşimleri sayesinde büyük makromoleküler kompleksler halinde bulunurlar [114]. Tahıllarda genellikle başlıca tohum depo proteinleri glutelinler veya prolaminlerdir. Ancak bununla beraber örneğin pirinçte glutelinler tohum depo proteinlerinin yaklaşık olarak % 80'ini oluşturmakta ve prolaminler ise % 5 oranında bulunmaktadır [115]. Bu protein iki disülfid bağıyla bağlanmış olan moleküler ağırlıkları 19-22 kDa ile 30-36 kDa olan asidik ve bazik alt ünitelerden meydana gelmişlerdir. Glutelin başta büyük öncül (57 kDa) olarak sentezlenmekte ve sonradan uğradığı işlem ile iki alt üniteye dönüşmektedir [116]. Normalde Osborne sınıflandırmasına göre albuminler, globulinler, prolaminler ve glutelinler şeklinde dört fraksiyona ayrılan tohum depo proteinleri son moleküler ve biyokimyasal analizlere göre de üç grup altında incelenmekte (albuminler, globulinler, prolaminler) glutelinler ise ya globulin tipi ve ya prolamin tipi proteinler olarak düşünülmektedirler. Aynı zamanda çözünürlükleri farklı olmasına rağmen baklagillerin globulinleriyle pek çok tahılın glutelinleri arasında benzerlikler vardır ve bunlar globulin gen ailesinin üyesidirler [117].

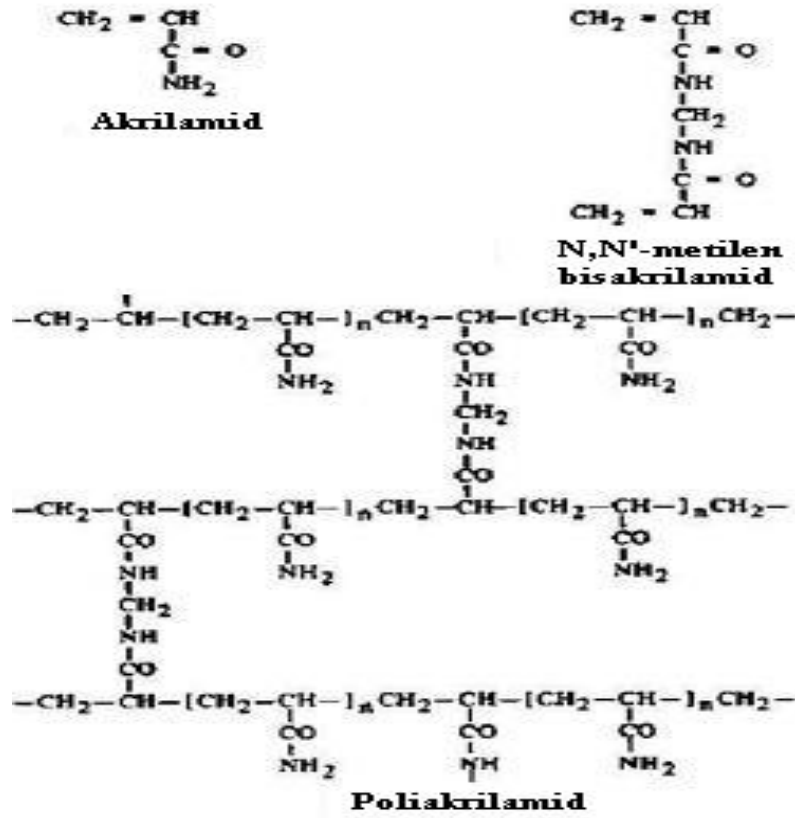
Aynı zamanda Shewry ve Tahtam adlı araştırmacılar ise 1990 yılında yaptıkları çalışmada glutelinlerin alkolde çözünmemelerine rağmen yapısal olarak prolaminlere benzer olduklarını belirtmişlerdir. Ancak yüksek M_r 'ye sahip polimerler olan glutelinler zincirler arası disülfid bağlarıyla stabil hale getirilmekte ve glutelin polimerlerinin alt ünitelerinin alkolde

çözünebildikleri görülmektedir. Ayrıca glutamin ve prolin amino asitlerince de zengin olduklarından dolayı glutelinlerin prolaminlerle benzer özellik içerisinde oldukları düşünülmektedir [70]. Fakat yapılan moleküler analizler sonucunda ise glutelinlerin primer yapısıyla baklagillerin 11S globulinleri (soya fasulyesi glycinini ve bezelye legümininin amino asit sekansları vb.) arasında homolojinin olduğu doğrulanmıştır [114]. Örneğin glutelin öncülünün amino asit dizisi soya fasulyesindeki glycinin proteininin amino asit dizisiyle mukayese edildiğinde bunların yaklaşık % 37 oranında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir [116]. Üstelik her iki protein de endoplazmik retikulumda büyük öncül olarak sentezlenirler ve daha sonradan proteolitik olarak asidik ve bazik polipeptidlere dönüşerek vakuolar kompartımanda birikip depolanırlar [114]. Ayrıca 11S globulin genlerinin iki veya üç introna sahip oldukları bulunmuş ve bunların pirinç glutelininde de tam olarak aynı pozisyonda bulundukları tespit edilmiştir [118]. Yapılan bu tür çalışmalar sonucunda pirinç glutelini ile baklagillerin 11S globulinlerinin ortak bir atadan kökenlendikleri düşünülmektedir [118]. Genetik seviyede de pirinç glutelini ile baklagillerin 11S proteinleri arasındaki benzerlik gösterilmiştir. Şöyle ki küçük çoklu gen aileleri tarafından kodlanan baklagil 11S proteinleri (soya glycinini için altı gen, bezelye legümini için sekiz gen) gibi dikkat çekecek şekilde, pirinç glutelinleri de nispeten küçük sayıda (beş ile sekiz gen kopyası) gen kopyası içermektedirler [119]. Bu açıdan küçük hacimli glutelinlerin gen ailesi önemli derecede prolamin genlerinden farklıdır ki prolaminler yüz veya daha fazla gen kopyası taşımaktadırlar ve glutelinlere göre çok daha büyük gen ailesinden oluşmaktadırlar [120,121]. Yine dikkate değer şekilde glutelinlerin ve prolaminlerin sinyal peptidlerinin primer sekansları birbirinden yapısal olarak farklıdır ki glutelin sinyal peptidi iki sistein artığı içerir ve bunlar zincir içi bağlantıdan sorumlu iken prolaminler tipik olarak bir tane içerirler [119,122].

5. PROTEİNLERİN ELEKTROFOREZİ

Elektroforez bir elektriksel alan içindeki karşı yüklü elektrodlara doğru yüklü partiküllerin hareketi temeline dayanır. Makromoleküller yüklerine, şekillerine ve hacimlerine bağlı olarak farklı mobilitelere sahiptirler [123]. Proteinler izoelektrik noktalarının (pI) üzerindeki pH değerlerinde (-) yüklüdürler ve elektriksel alanda anoda doğru göç ederler, izoelektrik noktanın altındaki noktalarda ise (+) yüklüdürler ve katoda doğru göç söz konusudur. Bu özellikleri nedeniyle protein karışımlarının ayrılmasında elektroforez yönteminden geniş çapta yararlanır. Elektroforez tekniği molekül ağırlığının belirlenmesinde, miktar tayininde, saflık kontrolünde ve oligomerik proteinlerin alt birimlerinin belirlenmesinde geniş çapta kullanılır [124]. Elektroforez için yaygın olarak agaroz (genellikle nükleik asitler için kullanılır) veya akrilamid polimerleri kullanılmaktadır [123].

Poliakrilamid jel elektroforez tekniğinde destek ortamı olan poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin çapraz bağlayıcı moleküller (N,N'-metilen-bis-akrilamid) yardımıyla kovalent olarak bağlanmasından oluşan bir polimerdir. Polimerizasyon başlatıcı olarak amonyum persülfat kullanılırken TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) ise katalizör olarak görev yapar [124]. Jeldeki porların büyüklüğü polimerizasyona giren akrilamid konsantrasyonuyla orantılıdır. Konsantrasyon arttıkça porların çapı daralmaktadır. Bu yüzden çalışılan protein molekülünün ağırlığına bağlı olarak jelin akrilamid konsantrasyonu ayarlanmaktadır [125].



Şekil 5.1. Akrilamid monomerlerinin birleşerek poliakrilamidi oluşturmaları [126]

Bu teknikte proteinleri denatüre etmek amacıyla genellikle negatif yüklü sodyum dodesil sülfat (SDS; $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{O}-\text{SO}_3^-]\text{Na}^+$) kullanılmaktadır. SDS molekülleri proteinin tersiyer ve kovalent yapısını belirleyen bütün kovalent bağları koparak proteinleri denatüre eder ve ayırım için bir faktör olan şekil elimine edilmiş olur. Örnekteki bütün proteinler böylece anyonik SO_3^- 'den dolayı negatif yüklü olurlar. Proteine bağlanacak olan SDS moleküllerinin sayısı proteinin molekül ağırlığına bağlıdır. Sonuç olarak her protein şekli hesaba katılmaksızın eşit yük yoğunluğuna sahip olur ve jel üzerinde eşit güce maruz kalır. Bununla beraber akrilamid yüksek oranda polimerize olduğundan dolayı büyük protein molekülleri küçük proteinlere göre jelde daha üst seviyede tutulurlar. Sonuç olarak proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrılmış olurlar. Ayrıca bu teknikte merkaptotanol disülfid bağlarını koparmak amacıyla kullanılmaktadır [123,127,128]. Merkaptotanol, S-S köprüleri ile birbirine tutunan protein alt birimlerini ayırmakta ve bu alt birimler sadece kovalent olmayan bağlarla bir arada tutunmaktadır [125].

6. MATERYAL-METOD

6.1. Materyalin temini

Bu çalışmada ülkemizin Doğu Anadolu, Batı Akdeniz ve Güney Ege bölgelerinde yayılış gösteren bazı *Lathyrus* L. türlerinin depo proteini alt fraksiyonlarının (albumin, globulin, prolamin ve glutelin) SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorez) tekniği ile protein band profilleri çıkarılmıştır. Çalışmada toplam altı seksiyona (*Orobos*, *Platystylis*, *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonları) ait tür, alt tür ve varyete seviyesinde toplam on yedi takson çalışılmıştır. 2004 ve 2005 yıllarında iki yaz dönemi boyunca arazi çalışması sonucunda tohum örnekleri doğal habitatlarından toplanmıştır. Çalışılan *Lathyrus* L. taksonlarının (*L. aureus* (Stev.) Brandza; *L. brachypterus* Cel. var. *brachypterus*; *L. nivalis* Hand.-Mazz; *L. digitatus* (Bieb). Fiori; *L. spathulatus* Cel; *L. boissieri* Sirj; *L. pratensis* L.; *L. laxiflorus* (Desf.) O. Kuntze. subsp. *laxiflorus* Desf.; *L. roseus* Stev.; *L. tuberosus* L.; *L. belinensis* Maxted &Goyder; *L. saxatilis* (Vent.) Vis.; *L. vinealis* Boiss.&Noe; *L. sphaericus* Retz.; *L. inconspicuus* L.; *L. tauricola* P.H.Davis; *L. setifolius* L.) lokaliteleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 6.1. Çalışılan *Lathyrus* taksonlarının alındığı lokaliteler

Türler	Flora no	Seksiyon	Lokalite	Herbaryum no
<i>Lathyrus aureus</i> (Stev.) Brandza	1	<i>Orobis</i> (L.) Gren&Godr.	C3, Isparta Yukarıgökdere köyü kasnak meşesi altı, 1020 m	1100
<i>L. brachypterus</i> Cel. var. <i>brachypterus</i>	9	<i>Platystylis</i> (Sweet) Bassler	B5, Kayseri Erciyes dağı, 1900 m	1110
<i>L. nivalis</i> Hand.-Mazz	12	“	C4, Karaman Karadağ, 1700 m	1120
<i>L. digitatus</i> (Bieb). Fiori	15	“	C3, Isparta, Eğirdir Kovada gölü kenarı, 900 m	1130
<i>L. spathulatus</i> Cel	18	“	C3, Konya Akşehir Cankurtaran köyü pinus ormanı açıklığı, 1550 m	1140
<i>L. boissieri</i> Sirj	21	“	B7, Elazığ, Harput İnceler köyü tarla içi	1150
<i>L. pratensis</i> L.	22	<i>Pratensis</i> Bassler	C3, Konya Beyşehir Gölyaka, Kubad-ı Abad Sarayı çevresi, 1230 m	1160
<i>L. laxiflorus</i> (Desf.) O. Kuntze. subsp. <i>laxiflorus</i> Desf.	24	“	C3, Isparta, Pınargözü, 1800 m	1170
<i>L. roseus</i> Stev.	26	<i>Orobon</i> Tamamsch.	C3, Isparta Aksu Yaka köyü, 1450 m	1180
<i>L. tuberosus</i> L.	27	<i>Lathyrus</i> Ser.	C3, Konya Beyşehir İliirnak köprüsü kenarı, tarla içi, 1230 m	1190
<i>L. belinensis</i> Maxted &Goyder	30a	“	C2, Antalya Olympos, 100 m	1200
<i>L. saxatilis</i> (Vent.) Vis.	31	<i>Orobastrum</i> (Taub.) Boiss.	C3, Isparta, Eğirdir Kovada gölü kenarı, 900 m	1210
<i>L. vinealis</i> Boiss.&Noe.	32	“	B7, Elazığ Sivrice, 1100 m	1220
<i>L. sphaericus</i> Retz.	33	“	C3, Isparta Aksu Hidroelektrik santrali su havuzu çevresi, 1020 m	1230
<i>L. inconspicuus</i> L.	34	“	B7, Elazığ Fırat Üniversitesi kampüsü, 1060 m	1240
<i>L. tauricola</i> P.H.Davis	35	“	C3, Isparta, Eğirdir Kovada gölü kenarı, 900 m	1250
<i>L. setifolius</i> L.	37	“	C3, Isparta, Eğirdir, Kovada gölü kenarı, 900 m	1260

6.2. Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının eldesi

Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının eldesi için Vaz ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada kullandıkları metod uygulanmıştır [117]. Çalışmada 0.5 gram tohum kullanılmış ve tohum kabukları ekstraksiyondan önce uzaklaştırılıp kotiledonlar elde edilmiştir. Daha sonra kotiledonlar su, NaCl [% 5 (w/v)], etanol [(% 75 (v/v))]ve NaOH [(% 0.25 (w/v))] çözeltileri ile muamele edilerek sırasıyla albumin, globulin A, globulin B, prolamin ve glutelinler elde edilmiştir. Her çözeltide peletler yaklaşık olarak +4 °C'de iki saat bekletilmiş ve bu süre sonunda örnekler 7.800 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar elde edilmiştir. Her bir basamakta santrifüj işleminden sonra süpernatantlar ilgili alt fraksiyonu oluştururken peletler ise bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Albumin ve globulin A'nın eldesi için süpernatant bir gece boyunca +4 °C'de 1/100 oranında distile su ile diyalize tabi tutulmuş ve bu süre sonunda örnek tekrar 7.800 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonundaki süpernatant albuminleri oluştururken 1 ml suda çözünen pelet ise globulin A'yı oluşturmuştur.

Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının elde edilmesinden sonra her bir alt fraksiyonun "Bio-Rad DC Protein Assay" kiti ile spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda miktar tayinleri yapılmıştır. Okunan absorbans değerleri Excel programı kullanılarak µg/ml türüne dönüştürülmüştür. Miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforez aşamasında jellere her bir depo proteini alt fraksiyonundan eşit oranda yüklenmiştir (albuminler için 35 µg; globulin A, globulin B ve glutelin proteinleri için ise 45 µg jellere yükleme yapılmıştır).

6.3. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezin uygulanması

Elektroforez, belirli bir pH ve iyonik kuvvet ile belirli tamponlar kullanılarak yapılır. Tamponların pH'ı ayrılacak olan moleküllerin yükünü belirler ve moleküllerin tek yönde göç etmelerini sağlar [125].

6.3.1. Poliakrilamid jellerin hazırlanması [129];

6.3.1.1. Ayırma jelinin hazırlanması (% 12);

Distile su.....	3.35 ml
1.5 M Tris-HCl (pH:8.8).....	2.5 ml
% 10 SDS.....	100 µl
Akrilamid/bis (%30).....	4 ml
Amonyum persülfat (% 10).....	75 µl
TEMED.....	15µl

Kaset haline getirilen iki cam levha arasına hazırlanan ayırma jeli, üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar bir boşluk bırakılacak şekilde aktarılır. Ayırma jelinin oluşması için ortalama 30 dakika oda sıcaklığında beklenerek akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlanır. Daha sonra da yükleme jeli hazırlanarak kasetin geri kalan kısmına ilave edilir.

6.3.1.2. Yükleme jelinin hazırlanması (% 4);

Distile su.....	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH:6.8).....	2.5 ml
% 10 SDS.....	100 µl
Akrilamid/bis (%30).....	1.3 ml
Amonyum persülfat (% 10).....	60 µl
TEMED.....	12 µl

Yükleme jeli, ayırma jeli üzerinde bulunan boşluğa iki camın en üst seviyesine kadar enjektör ile ilave edilir. Protein örneklerine yükleme kuyusu oluşturmak için kaset düzeneğine tarak yerleştirilir. Yine yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra tarak yavaşça çıkarılır.

6.3.2. Protein örneklerinin hazırlanması

Eşit hacimde protein örneği ve protein uygulama tamponu (distile su, Tris-HCl, gliserol, SDS, β-merkaptoetanol, bromophenol mavisi) ependorf tüpte karıştırıldıktan sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir [98]. Çalışmada moleküler ağırlıkları 116 kDa, 66.2 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18.4 kDa olan Fermentas marka marker kullanılmıştır.

6.3.3. Örneklerin uygulanması [124];

1. Jeli taşıyan cam levhalar elektroforez iç modülüne yerleştirildikten sonra tank içerisine (iki kaset levhası arasına da) 5x tank tamponu 5 kez sulandırıldıktan sonra ilave edilir.

5 x tank tamponu [124];	
Tris-HCl.....	0.0025 M
Glisin.....	0.192 M
SDS.....	% 0.1

2. Hazırlanan protein örnekleri ve molekül ağırlığı bilinen standart protein örnekleri yükleme jelindeki tarak dişlerinin oluşturduğu kuyulara yüklenir.

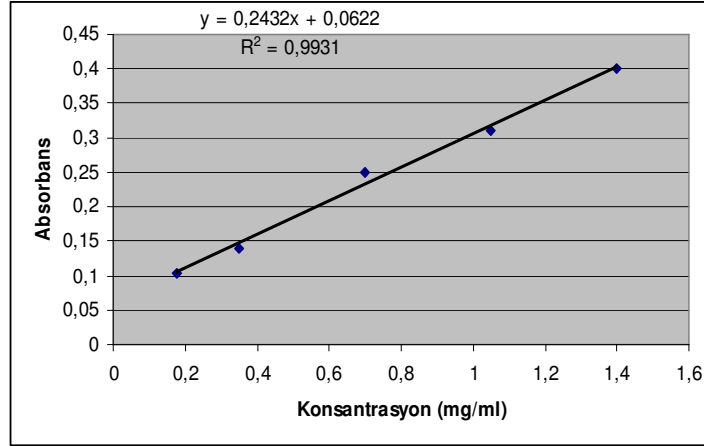
3. Sistem güç kaynağına bağlanır ve akım verilir.
4. Bromofenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0.5 cm kalana dek yürüdükten sonra işlem durdurulur ve jeller coomassie blue (% 0.1 coomassie blue R-250, % 45 methanol, % 10 asetik asit, % 45 distile su) boyasına alınarak protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanır.
5. Son olarak ise protein bantları dışındaki bantların uzaklaştırılması için jeller boya giderici solüsyona alınarak protein bantlarının net görüntüsü elde edilir. İki üç kez boya giderici solüsyon değiştirilerek jel üzerindeki protein bantlarının net görüntüsü elde edilmiş olunur.

6.3.4. İstatistiksel analizler

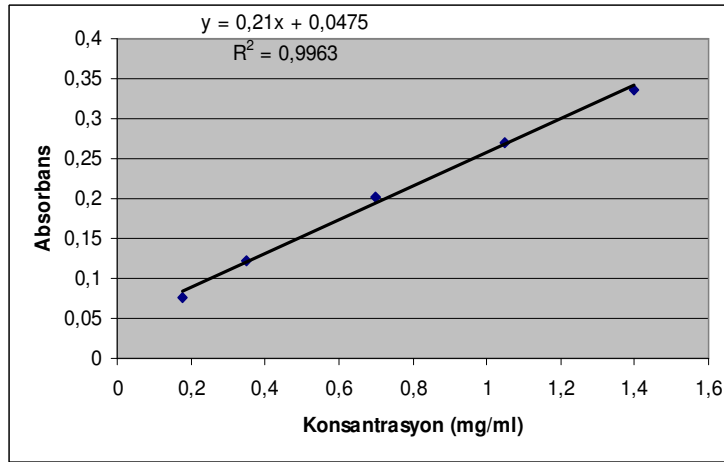
Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının elektroforetik verileri jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad, USA) kullanılarak Quantity 1-D programı ile değerlendirilmiş ve taksonlar arasındaki benzerlikleri belirlemek için oluşturulan dendogram ise UPGAMA (Unweighed Pair-Group Arithmetic Mean) metoduna göre % 4'lük tolerans ile oluşturulmuştur. Aynı zamanda taksonlar arasındaki benzerlik matrisi de Quantity 1-D (Bio-Rad) programı kullanılarak Dice katsayısına göre oluşturulmuş ve yüzde değer olarak ifade edilmiştir. Ayrıca tüm alt fraksiyonlara ait Rf değerleri kullanılarak SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0 for Windows istatistik programı yardımıyla taksonlar arasındaki genel benzerlikler ortaya çıkarılmıştır. Bunu yapmak için hiyerarşik kümeleme analizi ve Öklit uzaklığı kullanılmıştır. Ayrıca her bir tohum depo proteini alt fraksiyonunun ortalama değerleri alınarak Excel programı yardımıyla proteinlerin yüzde değerleri bulunmuştur.

7. BULGULAR

7.1. Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarını belirlemede kullanılan standartların absorbens değerleri



Şekil 7.1. *Orobos*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların depo proteinlerinin miktarlarını belirlemede kullanılan standartların absorbens değerleri



Şekil 7.2. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin depo proteinlerinin miktarlarını belirlemede kullanılan standartların absorbens değerleri

7.2. Tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarları

Çalışılan taksonların tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarları Şekil 7.1 ve şekil 7.2’de elde edilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışılan on yedi takson arasında toplamda en yüksek protein miktarının 21.271 µg/ml ile *L. tuberosus*’a ait olduğunu görmekteyiz. Ayrıca poliploid bir takson olan *L. brachypterus* var. *brachypterus* ise muhtemelen gen suskunluğundan dolayı en düşük protein miktarına sahip olan taksondur (8.711 µg/ml). Bu taksonun globulin B, prolamin ve glutelin miktarları normal değerlerde çıkmış olsa da albumin (0.891 µg/ml) ve globulin A (0.657 µg/ml) değerleri oldukça düşük çıkmıştır. Özellikle bu takson ile ilgili deneysel aşama birkaç kez tekrarlanmış olmasına rağmen albumin ve globulin A değerleri tablo 1’de verilen değerler civarında çıkmıştır.

Platystylis seksiyonunun çalışılan taksonları arasında en yüksek protein miktarının *L. digitatus*’a ait olduğunu görmekteyiz (18.012 µg/ml). Yine *Orobastrum* seksiyonunun çalışılan türleri arasında ise *L. tauricola* 19.511 µg/ml ile en yüksek protein miktarına sahiptir. Endemik bir tür olan *L. belinensis*’in de özellikle albumin (2.930 µg/ml) globulin A (7.983 µg/ml) ve glutelin (3.311 µg/ml) miktarlarının yüksek olduğunu görmekteyiz. Ayrıca *Orobis* seksiyonunun çalışılan tek üyesi olan *L. aureus* çalışmadaki on yedi takson arasında *L. boissieri*’den sonra en yüksek albumin (3.070 µg/ml) miktarına sahip olan tür olarak göze çarpmaktadır. Bu tür aynı zamanda en yüksek prolamin (0,632 µg/ml) içeriğine sahiptir. Yine çalışılan taksonlar arasındaki toplam globulin (globulin A ve globulin B) miktarına baktığımız zaman *Lathyrus* seksiyonunun çalışılan iki türü (*L. tuberosus* ve *L. belinensis*) ile *Orobastrum* seksiyonunun çalışılan altı türünün (*L. saxatilis*, *L. vinealis*, *L. sphaericus*, *L. inconspicuus*, *L. tauricola* ve *L. setifolius*) çalışılan diğer türlere göre daha yüksek oranda globulin miktarına sahip olduklarını görmekteyiz. Genellikle *Platystylis* seksiyonunun çalışılan taksonlarının globulin A miktarları nispeten yüksek olsa da bu taksonların globulin B miktarlarının diğer taksonlara oranla kısmen daha düşük olduğunu görmekteyiz. Aynı zamanda çalışmadaki on yedi takson arasında toplamda en yüksek globulin miktarının 12.966 µg/ml ile *Orobastrum* seksiyonunun üyesi olan *L. tauricola*’ya ve en düşük globulin miktarlarının ise *Platystylis* seksiyonunun üyeleri olan *L. brachypterus* var. *brachypterus*’a (4.678 µg/ml) ve *L. boissieri*’ye (8.546 µg/ml) ait olduğu bulunmuştur. Taksonlar arasındaki glutelin miktarlarına baktığımızda on yedi takson arasında en yüksek miktara *L. tuberosus*’un (5.740 µg/ml) ve en düşük glutelin miktarına ise *L. boissieri*’nin (2.227 µg/ml) sahip olduğunu görmekteyiz (tablo 7.1).

Tablo 7.1. *Orobis, Platystylis, Pratensis, Orobon, Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait çalışılan taksonların tohum depo proteini alt fraksiyonlarının miktarları

Takson	Tohum depo proteini alt fraksiyonları (µg/ml)				
	Albumin	Globulin A	Globulin B	Prolamin	Glutelin
<i>Lathyrus aureus</i> (Stev.) Brandza	3.070	6.528	4.476	0.632	2.643
<i>L. brachypterus</i> Cel. var. <i>brachypterus</i>	0.891	0.657	3.971	0.270	2.922
<i>L. nivalis</i> Hand.-Mazz	2.001	4.810	5.640	0.208	4.291
<i>L. digitatus</i> (Bieb.) Fiori	2.190	7.174	5.159	0.365	3.124
<i>L. spathulatus</i> Cel	2.042	6.043	3.609	0.295	2.774
<i>L. boissieri</i> Sirj	3.370	4.921	3.625	0.607	2.227
<i>L. pratensis</i> L.	2.342	7.129	3.679	0.533	2.499
<i>L. laxiflorus</i> (Desf.) O. Kuntze. subsp. <i>laxiflorus</i> Desf.	2.606	6.989	4.180	0.389	3.235
<i>L. roseus</i> Stev.	2.016	3.445	7.678	0.421	5.740
<i>L. tuberosus</i> L.	2.202	5.464	7.230	0.502	5.873
<i>L. belinensis</i> Maxted & Goyder	2.930	7.983	3.588	0.440	3.311
<i>L. saxatilis</i> (Vent) Vis.	2.511	6.240	5.930	0.369	3.628
<i>L. vinealis</i> Boiss.&Noe.	2.721	6.573	5.402	0.283	4.478
<i>L. sphaericus</i> Retz.	2.497	5.083	6.807	0.297	3.326
<i>L. inconspicuus</i> L.	2.345	8.164	4.802	0.521	3.145
<i>L. tauricola</i> P.H.Davis	2.888	8.269	4.426	0.345	3.583
<i>L. setifolius</i> L.	2.192	6.350	5.916	0.183	3.854

7.3. Benzerlik matrisi

Taksonlar arasındaki benzerlik matrisi Quantity 1-D programında Dice katsayısı kullanılarak yüzde olarak hesaplanmıştır. Her bir alt fraksiyona ait benzerlik matrisi aşağıda tablo şeklinde verilmiştir.

Tablo 7.2. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.aureus</i>	<i>L.nivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
<i>L.aureus</i>	100.0	32.0	35.9	46.6	32.3	46.3	29.5
<i>L.nivalis</i>	32.0	100.0	38.7	51.5	38.9	29.5	33.0
<i>L.digitatus</i>	35.9	38.7	100.0	38.4	41.3	36.8	28.4
<i>L.spathulatus</i>	46.6	51.5	38.4	100.0	36.5	30.5	24.2
<i>L.boissieri</i>	32.3	38.9	41.3	36.5	100.0	35.8	28.1
<i>L.pratensis</i>	46.3	29.5	36.8	30.5	35.8	100.0	57.8
<i>L.laxiflorus</i>	29.5	33.0	28.4	24.2	28.1	57.8	100.0

Orobis, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait çalışılan taksonların albumin örneklerinin benzerlik matrisine baktığımız zaman taksonlar arasındaki en yüksek benzerliğin *L. pratensis* ile *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* arasında olduğunu görmekteyiz (% 57.8). *Platystylis* seksiyonunun çalışılan taksonları arasında albumin proteinlerine göre en yüksek benzerliğin ise *L. digitatus* ile *L. boissieri* (% 41.3) arasında olduğunu görmekteyiz. *Platystylis* seksiyonunun çalışılan türleri arasındaki en düşük benzerlik ise % 36.5 oranı ile *L. boissieri* ile *L. spathulatus* arasında görülmektedir. Çalışılan yedi takson arasındaki en düşük benzerlik ise % 24.2 ile *L. spathulatus* ile *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* arasındadır. *Orobis* seksiyonunun çalışılan tek üyesi olan *L. aureus*'un en çok benzerlik gösterdiği tür % 46.6 ile *L. spathulatus* olurken en az benzerlik gösterdiği takson ise *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (% 29.5) olmuştur (tablo 7.2).

Tablo 7.3. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.aureus</i>	<i>L.nivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
<i>L.aureus</i>	100.0	26.9	10.7	23.4	12.3	9.9	22.2
<i>L.nivalis</i>	26.9	100.0	27.7	41.7	18.0	10.2	14.7
<i>L.digitatus</i>	10.7	27.7	100.0	31.5	37.4	20.8	20.5
<i>L.spathulatus</i>	23.4	41.7	31.5	100.0	29.4	6.3	11.4
<i>L.boissieri</i>	12.3	18.0	37.4	29.4	100.0	17.8	21.1
<i>L.pratensis</i>	9.9	10.2	20.8	6.3	17.8	100.0	68.5
<i>L.laxiflorus</i>	22.2	14.7	20.5	11.4	21.1	68.5	100.0

Aynı seksiyonların globulin A proteinlerinin benzerlik matrisini incelediğimizde en yüksek benzerliğin albumin proteinlerinde olduğu gibi *L. pratensis* ile *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* arasında olduğunu görmekteyiz (% 68.5). En düşük benzerliğin ise *L. spathulatus* ile *L. pratensis* arasında olduğu görülmektedir (% 6.3). *Platystylis* seksiyonunun çalışılan üyeleri arasında da en yüksek benzerliğin % 41.7 oranı ile *L. nivalis* ile *L. spathulatus* arasında ve en düşük benzerliğin ise % 18.0 oranı ile *L. nivalis* ile *L. boissieri* arasında olduğunu görmekteyiz. *L. aureus* ise en yüksek benzerliği *L. nivalis* (% 26.9) ile gösterirken en düşük benzerliği ise % 9.9 oranı ile *L. pratensis* ile göstermektedir. Ancak *L. aureus*, *Pratensis* seksiyonunun çalışmadaki diğer üyesi *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ile nispeten yüksek oranda benzerdir (% 22.2). Genelde globulin A örneklerine göre *Platystylis* seksiyonunun çalışılan taksonlarının benzerlik matrisine baktığımız zaman çalışılan diğer üç taksonla düşük oranda benzerlik gösterdiklerini görmekteyiz (tablo 7.3).

Tablo 7.4. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.aureus</i>	<i>L.brachypterus</i>	<i>L.nivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
<i>L.aureus</i>	100.0	32.4	16.7	30.6	28.6	20.5	24.6	23.9
<i>L.brachypterus</i>	32.4	100.0	41.2	61.0	39.5	50.8	27.0	36.1
<i>L.nivalis</i>	16.7	41.2	100.0	54.7	24.1	50.0	33.5	34.9
<i>L.digitatus</i>	30.6	61.0	54.7	100.0	45.8	47.7	22.4	39.5
<i>L.spathulatus</i>	28.6	39.5	24.1	45.8	100.0	30.1	22.2	25.4
<i>L.boissieri</i>	20.5	50.8	50.0	47.7	30.1	100.0	35.7	41.6
<i>L.pratensis</i>	24.6	27.0	33.5	22.4	22.2	35.7	100.0	59.6
<i>L.laxiflorus</i>	23.9	36.1	34.9	39.5	25.4	41.6	59.6	100.0

Globulin B örneklerine göre oluşturulan benzerlik matrisini incelediğimiz zaman *Platystylis* seksiyonunun üyelerinin globulin A örneklerine göre daha yüksek oranda benzerlik

gösterdiklerini görmekteyiz. % 61.0 oranı ile en yüksek benzerlik *L. brachypterus* var. *brachypterus* ile *L. digitatus* arasında iken en düşük benzerlik oranı ise *L. nivalis* ile *L. spathulatus* arasındadır (% 24.1). *Pratensis* seksiyonunun iki üyesi (*L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*) arasında albumin ve globulin A örneklerinde olduğu gibi yüksek oranda benzerlik gözlenmektedir (%59.6). Bu iki taksondan *L. pratensis* en düşük benzerliği *L. spathulatus* ile (% 22.2) *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* ise *L. aureus* (% 23.9) ile göstermektedir. *L. aureus* ise en yüksek benzerliği % 32.4 ile *L. brachypterus* var. *brachypterus* ile sergilemektedir (tablo 7.4).

Tablo 7.5. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.aureus</i>	<i>L.brachypterus</i>	<i>L.nivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
<i>L.aureus</i>	100.0	31.5	44.8	22.2	26.2	29.2	38.4	26.3
<i>L.brachypterus</i>	31.5	100.0	54.9	38.1	46.5	42.2	39.4	35.9
<i>L.nivalis</i>	44.8	54.9	100.0	42.5	49.3	53.2	51.2	40.3
<i>L.digitatus</i>	22.2	38.1	42.5	100.0	49.5	38.1	43.4	29.8
<i>L.spathulatus</i>	26.2	46.5	49.3	49.5	100.0	48.8	41.3	43.4
<i>L.boissieri</i>	29.2	42.2	53.2	38.1	48.8	100.0	48.7	45.7
<i>L.pratensis</i>	38.4	39.4	51.2	43.4	41.3	48.7	100.0	50.9
<i>L.laxiflorus</i>	26.3	35.9	40.3	29.8	43.4	45.7	50.9	100.0

Orobis, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait çalışılan taksonların glutelin örneklerine baktığımız zaman en yüksek benzerliğin *L. brachypterus* var. *brachypterus* ile *L. nivalis* arasında olduğunu görmekteyiz (% 54.9). Globulin B örneklerinin aksine *L. brachypterus* var. *brachypterus*, *L. digitatus* ile daha düşük oranda benzerlik göstermektedir (% 38.1). Taksonlar arasındaki en düşük benzerlik ise % 22.2 oranı ile *L. digitatus* ile *L. aureus* arasında görülmektedir. *L. aureus* en yüksek benzerliği ise *L. nivalis* ile göstermektedir (% 44.8). Ayrıca *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'un glutelin örneklerinin benzerlik oranları globulin A ve globulin B örneklerine göre daha düşük oranda kalmaktadır. *Platystylis* seksiyonunun üyeleri arasında ise en düşük benzerlik % 38.1 oranı ile *L. boissieri* ile *L. digitatus* arasında görülmektedir (tablo 7.5).

Tablo 7.6. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
<i>L.roseus</i>	100.0	30.1	36.8	25.7	24.9	23.6	39.5	28.6	21.1
<i>L.tuberosus</i>	30.1	100.0	45.4	31.7	29.4	11.3	14.5	17.2	35.7
<i>L.belinensis</i>	36.8	45.4	100.0	35.2	22.1	29.0	32.8	14.3	24.4
<i>L.saxatilis</i>	25.7	31.7	35.2	100.0	40.5	21.0	35.9	13.8	23.7
<i>L.vinealis</i>	24.9	29.4	22.1	40.5	100.0	42.0	43.5	29.9	38.5
<i>L.sphaericus</i>	23.6	11.3	29.0	21.0	42.0	100.0	26.8	22.6	20.8
<i>L.inconspicuus</i>	39.5	14.5	32.8	35.9	43.5	26.8	100.0	37.6	34.2
<i>L.tauricola</i>	28.6	17.2	14.3	13.8	29.9	22.6	37.6	100.0	52.2
<i>L.setifolius</i>	21.1	35.7	24.4	23.7	38.5	20.8	34.2	52.2	100.0

Orobon, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait çalışılan dokuz tür arasında albumin örneklerine göre en yüksek benzerliği *Orobastrum* seksiyonunun iki türü olan *L. tauricola* ve *L. setifolius* göstermektedir (% 52.2). Bu türler arasındaki en az benzerlik ise *L. tuberosus* ile *L. sphaericus* arasında görülmektedir (% 11.3). *Orobastrum* seksiyonunda yer alan ve sistematik pozisyonu şüpheli olan *L. saxatilis* en yüksek benzerliği % 40.5 oranı ile aynı seksiyondaki *L. vinealis* ile gösterirken en düşük benzerliği ise aynı seksiyonda yer alan *L. tauricola* ile göstermektedir (% 13.8). *Orobon* seksiyonunun çalışılan tek üyesi olan *L. roseus* albumin örneklerine göre en yüksek benzerliği % 39.5 ile *Orobastrum* seksiyonundaki *L. inconspicuus* ile gösterirken en düşük benzerliği ise % 21.1 oranı ile yine aynı seksiyondaki *L. setifolius* ile göstermektedir [3]. *Lathyrus* seksiyonunun çalışılan iki üyesi olan *L. tuberosus* ile *L. belinensis* arasında ise % 45.4 oranında benzerlik görülmektedir (tablo 7.6).

Tablo 7.7. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
<i>L.roseus</i>	100.0	40.2	20.7	27.6	26.8	25.6	16.9	24.3	35.4
<i>L.tuberosus</i>	40.2	100.0	48.8	37.2	30.7	22.8	21.8	22.9	18.9
<i>L.belinensis</i>	20.7	48.8	100.0	28.9	22.1	41.7	25.6	24.2	23.9
<i>L.saxatilis</i>	27.6	37.2	28.9	100.0	35.5	34.4	45.1	20.8	23.1
<i>L.vinealis</i>	26.8	30.7	22.1	35.5	100.0	24.9	38.4	36.3	23.9
<i>L.sphaericus</i>	25.6	22.8	41.7	34.4	24.9	100.0	27.3	31.0	46.8
<i>L.inconspicuus</i>	16.9	21.8	25.6	45.1	38.4	27.3	100.0	43.7	27.5
<i>L.tauricola</i>	24.3	22.9	24.2	20.8	36.3	31.0	43.7	100.0	50.9
<i>L.setifolius</i>	35.4	18.9	23.9	23.1	23.9	46.8	27.5	50.9	100.0

Globulin A örneklerine göre en yüksek benzerlik % 50.9 oranı ile *Orobastrum* seksiyonunun üyeleri olan *L. tauricola* ile *L. setifolius* arasında görülürken türler arasındaki en düşük benzerlik ise sistematik açıdan problemli olan *L. roseus* ile *L. inconspicuus* arasında görülmektedir (% 16.9). *L. roseus* en yüksek benzerliği ise % 40.2 oranı *L. tuberosus* ile göstermektedir. *Orobastrum* seksiyonunun çalışılan türleri arasında en düşük benzerlik ise % 20.8 oranı ile *L. saxatilis* ile *L. tauricola* arasında görülmektedir. *L. saxatilis* en yüksek benzerliği ise *L. inconspicuus* ile göstermektedir (% 45.1). *Lathyrus* seksiyonunun iki üyesi olan *L. tuberosus* ile *L. belinensis* arasında ise % 48.8 oranında bir benzerlik vardır (tablo 7.7).

Tablo 7.8. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
<i>L.roseus</i>	100.0	47.7	37.7	35.0	21.1	14.7	24.4	27.2	18.1
<i>L.tuberosus</i>	47.7	100.0	38.5	37.2	33.4	35.4	37.3	30.3	14.4
<i>L.belinensis</i>	37.7	38.5	100.0	23.7	32.3	22.5	25.8	19.7	30.1
<i>L.saxatilis</i>	35.0	37.2	23.7	100.0	40.0	41.0	27.3	25.6	24.1
<i>L.vinealis</i>	21.1	33.4	32.3	40.0	100.0	45.2	35.1	16.4	36.4
<i>L.sphaericus</i>	14.7	35.4	22.5	41.0	45.2	100.0	33.3	37.8	27.3
<i>L.inconspicuus</i>	24.4	37.3	25.8	27.3	35.1	33.3	100.0	41.3	35.8
<i>L.tauricola</i>	27.2	30.3	19.7	25.6	16.4	37.8	41.3	100.0	38.5
<i>L.setifolius</i>	18.1	14.4	30.1	24.1	36.4	27.3	35.8	38.5	100.0

Globulin B örneklerine göre ise çalışılan türler arasında en yüksek benzerlik *L. roseus* ile *L. tuberosus* (% 47.7) arasında görülürken en düşük benzerlik ise % 14.4 ile *L. tuberosus* ile *L. setifolius* arasında gözlenmektedir. *L. tuberosus*'un *Lathyrus* seksiyonunun diğer üyesi olan *L. belinensis* ile benzerlik oranı ise % 38.5'tir. *L. roseus*'un en düşük benzerlik gösterdiği tür ise

% 14.7 oranı ile *L. sphaericus*'tur. *Orobastrum* seksiyonunun üyeleri arasındaki en yüksek benzerliği % 45.2 oranı ile *L. vinealis* ile *L. sphaericus* gösterirken bu türler arasındaki en düşük benzerlik ise *L. tauricola* ile *L. vinealis* arasında görülmektedir (% 16.4). Sistematik açıdan problemli olan *L. saxatilis* üyesi olduğu *Orobastrum* seksiyonunun diğer elemanları arasında en yüksek benzerliği % 41.0 oranında *L. sphaericus* ile gösterirken en düşük benzerliği ise % 24.1 oranı ile *L. setifolius* ile göstermektedir (tablo 7.8).

Tablo 7.9. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin örneklerinin benzerlik matrisi

	<i>L. roseus</i>	<i>L. tuberosus</i>	<i>L. belinensis</i>	<i>L. saxatilis</i>	<i>L. vinealis</i>	<i>L. sphaericus</i>	<i>L. inconspicuus</i>	<i>L. tauricola</i>	<i>L. setifolius</i>
<i>L. roseus</i>	100.0	33.6	37.3	25.5	21.8	28.6	35.5	21.0	28.2
<i>L. tuberosus</i>	33.6	100.0	45.0	20.6	34.4	23.9	35.8	37.2	41.1
<i>L. belinensis</i>	37.3	45.0	100.0	30.0	35.6	38.6	42.1	31.9	24.1
<i>L. saxatilis</i>	25.5	20.6	30.0	100.0	41.3	49.2	40.7	46.0	26.4
<i>L. vinealis</i>	21.8	34.4	35.6	41.3	100.0	32.2	32.5	45.1	32.5
<i>L. sphaericus</i>	28.6	23.9	38.6	49.2	32.2	100.0	37.0	37.9	26.7
<i>L. inconspicuus</i>	35.5	35.8	42.1	40.7	32.5	37.0	100.0	46.3	44.6
<i>L. tauricola</i>	21.0	37.2	31.9	46.0	45.1	37.9	46.3	100.0	56.9
<i>L. setifolius</i>	28.2	41.1	24.1	26.4	32.5	26.7	44.6	56.9	100.0

Orobon, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait çalışılan türlerin glutelin proteinlerine göre oluşturulan benzerlik matrisine baktığımız zaman en yüksek benzerliğin albumin ve globulin A örneklerinde olduğu gibi *L. tauricola* ile *L. setifolius* arasında olduğunu görmekteyiz (% 56.9). Türler arasındaki en düşük benzerlik ise % 20.6 oranı ile *L. saxatilis* ve *L. tuberosus* arasında görülmektedir. *L. saxatilis*'in en yüksek benzerlik oranına sahip olduğu tür ise globulin B proteinlerinde olduğu gibi % 49.2 oranı ile *L. sphaericus*'tur. Sistematik açıdan problemli olan *L. roseus* en yüksek benzerliği % 37.3 oranı ile *L. belinensis* ile gösterirken en düşük benzerliği ise *L. tauricola* ile göstermektedir (% 21.0). *Orobastrum* seksiyonunun türleri arasındaki en düşük benzerlik ise % 26.4 oranı ile *L. saxatilis* ile *L. setifolius* arasında görülmektedir (tablo 7.9).

7.4. Türlerle ait Rf değerleri

Tablo 7.10. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin proteinlerinin Rf değerleri

<i>L. aureus</i>	<i>L. nivalis</i>	<i>L. digitatus</i>	<i>L. spathulatus</i>	<i>L. boissieri</i>	<i>L. pratensis</i>	<i>L. laxiflorus</i>
0,077	0,028	0,03	0,039	0,034	0,032	0,032
0,108	0,052	0,077	0,086	0,071	0,095	0,082
0,155	0,082	0,12	0,125	0,108	0,146	0,133
0,213	0,127	0,174	0,161	0,153	0,185	0,183
0,32	0,168	0,224	0,196	0,204	0,254	0,252
0,378	0,211	0,286	0,239	0,297	0,301	0,303
0,428	0,249	0,346	0,292	0,344	0,34	0,338
0,449	0,301	0,428	0,348	0,413	0,398	0,402
0,495	0,351	0,471	0,378	0,467	0,445	0,439
0,531	0,411	0,499	0,424	0,514	0,486	0,488
0,602	0,454	0,544	0,495	0,555	0,525	0,531
0,654	0,508	0,583	0,531	0,585	0,591	0,578
0,708	0,529	0,645	0,559	0,634	0,637	0,634
0,761	0,574	0,69	0,63	0,684	0,675	0,671
0,817	0,637	0,74	0,66	0,74	0,718	0,71
0,873	0,665	0,772	0,692	0,787	0,761	0,761
0,942	0,686	0,796	0,742	0,817	0,83	0,83
1	0,733	0,819	0,796	0,837	0,862	0,865
	0,761	0,867	0,822	0,888	0,918	0,91
	0,8	0,94	0,858	0,929	0,994	0,991
	0,828	0,998	0,91	0,994		
	0,877		0,994			
	0,92					
	0,998					

Tablo 7.11. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A proteinlerinin Rf değerleri

<i>Laureus</i>	<i>Lnivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
0,082	0,062	0,065	0,065	0,058	0,032	0,032
0,234	0,108	0,099	0,103	0,101	0,075	0,065
0,295	0,125	0,172	0,138	0,125	0,133	0,116
0,366	0,148	0,239	0,17	0,174	0,189	0,191
0,396	0,196	0,267	0,206	0,224	0,228	0,252
0,454	0,245	0,327	0,269	0,256	0,282	0,312
0,495	0,318	0,359	0,329	0,299	0,327	0,361
0,546	0,361	0,394	0,389	0,335	0,366	0,43
0,598	0,417	0,449	0,449	0,406	0,434	0,471
0,628	0,465	0,482	0,492	0,462	0,482	0,52
0,677	0,486	0,505	0,557	0,559	0,508	0,566
0,731	0,51	0,553	0,624	0,634	0,574	0,619
0,785	0,559	0,611	0,716	0,66	0,624	0,66
0,809	0,626	0,658	0,763	0,727	0,656	0,688
0,854	0,662	0,705	0,832	0,753	0,677	0,742
0,884	0,751	0,731	0,886	0,802	0,729	0,8
0,923	0,837	0,768	0,899	0,862	0,794	0,852
0,955	0,871	0,817	0,948	0,938	0,841	0,886
1	0,908	0,841	1	1	0,875	0,923
	0,955	0,895			0,931	0,989
	1	0,951			0,994	

Tablo 7.12. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerinin Rf değerleri

<i>L.aureus</i>	<i>L.brachyterus</i>	<i>L.nivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
0,118	0,072	0,045	0,049	0,04	0,029	0,034	0,036
0,165	0,11	0,08	0,085	0,067	0,056	0,054	0,058
0,222	0,161	0,11	0,101	0,094	0,081	0,103	0,11
0,26	0,188	0,152	0,127	0,123	0,105	0,146	0,146
0,307	0,23	0,186	0,161	0,159	0,137	0,203	0,192
0,344	0,271	0,206	0,195	0,204	0,161	0,239	0,233
0,365	0,311	0,269	0,233	0,233	0,19	0,255	0,255
0,394	0,336	0,302	0,26	0,262	0,233	0,28	0,295
0,42	0,362	0,34	0,302	0,297	0,271	0,331	0,342
0,468	0,382	0,416	0,335	0,32	0,295	0,369	0,36
0,49	0,403	0,438	0,369	0,371	0,342	0,385	0,387
0,537	0,425	0,494	0,396	0,383	0,391	0,443	0,439
0,588	0,459	0,533	0,423	0,42	0,416	0,479	0,472
0,662	0,49	0,562	0,476	0,459	0,447	0,501	0,492
0,682	0,515	0,599	0,508	0,506	0,485	0,523	0,521
0,72	0,555	0,633	0,561	0,521	0,541	0,57	0,566
0,741	0,608	0,653	0,59	0,562	0,582	0,599	0,604
0,77	0,656	0,691	0,66	0,58	0,618	0,631	0,638
0,79	0,687	0,718	0,684	0,658	0,66	0,653	0,665
0,826	0,718	0,747	0,745	0,698	0,662	0,711	0,711
0,848	0,754	0,769	0,81	0,718	0,705	0,732	0,749
0,91	0,776	0,812	0,866	0,754	0,725	0,765	0,772
	0,796	0,852	0,917	0,783	0,752	0,817	0,792
	0,83	0,881	0,955	0,821	0,781	0,859	0,857
	0,861	0,924	1	0,855	0,843	0,953	0,953
	0,882	0,96		0,91	0,908	0,996	0,996
	0,924	1		0,942	0,955		
	0,957						
	1						

Tablo 7.13. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin proteinlerinin Rf değerleri

<i>L.aureus</i>	<i>L.brachypterus</i>	<i>L.nivalis</i>	<i>L.digitatus</i>	<i>L.spathulatus</i>	<i>L.boissieri</i>	<i>L.pratensis</i>	<i>L.laxiflorus</i>
0,166	0,099	0,093	0,066	0,062	0,055	0,112	0,108
0,208	0,179	0,148	0,119	0,102	0,174	0,143	0,135
0,249	0,194	0,201	0,135	0,124	0,205	0,176	0,185
0,293	0,243	0,249	0,179	0,15	0,25	0,205	0,221
0,335	0,3	0,298	0,194	0,179	0,276	0,225	0,267
0,393	0,358	0,342	0,238	0,208	0,311	0,272	0,309
0,457	0,413	0,389	0,28	0,245	0,367	0,32	0,347
0,484	0,452	0,431	0,32	0,28	0,397	0,346	0,366
0,519	0,501	0,477	0,356	0,309	0,446	0,375	0,397
0,539	0,545	0,545	0,375	0,36	0,492	0,391	0,441
0,583	0,605	0,572	0,424	0,4	0,532	0,437	0,457
0,68	0,68	0,631	0,448	0,419	0,583	0,468	0,488
0,72	0,722	0,662	0,483	0,45	0,622	0,49	0,532
0,77	0,75	0,686	0,527	0,473	0,665	0,536	0,58
0,821	0,801	0,724	0,556	0,523	0,713	0,583	0,638
0,846	0,835	0,742	0,592	0,547	0,75	0,629	0,669
0,883	0,863	0,761	0,623	0,583	0,797	0,673	0,709
0,989	0,899	0,806	0,68	0,616	0,846	0,707	0,748
	0,985	0,841	0,715	0,645	0,89	0,746	0,79
		0,898	0,735	0,669	0,982	0,806	0,815
		0,984	0,779	0,735		0,846	0,872
			0,828	0,775		0,879	0,899
			0,865	0,814		0,909	0,985
			0,89	0,85		0,985	
			0,969	0,89			
			0,998	0,98			

Tablo 7.14. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin proteinlerinin Rf değerleri

<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
0,103	0,111	0,095	0,042	0,04	0,061	0,036	0,032	0,027
0,164	0,16	0,141	0,101	0,074	0,113	0,099	0,088	0,092
0,218	0,183	0,189	0,17	0,109	0,143	0,202	0,143	0,151
0,292	0,231	0,214	0,254	0,132	0,193	0,263	0,204	0,195
0,338	0,29	0,233	0,288	0,183	0,239	0,307	0,265	0,252
0,384	0,342	0,29	0,384	0,244	0,284	0,355	0,313	0,305
0,424	0,384	0,345	0,487	0,275	0,334	0,403	0,359	0,355
0,487	0,401	0,416	0,536	0,328	0,397	0,408	0,408	0,391
0,548	0,494	0,475	0,565	0,351	0,458	0,435	0,431	0,426
0,576	0,542	0,542	0,653	0,399	0,5	0,508	0,502	0,502
0,643	0,569	0,569	0,721	0,422	0,55	0,553	0,548	0,542
0,826	0,754	0,628	0,775	0,487	0,613	0,584	0,624	0,565
0,876	0,805	0,702	0,845	0,55	0,662	0,639	0,643	0,62
0,931	0,863	0,721	0,901	0,584	0,708	0,662	0,691	0,641
	0,939	0,786	0,943	0,651	0,754	0,704	0,763	0,689
	0,998	0,819	1	0,687	0,79	0,763	0,798	0,765
		0,863		0,769	0,832	0,819	0,859	0,807
		0,887		0,794	0,855	0,863	0,922	0,842
		0,945		0,855	0,895	0,912	0,952	0,901
		1		0,908		0,966		0,943
				0,954				

Tablo 7.15. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A proteinlerinin Rf değerleri

<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
0,107	0,107	0,104	0,068	0,023	0,076	0,063	0,049	0,055
0,168	0,158	0,154	0,137	0,07	0,123	0,107	0,1	0,1
0,197	0,199	0,199	0,18	0,146	0,16	0,143	0,15	0,16
0,234	0,242	0,252	0,236	0,205	0,205	0,176	0,207	0,207
0,266	0,275	0,299	0,266	0,273	0,256	0,221	0,271	0,281
0,299	0,328	0,344	0,316	0,297	0,281	0,258	0,316	0,326
0,332	0,389	0,391	0,346	0,365	0,318	0,316	0,346	0,35
0,363	0,436	0,436	0,377	0,424	0,373	0,342	0,385	0,393
0,414	0,463	0,457	0,422	0,465	0,432	0,379	0,414	0,443
0,463	0,498	0,486	0,445	0,488	0,467	0,404	0,473	0,467
0,492	0,539	0,523	0,502	0,514	0,504	0,438	0,475	0,523
0,549	0,598	0,553	0,572	0,568	0,523	0,512	0,5	0,553
0,598	0,65	0,59	0,607	0,639	0,549	0,557	0,525	0,572
0,625	0,688	0,648	0,652	0,711	0,584	0,592	0,584	0,602
0,689	0,727	0,705	0,693	0,76	0,625	0,643	0,617	0,625
0,717	0,752	0,75	0,727	0,836	0,689	0,678	0,674	0,662
0,764	0,797	0,781	0,785	0,875	0,719	0,717	0,748	0,701
0,814	0,82	0,809	0,82	0,932	0,752	0,756	0,824	0,762
0,896	0,863	0,854	0,859	0,992	0,773	0,807	0,861	0,809
0,936	0,932	0,92	0,885		0,83	0,867	0,912	0,867
0,998	0,996	0,992	0,928		0,857	0,914	0,938	0,92
			0,99		0,914	0,938	0,99	0,969
					0,988	0,992		0,994

Tablo 7.16. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B proteinlerinin Rf değerleri

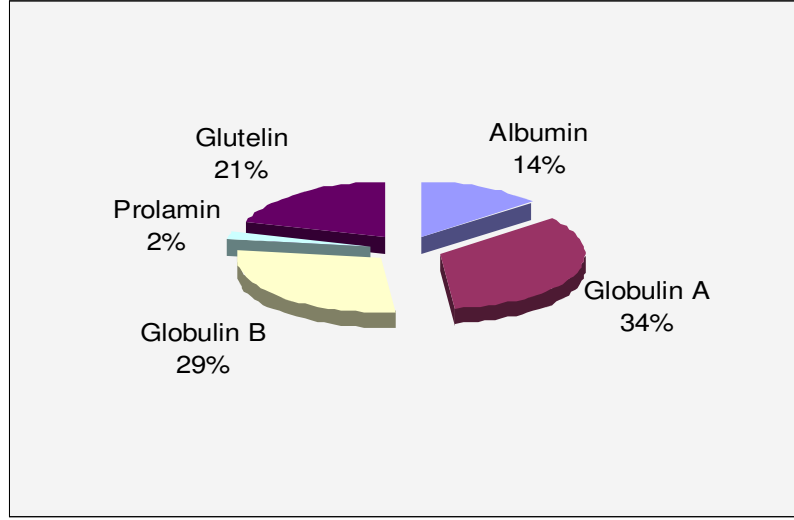
<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
0,093	0,047	0,125	0,055	0,058	0,047	0,065	0,058	0,058
0,111	0,082	0,204	0,1	0,102	0,08	0,095	0,096	0,096
0,155	0,118	0,244	0,144	0,138	0,116	0,133	0,136	0,14
0,213	0,155	0,273	0,187	0,171	0,142	0,187	0,185	0,184
0,242	0,205	0,327	0,225	0,224	0,176	0,215	0,211	0,231
0,265	0,242	0,355	0,271	0,258	0,224	0,273	0,251	0,256
0,327	0,273	0,385	0,305	0,316	0,249	0,316	0,28	0,264
0,353	0,324	0,411	0,356	0,335	0,309	0,364	0,32	0,3
0,405	0,351	0,5	0,376	0,362	0,362	0,396	0,349	0,325
0,433	0,404	0,547	0,407	0,415	0,404	0,44	0,391	0,356
0,464	0,444	0,573	0,429	0,449	0,447	0,487	0,415	0,395
0,5	0,498	0,616	0,469	0,471	0,489	0,545	0,462	0,42
0,518	0,516	0,653	0,489	0,496	0,525	0,611	0,485	0,451
0,56	0,564	0,715	0,558	0,516	0,553	0,653	0,536	0,513
0,591	0,591	0,771	0,605	0,605	0,585	0,707	0,562	0,533
0,638	0,62	0,796	0,625	0,635	0,633	0,744	0,613	0,575
0,658	0,658	0,864	0,673	0,711	0,687	0,809	0,644	0,593
0,684	0,685	0,916	0,7	0,764	0,724	0,833	0,687	0,613
0,713	0,713	0,96	0,72	0,784	0,756	0,855	0,713	0,635
0,725	0,736		0,767	0,855	0,855	0,88	0,758	0,702
0,776	0,769		0,785	0,92	0,92	0,922	0,82	0,744
0,8	0,796		0,838	0,953	0,951	0,947	0,844	0,776
0,849	0,836		0,876	1		1	0,902	0,815
0,882	0,856		0,931				0,949	0,853
0,9	0,885		0,96				1	0,931
0,927	0,955							0,996
0,96								

Tablo 7.17. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin proteinlerinin Rf değerleri

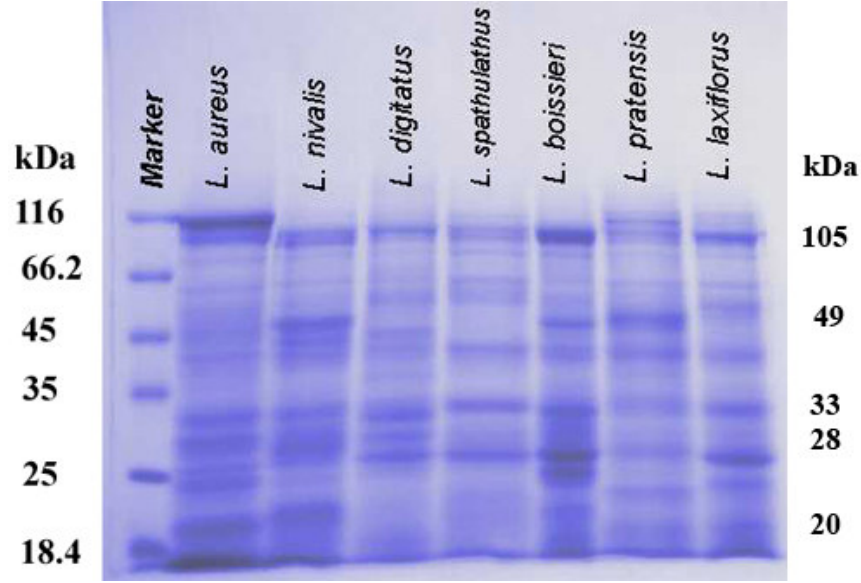
<i>L.roseus</i>	<i>L.tuberosus</i>	<i>L.belinensis</i>	<i>L.saxatilis</i>	<i>L.vinealis</i>	<i>L.sphaericus</i>	<i>L.inconspicuus</i>	<i>L.tauricola</i>	<i>L.setifolius</i>
0,054	0,058	0,044	0,039	0,064	0,037	0,054	0,068	0,035
0,083	0,093	0,091	0,081	0,116	0,087	0,089	0,106	0,074
0,106	0,151	0,151	0,137	0,205	0,122	0,128	0,141	0,116
0,159	0,213	0,195	0,186	0,273	0,193	0,18	0,203	0,149
0,199	0,269	0,236	0,209	0,309	0,246	0,25	0,261	0,193
0,23	0,296	0,288	0,246	0,36	0,304	0,28	0,309	0,236
0,292	0,342	0,319	0,273	0,422	0,327	0,304	0,356	0,294
0,323	0,412	0,379	0,306	0,476	0,362	0,362	0,404	0,366
0,371	0,443	0,443	0,352	0,52	0,4	0,383	0,468	0,433
0,422	0,474	0,513	0,398	0,567	0,427	0,476	0,522	0,458
0,472	0,536	0,542	0,462	0,582	0,47	0,553	0,547	0,507
0,536	0,588	0,584	0,493	0,627	0,518	0,625	0,578	0,545
0,603	0,66	0,617	0,542	0,648	0,569	0,646	0,627	0,598
0,648	0,704	0,696	0,563	0,712	0,621	0,696	0,689	0,642
0,714	0,733	0,76	0,573	0,801	0,694	0,731	0,721	0,66
0,76	0,749	0,826	0,627	0,855	0,712	0,801	0,747	0,71
0,818	0,812	0,872	0,65	0,936	0,756	0,853	0,814	0,783
0,897	0,863	0,942	0,714	0,985	0,791	0,983	0,853	0,807
0,919	0,938	0,988	0,774		0,865		0,917	0,863
0,948	0,988		0,805		0,921		0,977	0,977
0,996			0,836		0,985			
			0,925					
			0,983					

7.5. Tohum depo proteinlerinin yüzde değerleri

Tezde çalışılan taksonlara ait albumin (2,397 µg/ml), globulin A (5,989 µg/ml), globulin B (5,046 µg/ml), prolamin (0,391 µg/ml) ve glutelin (3,569 µg/ml) proteinlerinin ortalama miktarları kullanılarak tohum depo proteinlerinin yüzde değerleri bulunmuştur (Şekil 7.3). Bu değerlere göre albuminler depo proteinlerinin % 14'ünü, globulin A % 34'ünü, globulin B % 29'unu, prolaminler % 2'sini ve glutelinler ise % 21'ini oluşturmuşlardır.

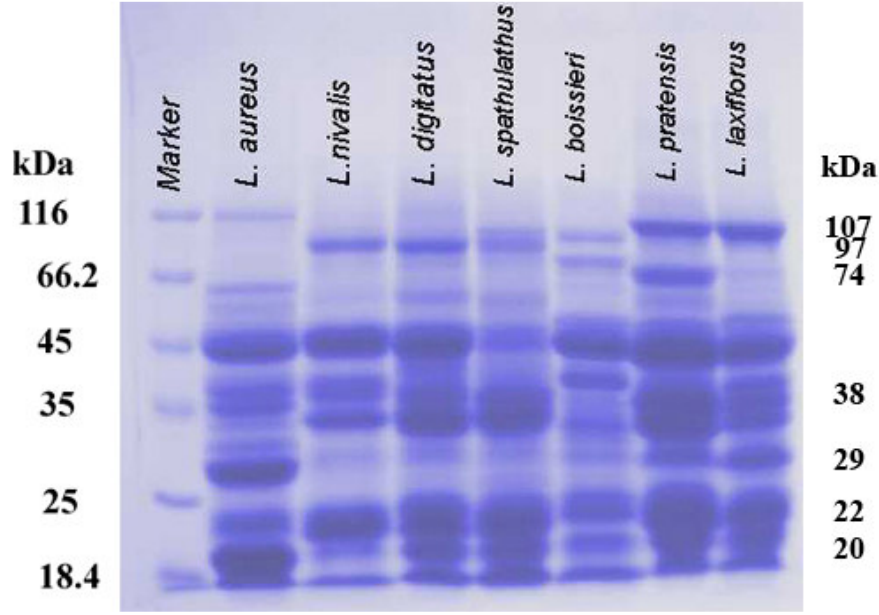


Şekil 7.3. Çalışılan on yedi taksona ait tohum depo proteinlerinin ortalama yüzde oranları



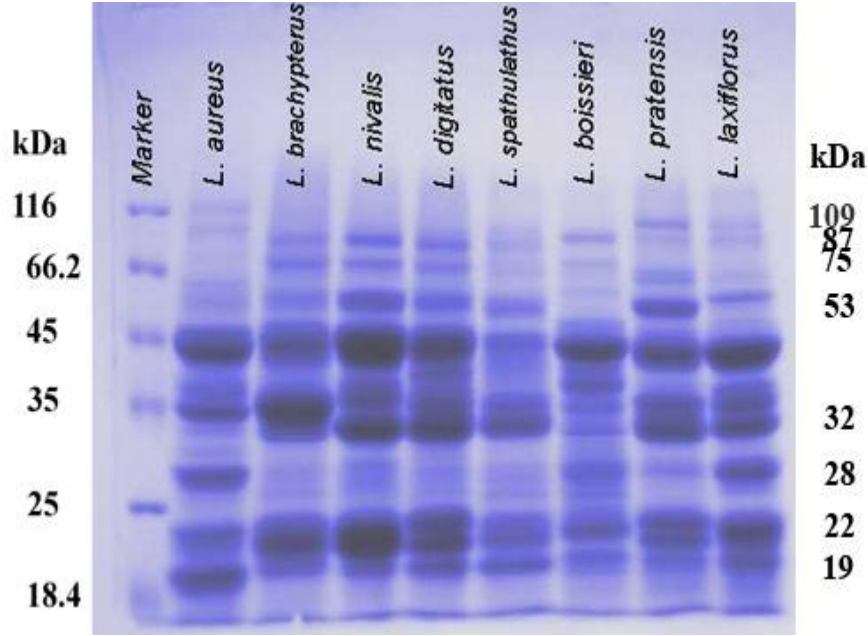
Şekil 7.4. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin örneklerinin elektroforez görüntüleri

Orobis, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait çalışılan taksonların albumin proteinlerinin elektroforez görüntülerine baktığımız zaman ortalama 105 kDa'luk protein bandının tüm taksonlarda ortak olduğunu görmekteyiz. Benzer şekilde 33 kDa'luk protein bandı da tüm taksonlarda ortaktır. 28 kDa'luk protein bandı ise *L. aureus*, *L. nivalis* ve *L. digitatus* dışındaki taksonlarda bulunmamaktadır. 49 kDa'luk protein bandı ise sadece *L. nivalis*, *L. boissieri* ve *L. pratensis*'de bulunurken 23 kDa'luk protein bandı ise *L. aureus* ve *L. boissieri* de bulunmaktadır. Ayrıca *L. aureus*, *L. nivalis* ve *L. boissieri* de 20 kDa'luk protein bandı koyu halde bulunmaktadır (şekil 7.4).



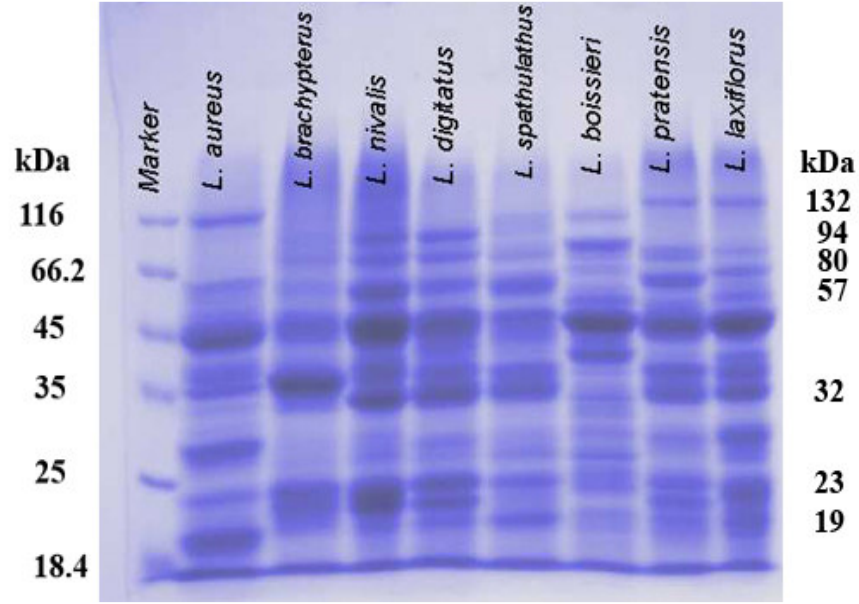
Şekil 7.5. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A örneklerinin elektroforez görüntüleri

Taksonların globulin A proteinlerinin jel görüntülerini incelediğimiz zaman 107 kDa'luk protein bandının *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'a özgü olduğunu görmekteyiz. Benzer şekilde 97 kDa'luk band ise *Platystylis* seksiyonunun çalışılan dört türüne aittir. Yine 74 kDa'luk band paterni sadece *L. pratensis*'te bulunmaktadır. 45 kDa ve 35 kDa'luk bandların tüm taksonlarda ortak olduğunu görmekteyiz. Aynı zamanda 38 kDa'luk protein bandı da *L. boissieri*'de zayıf olmak üzere tüm taksonlarda bulunmaktadır. 29 kDa'luk protein bandı ise tüm taksonlarda ortak olmakla birlikte *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'da oldukça yoğun haldedir. Ayrıca 27 kDa'luk protein bandı *L. aureus*'a has bir protein bandıdır. Aynı zamanda 22 kDa ve 20 kDa'luk protein bandları çalışılan tüm taksonlarda bulunmaktadır (şekil 7.5).



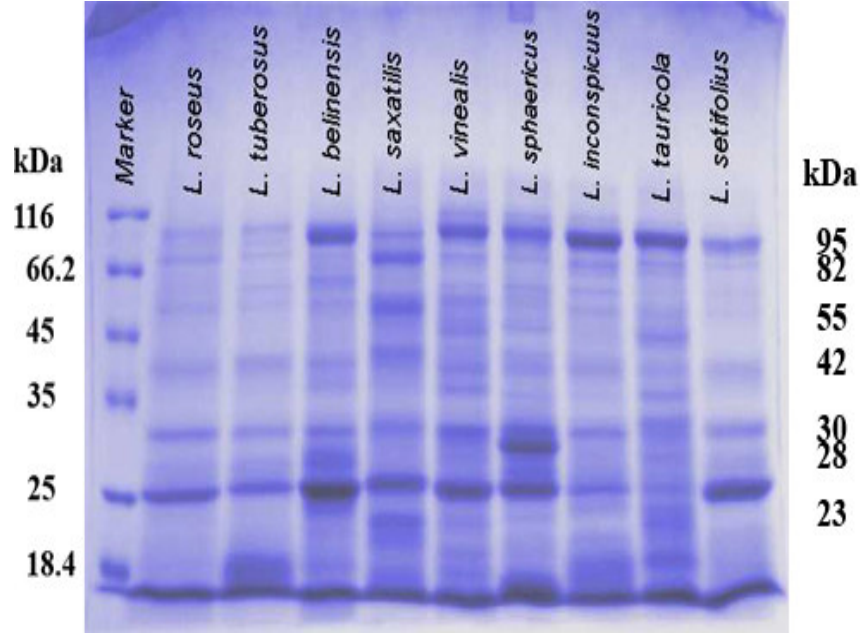
Şekil 7.6. *Orobos*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerinin elektroforez görüntüleri

Üç farklı seksiyona ait sekiz taksonun globulin B örneklerini incelediğimiz zaman 87 kDa ve 75 kDa'luk protein bandlarının *L. spathulatus* ve *L. boissieri* de zayıf olmakla birlikte *Platystylis* seksiyonunun diğer üyelerinde de var olduğunu görmekteyiz. 109 kDa'luk band paterni ise *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'a özgüdür. Aynı zamanda ortalama 53 kDa'luk band *L. boissieri* dışındaki diğer taksonlarda bulunmaktadır. Ayrıca 45 kDa, 35 kDa ve 32 kDa'luk protein bandlarının çalışılan tüm taksonlarda ortak olduğunu görmekteyiz. 28 kDa'luk protein bandı ise *L. aureus*, *L. nivalis*, *L. boissieri* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'ta daha belirgin haldedir. Benzer şekilde 22 kDa ve 19 kDa'luk band paternleri de tüm taksonlarda ortaktır (şekil 7.6).



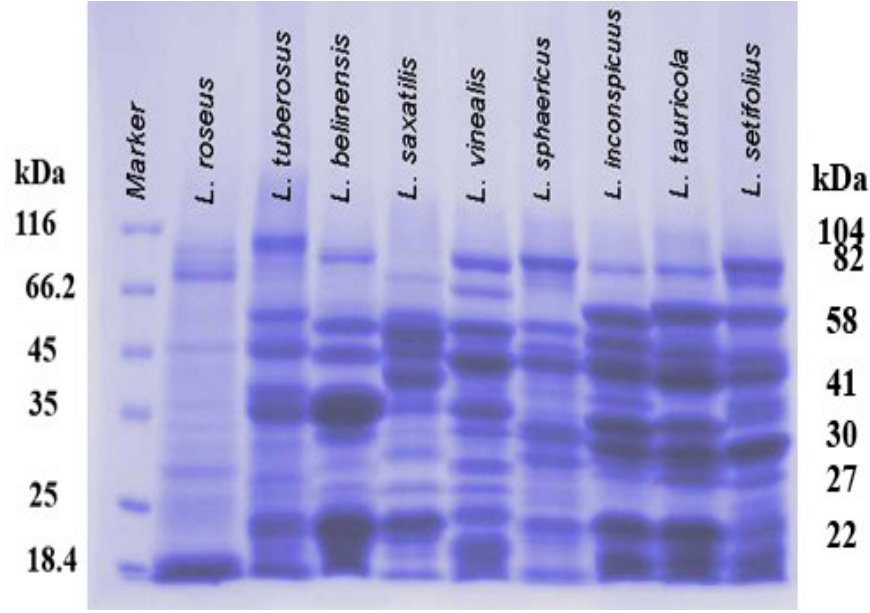
Şekil 7.7. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin örneklerinin elektroforez görüntüleri

Çalışılan sekiz taksona ait glutelin proteinlerinin band profillerine baktığımız zaman 132 kDa'luk bandın sadece *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'ta olduğunu görmekteyiz. Benzer şekilde 116 kDa'luk band ise *L. aureus*'a hasır. 94 kDa'luk band incelendiğinde *Platystylis* seksiyonunun iki üyesi olan *L. nivalis* ve *L. digitatus*'ta bulunduğu gözlenmektedir. Benzer şekilde ortalama 80 kDa'luk protein bandı ise *L. aureus* dışındaki diğer taksonlarda bulunmaktadır. 57 kDa'luk protein bandı ise *L. boissieri* dışındaki diğer tüm taksonlarda ortaktır. 45 kDa'luk protein bandı da çalışılan tüm taksonlarda ortaktır. Benzer şekilde 35 kDa'luk protein bandı ise *L. boissieri*'de daha zayıf olmak üzere diğer tüm taksonlarda ortaktır. Ayrıca 32 kDa'luk band paterni *L. aureus* ve *L. boissieri* de zayıf olmak üzere çalışılan tüm taksonlarda ortak bir band bulunmaktadır. 19 ve 23 kDa'luk protein bandları da çalışılan tüm taksonlarda ortaktır (şekil 7.7).



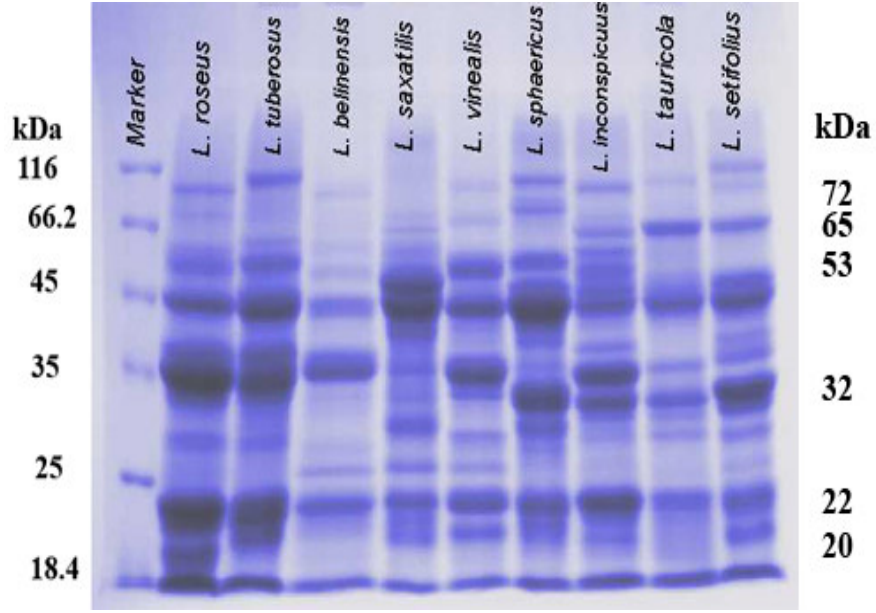
Şekil 7.8. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin örneklerinin elektroforez görüntüleri

Orobon, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait çalışılan türlerin albumin proteinlerinin jel görüntülerini incelediğimiz zaman ortalama 95 kDa'luk bandın *L. roseus*, *L. tuberosus* ve *L. saxatilis*'te zayıf olmakla birlikte diğer türlerde koyu halde olduğu görülmektedir. 82, 55 ve 42 kDa'luk bandlar sadece *L. saxatilis*'te koyu bir band olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda 30 kDa ile 25 kDa'luk protein bandları ise tüm türlerde ortaktır. 23 kDa'luk protein bandı ise *L. saxatilis* ve *L. tauricola*'da bulunmaktadır. Ayrıca ortalama 28 kDa'luk protein bandı ise sadece *L. spphaericus*'ta bulunmaktadır. 18.4 kDa'luk protein bandı ise *L. aureus* ve *L. setifolius* dışındaki diğer tüm türlerde bulunmaktadır (şekil 7.8).



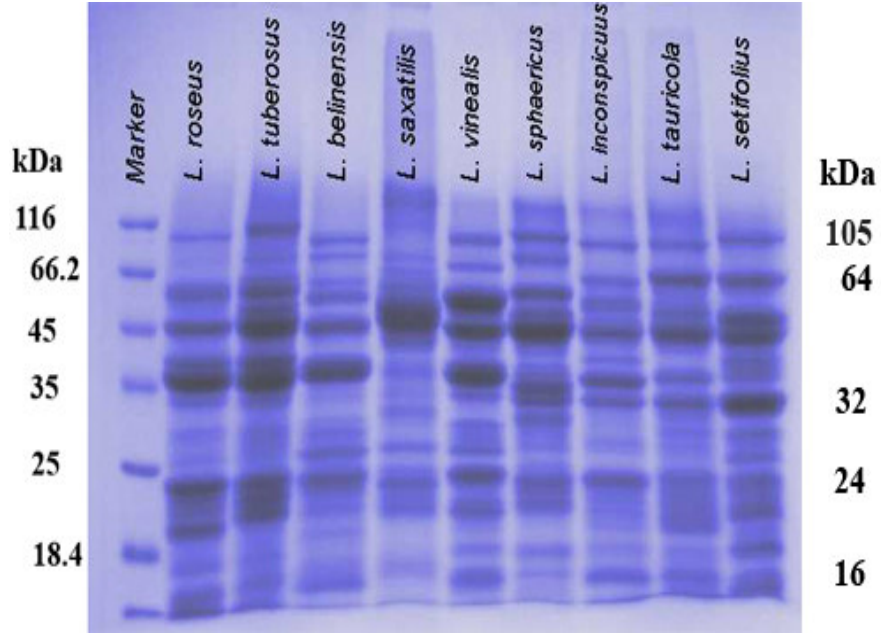
Şekil 7.9. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A örneklerinin elektroforez görüntüleri

Aynı türlerin globulin A örneklerine baktığımız zaman *L. roseus* dışındaki diğer türlerin oldukça koyu bandlara sahip olduklarını görmekteyiz. 104 kDa'luk protein bandı sadece *L. tuberosus*'ta bulunmaktadır. Ortalama 82 kDa'luk protein bandı ise *L. roseus*, *L. tuberosus* ve *L. saxatilis* dışındaki diğer türlerde koyu bir halde bulunmaktadır. Özellikle 66.2 kDa ile 18.4 kDa arasındaki bölgede türler için belirleyici band paternleri bulunmaktadır. Örneğin yaklaşık olarak 58 kDa'luk protein bandı *L. inconspicuus*, *L. tauricola* ve *L. setifolius*'da koyu olarak bulunmaktadır. 45 kDa'luk protein bandı ise çalışılan bütün türlerde bulunmaktadır. 41 kDa'luk protein bandı ise *L. saxatilis*'e özgüdür. 35 kDa'luk protein bandı da *L. roseus* ve *L. sphaericus* dışındaki diğer türlerde ortaktır. Benzer şekilde 30 kDa ve 27 kDa'luk bandlar *L. saxatilis*'te daha zayıf olmakla birlikte *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinde daha koyu halde bulunmaktadırlar. Aynı zamanda 22 kDa'luk protein bandının *L. roseus* dışındaki diğer türlerde ortak olduğunu görmekteyiz (şekil 7.9).



Şekil 7.10. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B örneklerinin elektroforez görüntüleri

Çalışılan türlerin globulin B örneklerini incelediğimiz zaman endemik bir tür olan *L. belinensis*'in diğer türlere oranla daha az protein bandına sahip olduğunu görmekteyiz. *L. belinensis*'in 50 kDa, 45 kDa, 37 kDa, 25 kDa ve 22 kDa olmak üzere belirgin beş bandının olduğunu söyleyebiliriz. 72 kDa'luk protein bandının sadece *L. sphaericus*'da bulunduğunu görmekteyiz. Ortalama 65 kDa'luk bandın *Orobastrum* seksiyonunun üç üyesi olan *L. inconspicuus*, *L. tauricola* ve *L. setifolius*'da koyu bir band olarak bulunduğunu *L. saxatilis*'te ise aynı proteinin nispeten daha zayıf bulunduğunu görmekteyiz. Ortalama 53 kDa'luk bandın ise *L. roseus*, *L. tuberosus*, *L. vinealis*, *L. sphaericus* ve *L. inconspicuus*'da var olduğunu görmekteyiz. Ayrıca 45 kDa'luk protein bandı çalışılan bütün türlerde bulunmaktadır. Yine 35 kDa'luk bandın *Orobastrum* seksiyonunun elemanları olan *L. saxatilis* ve *L. sphaericus*'ta daha zayıf olmakla birlikte çalışılan diğer türlerde koyu bir band olarak var olduğunu görmekteyiz. Ayrıca 32 kDa'luk protein bandı *L. saxatilis* ve *L. vinealis* dışındaki *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinde koyu bir band olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda 22 kDa'luk band paterni çalışılan bütün türlerde bulunmaktadır. Benzer şekilde yaklaşık olarak 20 kDa'luk protein bandı *L. tauricola* dışındaki *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinde bulunmaktadır (şekil 7.10).



Şekil 7.11. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin örneklerinin elektroforez görüntüleri

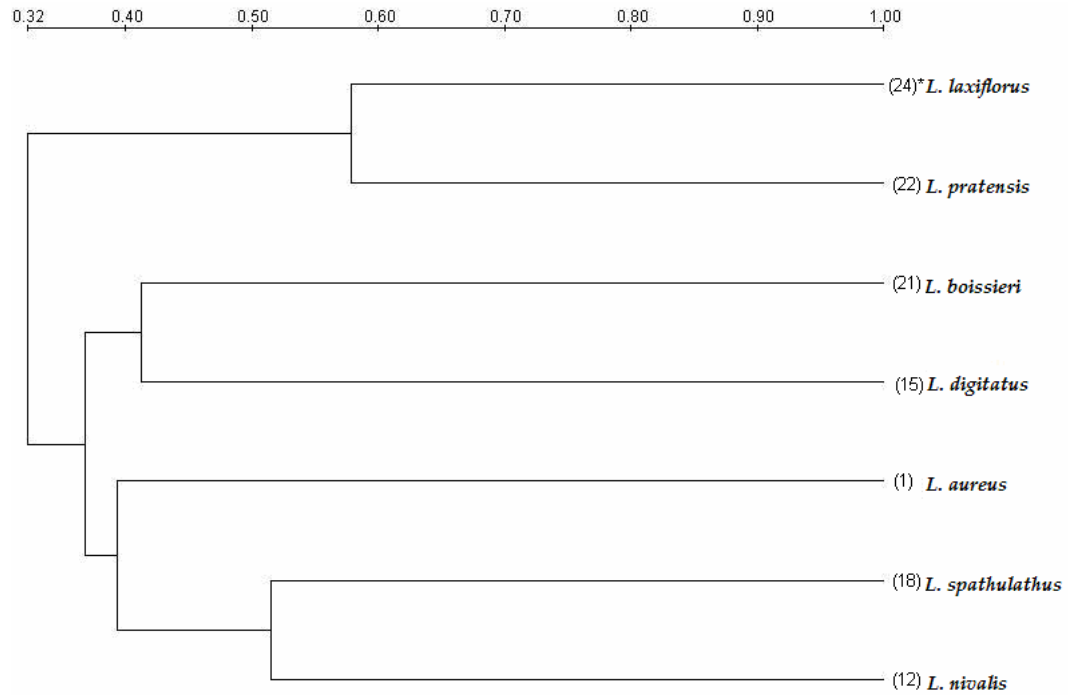
Çalışılan türlerin glutelin proteinlerinin band profillerini incelediğimiz zaman ortalama 105 kDa'luk bandın *L. saxatilis* dışındaki *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinde ve *Lathyrus* seksiyonunun elemanı olan *L. belinensis* ile *Orobon* seksiyonunun çalışılan tek üyesi olan *L. roseus*'ta olduğunu görmekteyiz. Yine ortalama 88 kDa'luk band *Orobastrum* seksiyonunun üyeleri içinde sadece *L. sphaericus* ve *L. saxatilis*'te bulunmaktadır. Ortalama 64 kDa büyüklüğündeki protein bandı ise *L. vinealis* ve *L. sphaericus* dışındaki *Orobastrum* seksiyonunun diğer dört üyesinde de bulunmaktadır. 35 ve 45 kDa'luk bandlar ise çalışılan tüm türlerde ortaktır. Ortalama 32 kDa'luk protein bandı ise *L. saxatilis*'te nispeten daha zayıf olmak üzere *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinde bulunmaktadır. Benzer şekilde 16 ve 24 kDa'luk bandlar çalışılan bütün türlerde ortaktır (şekil 7.11).

8. TARTIŞMA

Legümenli bitkiler tohumlarında yüksek protein içeriğiyle karakterize edilirler ve baklagil tohumları ortalama % 20-25 oranında protein içerirler ki bu oran tahıllardan 2-3 kat daha fazladır [130,131]. Bu yüzden baklagil tohumları en zengin protein ve amino asit kaynakları arasında yer almaktadır [29]. Bu proteinler özellikle lizin gibi pek çok amino asitle zengin olmalarına karşın metiyonin ve sistein gibi amino asitlerce de fakir durumdadırlar [132]. Geleneksel olarak tohum depo proteinlerinin sınıflandırılması suda çözünen albuminler, tuzda çözünen globulinler, alkol/su karışımında çözünen prolaminler ve zayıf asidik ya da bazik çözeltide çözünen glutelinler şeklinde yapılmaktadır [16]. Globulinler baklagil kotiledonlarındaki en büyük protein bileşenleridir [133,134]. Genellikle sedimentasyon katsayılarına (S) göre 7S ve 11S globulinler olmak üzere iki alt sınıfta incelenirler. İlk olarak Osborne ve Campbell tarafından 1898 yılında *Pisum sativum* tohumlarından ayırt edilen bu iki alt globulin türü (7S ve 11S) vicilin ve legümin olarak isimlendirilmiştir ve bu tanımlama daha sonra diğer baklagil türlerinin globulinleri içinde kullanılmıştır [16,91]. Suda çözünür özellikte olan ve pek çok dikotil bitkide bulunan albuminler ise genellikle disülfid bağıyla bağlı düşük molekül ağırlıklı polipeptidlerden oluşmuş depo proteinleridir ve miktarları globulinlere göre daha azdır [42]. Prolaminler alkol/su karışımında (genelde % 60-70 (v/v) etanol veya % 50 propan-1-ol) çözünen, glutamin ve prolin amino asitlerince zengin durumda olan depo proteinleridir [42]. Glutelinler ise disülfid bağı ya da asidik ve bazik polipeptidlerin hidrofobik etkileşimleri sayesinde büyük makromoleküler kompleksler halinde bulunan depo proteinleridir [114]. Her ne kadar tohum depo proteinleri için Osborne sınıflandırması kabul görse de son moleküler ve biyokimyasal analizlere göre tohum depo proteinleri üç grup altında incelenmekte (albuminler, globulinler, prolaminler) glutelinler ise ya globulin tipi ve ya prolamin tipi proteinler olarak düşünülmektedirler [117].

Bu çalışmada tohum depo proteinlerinin (albumin, globulin (globulin A ve globulin B), prolamin, glutelin) protein miktarları belirlenmiş ve daha sonra taksonlar arasındaki benzerlikleri belirlemek amacıyla proteinlerin elektroforetik analizi yapılmıştır. Elektroforetik band profiline dayanarak Bio-Rad jel görüntüleme cihazında Quantity 1-D programı yardımıyla taksonlar arasındaki benzerlikler ortaya çıkarılmıştır. Tohum depo proteinlerinin miktarlarına baktığımız zaman miktar olarak en fazla globulinlerin olduğunu prolaminlerin ise çok az miktarda bulunduğunu görmekteyiz. İlgi çekici sonuçlardan biri *Lathyrus brachypterus* var. *brachypterus*'un albumin ve globulin A değerleridir. Şöyle ki bu taksona ait diğer protein değerleri normal oranlarda iken albumin (0.891 µg/ml) ve globulin A (0.657 µg/ml) değerleri oldukça düşük çıkmış ve bu iki alt fraksiyonun protein örnekleri jelde koşturulamamıştır.

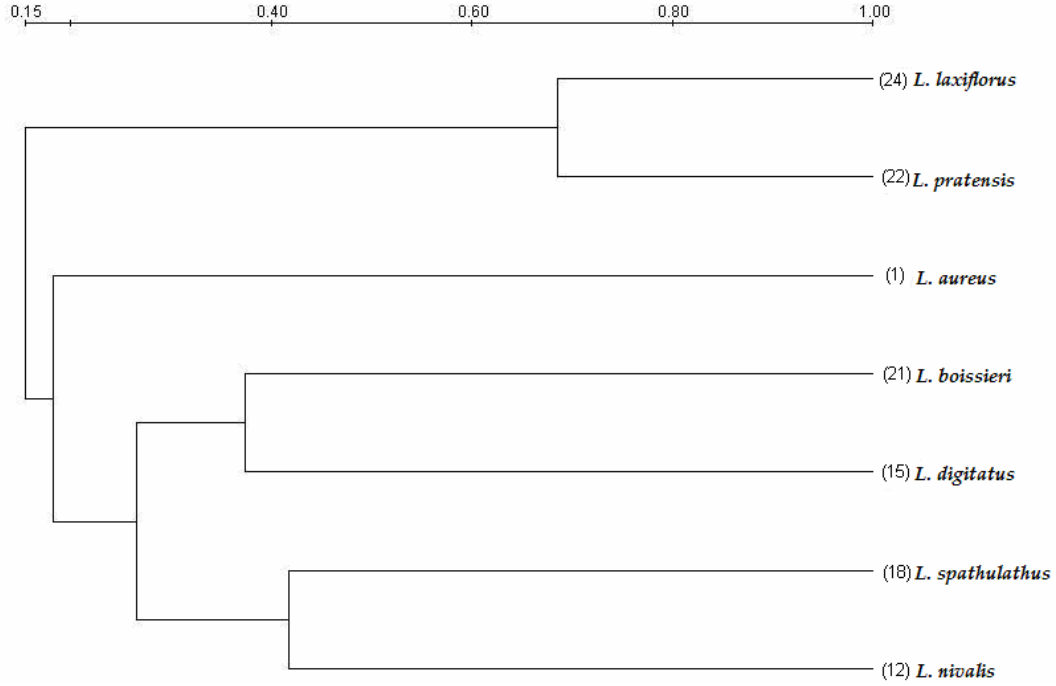
Bilindiği gibi *Lathyrus brachypterus* var. *brachypterus* 2n: 28 sayıda kromozoma sahip poliploid bir taksondur. Poliploidi de aynı türün diploid bireylerine göre genetik düzenlemeler meydana gelmekte ve bazı genler aktif halden inaktif hale geçmektedirler. Gen suskunluğu adı verilen bu olay poliploid bireylerde sıklıkla görülmektedir [135-137]. Muhtemelen *Lathyrus brachypterus* var. *brachypterus*'un albumin ve globulin A değerlerinin diğer taksonlara oranla daha düşük çıkmasının nedeni de gen suskunluğudur. Genel olarak taksonların protein miktarlarına baktığımız zaman en az protein miktarına düşük albumin ve globulin A miktarlarından dolayı *Lathyrus brachypterus* var. *brachypterus*'un sahip olduğunu en yüksek protein miktarına ise *Lathyrus tuberosus*'un sahip olduğunu görmekteyiz. Yine protein alt fraksiyonlarını tek tek incelediğimiz de albumin (3.370 µg/ml) miktarının *L. boissieri*'de, globulin A miktarının (8.269 µg/ml) *L. tauricola*'da, globulin B miktarının (7.678 µg/ml) *L. roseus*'ta, prolamin miktarının (0.632 µg/ml) *L. aureus*'ta ve glutelin miktarının da (5.873 µg/ml) *L. tuberosus*'ta en yüksek olduğunu görmekteyiz.



Şekil 8.1. *Orobus*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların albumin örneklerine göre oluşturulan dendrogram (*Taksonların yanında parantez içerisinde verilen numaralar taksonların Flora'daki sıra numaralarıdır.)

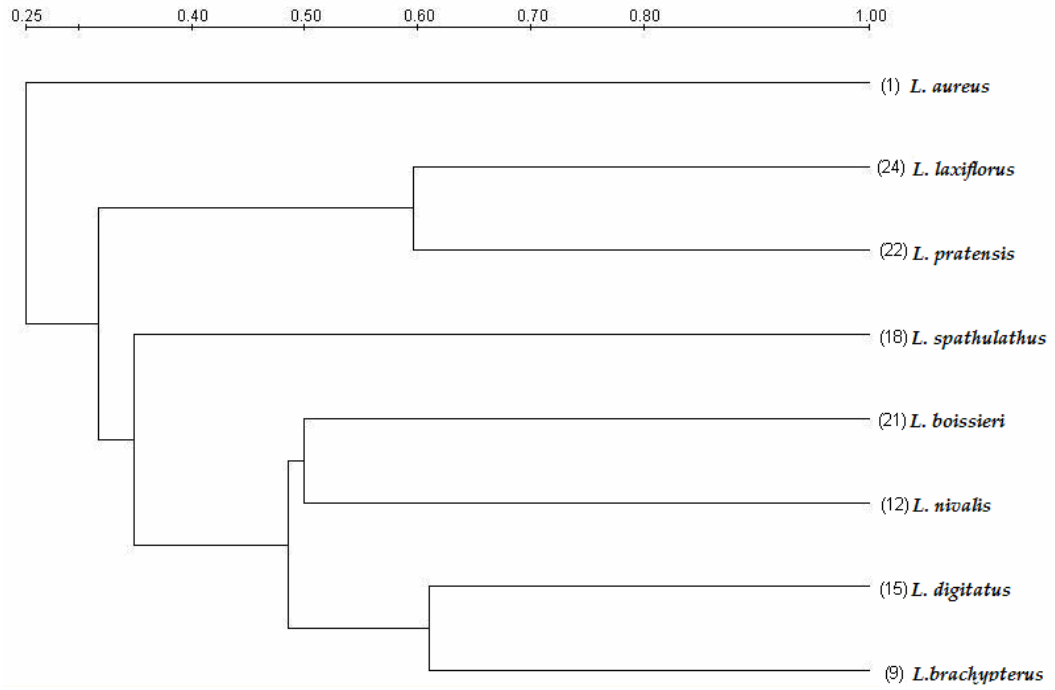
Yukarıdaki şekilde *Lathyrus* genusunun 3 seksiyonuna ait [*Orobus* (*L. aureus*), *Platystylis* (*L. nivalis*, *L. digitatus*, *L. spathulatus*, *L. boissieri*) ve *Pratensis* (*L. pratensis*, *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*)] yedi türün albumin örneklerine göre oluşturduğu dendrogram verilmiştir. Dendrograma baktığımız zaman 2 ayrı kümenin meydana geldiğini görmekteyiz. Birinci kümede, *L. nivalis*, *L. spathulatus*, *L. aureus*, *L. digitatus* ve *L. boissieri*, ikinci kümede

ise *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* yer almaktadır. Buna göre *L. nivalis* ve *L. spathulatus* birbirine daha benzerlik göstermekte ve bunlara *L. aureus* benzemektedir. Aynı şekilde *L. digitatus* ile *L. boissieri* ve *L. pratensis* ile de *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* protein bandı bakımından birbirleriyle benzerlik göstermektedir.



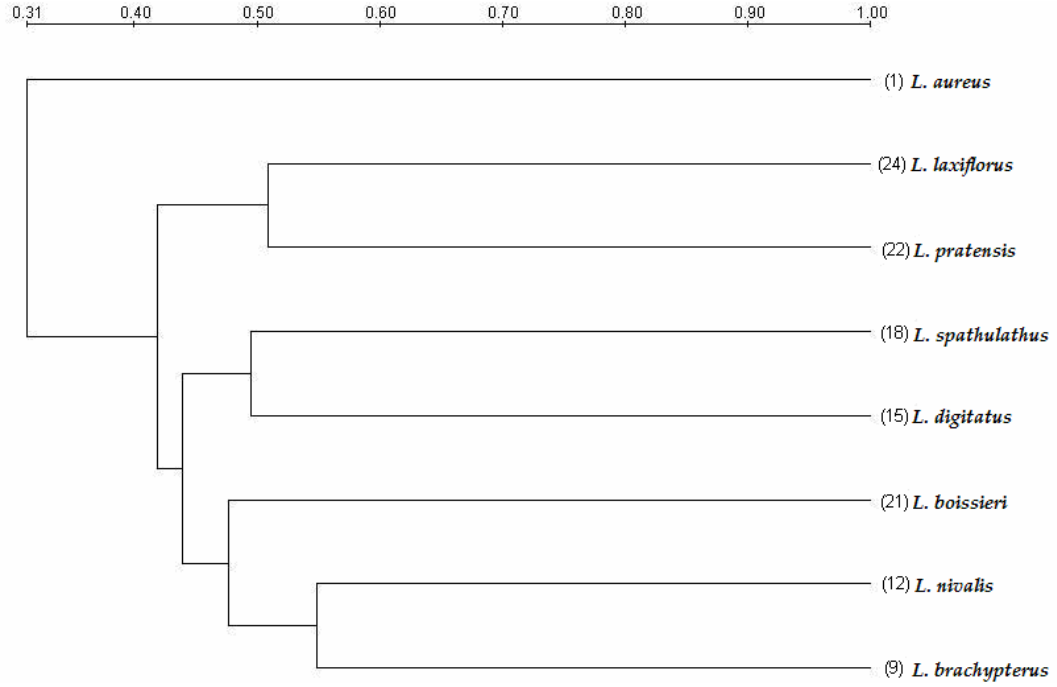
Şekil 8.2. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin A örneklerine göre oluşturulan dendrogram

Üç farklı seksiyona ait yedi türün globulin A'larının band profillerine baktığımız zaman yine iki ayrı kümelenmenin oluştuğunu görmekteyiz. Albumin fraksiyonlarına benzer şekilde ilk kümede *L. nivalis*, *L. spathulatus*, *L. digitatus* ve *L. boissieri* yer almaktadır. Ancak albumin fraksiyonlarına göre *L. nivalis* ve *L. spathulatus*'a benzerlik gösteren *L. aureus*'un globulin A band profili bu iki türden kısmen ayrılmakta ve dendrogramdaki yeri de ilk kümeye dışarıdan bağlanacak hale gelmektedir. İkinci kümeyi ise *Pratensis* seksiyonunun iki elemanı olan *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* oluşturmaktadır. Ancak dikkat çeken bir özellik de bu yedi türün globulin A'larının band profillerinin albuminlerine oranla daha benzer olmaları ve dolayısıyla dendrogramda birbirlerine daha yakın durumda bulunmalarıdır.



Şekil 8.3. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların globulin B örneklerine göre oluşturulan dendrogram

Şekil 8.3.'teki globulin B değerlerine göre oluşan dendrograma baktığımız zaman globulin B proteinlerine göre taksonlar arasındaki benzerliklerin albumin ve globulin A'ya göre değiştiğini ve kümelenmenin biraz daha farklı bir hal aldığını görmekteyiz. Şöyle ki oluşan iki farklı kümenin elemanları farklılık göstermektedirler. İlk kümeyi *L. brachypterus* var. *brachypterus*, *L. digitatus*, *L. nivalis*, *L. boissieri* oluştururken *L. spathulatus* bu kümeye en dıştan dahil olmuştur. İkinci kümeyi ise *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* oluşturmaktadır. Bundan başka *Orobis* seksiyonunun çalışılan tek üyesi olan *L. aureus* ise bu iki kümenin dışında kalmaktadır. İlk kümenin üyelerine baktığımız zaman *L. brachypterus* var. *brachypterus*'un *L. digitatus* ile *L. nivalis*'in ise *L. boissieri* ile daha yakın band profiline sahip olduğunu görmekteyiz. Yine *Platystylis* seksiyonunun elemanı olan *L. spathulatus* ise küme içerisinde en az benzerlik taşıyan türdür.



Şekil 8.4. *Orobis*, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait bazı taksonların glutelin örneklerine göre oluşturulan dendogram

Aynı taksonların glutelinlerine baktığımız zaman ise *L. brachypterus* var. *brachypterus*, *L. nivalis*, *L. boissieri*, *L. digitatus* ve *L. spathulatus*'un ilk kümeyi oluşturduğunu *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'un ise ikinci kümenin üyeleri olduğunu görmekteyiz. *L. aureus* yine iki kümeye dahil olmamakta dolayısıyla farklı band paterni sergilemektedir. Yine dendograma bakacak olursak *L. brachypterus* var. *brachypterus*'un *L. nivalis* ile daha benzer band profiline sahip olduğunu *L. boissieri*'nin de bu iki türe daha yakın protein bandına sahip olduğunu görmekteyiz. Benzer şekilde *L. digitatus* ile *L. spathulatus*'ta birbiriyle daha benzer protein bandlarına sahiptirler.

Dört alt fraksiyon göz önüne alınarak yapılan değerlendirmeye göre *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonuna ait taksonların kendi aralarındaki kümelenme sonuçlarının Flora'yla uyumlu olduğunu görmekteyiz. Ancak *Platystylis* seksiyonunun taksonlarının kendi içinde farklı kümelenmeler gösterdiğini görmekteyiz. Şöyle ki albumin ve globulin A band profillerine göre *L. nivalis* ile *L. spathulatus*, *L. digitatus* ile de *L. boissieri* diğer taksonlara oranla birbirlerine daha benzerlik göstermektedirler. Ancak globulin B ve glutelin fraksiyonlarında bu benzerlik değişmektedir. Flora'da *L. digitatus*'un *L. cyaneus*'a çok benzer olduğu, *L. spathulatus* ve *L. tukhtensis*'in dar yapraklı formlarıyla da görünüşte benzer olduğu belirtilmektedir [3]. Ancak *L. digitatus*'un tohum depo proteinlerine baktığımız zaman glutelinlerinin *L. spathulatus* ile oldukça benzer olduğunu fakat diğer alt fraksiyonların ise bu türden farklı olduğu görülmektedir. Globulin B proteinlerine göre oluşturulan dendogramda *L.*

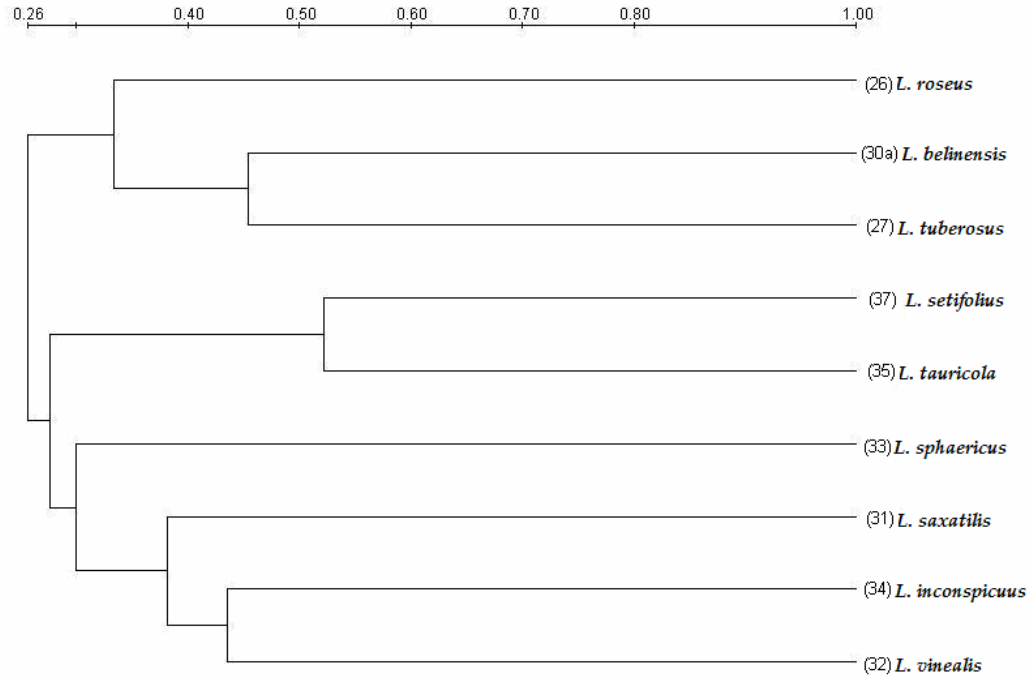
spathulatus birinci kümenin en dışında yer almasına rağmen yine de çalışılan taksonlar arasında en yüksek benzerliği *L. digitatus* ile göstermektedir (% 45.8). *L. nivalis* ise albumin ve globulin A proteinleri açısından *L. spathulatus* ile benzerlik göstermesine karşın globulin B profiline göre *L. boissieri* ile glutelin proteinlerine göre de *L. brachypterus* var. *brachypterus* ile benzerdir.

Pratensis seksiyonunun çalışılan iki üyesi olan *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* dört tohum depo proteinine göre de dendogramda birlikte yer almışlardır. Ancak bu iki takson arasındaki en yüksek benzerlik globulin A (% 68.5) örneklerinde görülürken en düşük benzerlik ise glutelin örneklerinde gözlenmiştir (% 50.9). Şahin ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada da *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'un kromozom morfolojilerinin de birbirine benzer olduğu bulunmuştur. *L. pratensis*'te ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'ta I ve VII numaralı kromozomlar median, II, III, IV, V ve VI numaralı kromozomların da submedian sentromerli olduğu bulunmuştur [138]. *Orobus* seksiyonunun çalışılan tek üyesi olan *L. aureus* ise globulin B ve glutelin örneklerine göre dendogramın en dışında yer almış ve dolayısıyla diğer taksonlarla düşük bir benzerlik sergilemiştir. *L. aureus*, globulin B proteinine göre en yüksek benzerliği *L. brachypterus* var. *brachypterus* (% 32.4) ile gösterirken glutelin örneklerine göre ise % 44.8 ile *L. nivalis* ile göstermektedir. *L. aureus*'un albumin örneklerini incelediğimizde dendogramda *L. nivalis* ve *L. spathulatus*'a komşu olduğunu görmekteyiz. *L. nivalis* ile % 32.0 benzerlik gösterirken *L. spathulatus* ile de % 46.6 oranında benzerlik göstermektedir. Yine aynı türün globulin A proteinine göre ise *Platystylis* seksiyonunun çalışılan dört üyesine komşu olduğunu görmekteyiz ve % 26.9 oranıyla en çok *L. nivalis* ile benzerlik gösterdiğini söyleyebiliriz. Dolayısıyla *L. aureus*'un tohum depo proteinlerinin elektroforetik jel görüntülerine göre çalışılan taksonlar arasında en çok *L. nivalis* ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Poliploid bir birey olan *L. brachypterus* var. *brachypterus*'un globulin B örneklerine göre *L. digitatus* (% 61.0) ile glutelin örneklerine göre ise *L. nivalis* (% 54.9) ile daha benzer olduğunu görmekteyiz. *Platystylis* seksiyonunun bir diğer üyesi *L. boissieri* ise albumin ve globulin A proteinlerine göre dendogramda *L. digitatus* ile birlikte yer almakta iken globulin B örneklerine göre *L. nivalis* ile glutelin örneklerine göre de *L. nivalis* ve *L. brachypterus* var. *brachypterus* ile birlikte yer almaktadır.

Emre, Turgut-Balık, Genç ve Şahin'in 2006 yılında *Lathyrus* L. cinsine ait bazı taksonların total proteinleriyle ilgili yaptıkları çalışmanın sonucuna göre de *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* dendogramda birlikte yer almışlardır. Aynı çalışmada *L. digitatus* ile *L. spathulatus*'un total band profillerinin birbirine benzer olduğu ve birlikte kümelandikleri belirtilmektedir. Aynı şekilde *L. boissieri*'nin de *L. nivalis* ile kümelandiği gözlenmiştir. Ayrıca *L. aureus*'un *Platystylis* seksiyonuna ait çalışılan taksonlara yakın bir band profili taşıdığı ifade

edilmektedir. Poliploid bir birey olan *L. brachypterus* var. *brachypterus* (2n:28) ise kümenin en dışında yer almıştır [13].

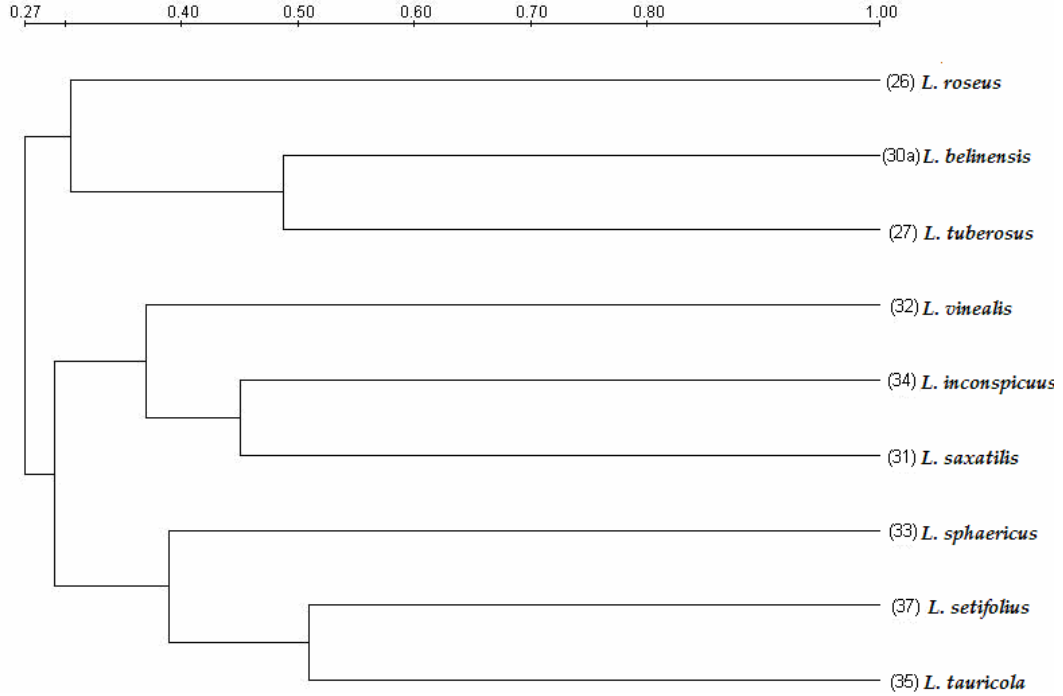
Orobus, *Platystylis* ve *Pratensis* seksiyonlarına ait çalışılan taksonların globulin B örnekleri ile glutelin örnekleri karşılaştırıldığında bu iki protein türünün kimi taksonlar için oldukça benzer olduğu gözlenmektedir. Şöyle ki özellikle *L. nivalis*, *L. digitatus*, *L. spathulatus*, *L. pratensis* ve *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*'un globulin B ve glutelin örnekleri yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışılan taksonların globulin B ve glutelin proteinlerinin jel görüntülerine göre her iki protein türü için de 38 kDa, 35 kDa, 32 kDa ve 28 kDa'luk band profilleri başta olmak üzere birçok benzer band paternleri vardır. Bu yüzden de son zamanlarda ileri sürülen tohum depo proteinlerinin albuminler, prolaminler ve globulinler şeklinde üç gruba ayrılması glutelinlerin de globulinlere dahil edilmesi şeklindeki yaklaşım doğru olabilir.



Şekil 8.5. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin albumin örneklerine göre oluşturulan dendrogram

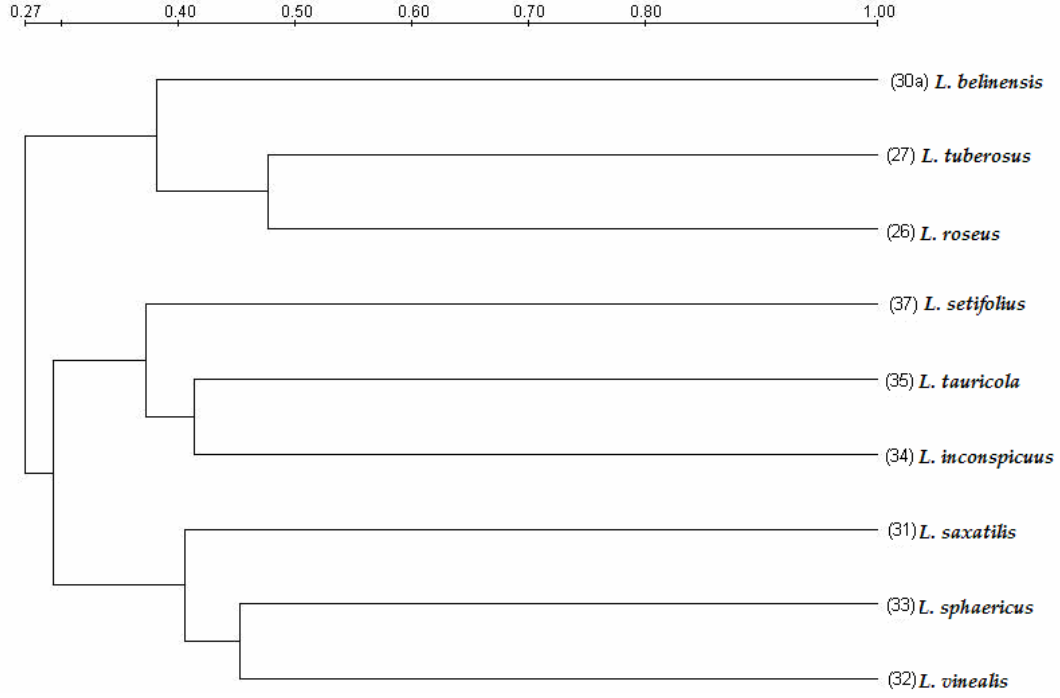
Orobon (*L. roseus*), *Lathyrus* (*L. tuberosus*, *L. belinensis*) ve *Orobastrum* (*L. saxatilis*, *L. vinealis*, *L. sphaericus*, *L. inconspicuus*, *L. tauricola* ve *L. setifolius*) seksiyonlarına ait 9 taksonun albumin bandlarına baktığımız zaman iki farklı kümelenmenin oluştuğunu görmekteyiz. İlk kümeyi *L. vinealis*, *L. inconspicuus*, *L. saxatilis*, *L. sphaericus*, *L. tauricola* ve *L. setifolius* oluştururken ikinci kümeyi ise *L. roseus*, *L. tuberosus* ve *L. belinensis*

oluşturmaktadır. *L. vinealis* ile *L. inconspicuus*'un *L. tauricola* ile de *L. setifolius*'un daha benzer olduklarını görmekteyiz.



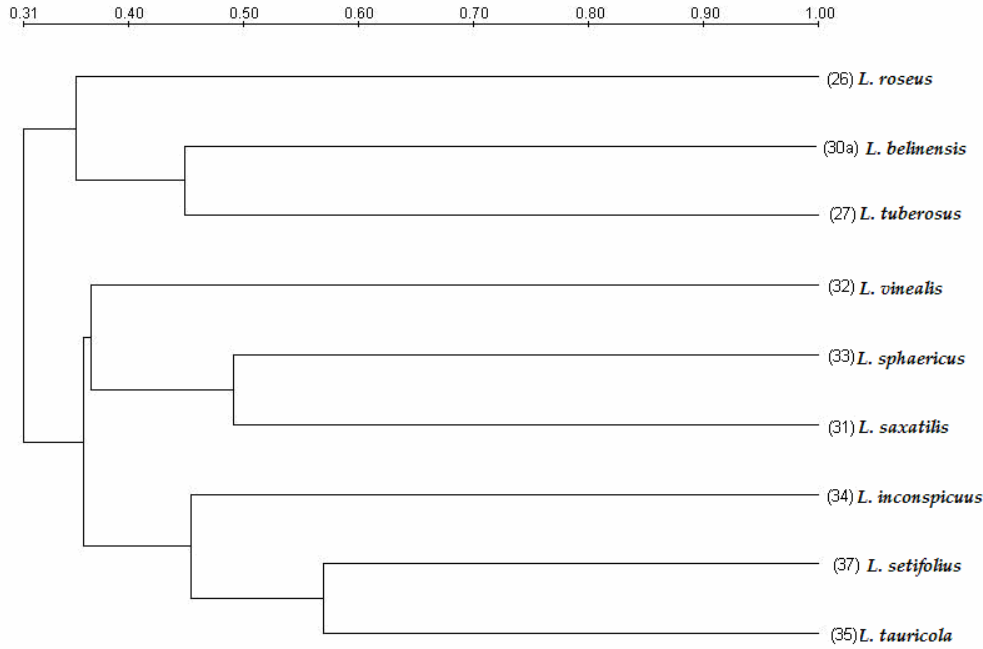
Şekil 8.6. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin A örneklerine göre oluşturulan dendrogram

Globulin A proteinlerine göre ise ilk kümeyi *L. tauricola*, *L. setifolius*, *L. sphaericus*, *L. saxatilis*, *L. inconspicuus*, *L. vinealis* ikinci kümeyi ise *L. tuberosus*, *L. belinensis* ve *L. roseus* oluşturmaktadır. *L. tauricola* ve *L. setifolius*'un tıpkı albumin fraksiyonunda olduğu gibi daha yakın akrabalığı söz konusudur. Ayrıca bu iki türe *L. sphaericus* benzerlik göstermektedir. *L. saxatilis* ile *L. inconspicuus*'un globulin A protein bandları benzerlik göstermekte yine bu iki türe en yakın band profiline sahip olan türün *L. vinealis* olduğunu görmekteyiz. *Lathyrus* seksiyonunun iki türü olan *L. tuberosus* ve *L. belinensis*'in de ikinci kümeyi oluşturdıkları *L. roseus*'un da bu iki türe akraba olduğunu görmekteyiz.



Şekil 8.7. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin globulin B örneklerine göre oluşturulan dendrogram

Bu türlere ait globulin B proteinlerine baktığımız zaman *L. vinealis*, *L. sphaericus*, *L. saxatilis*, *L. inconspicuus*, *L. tauricola* ve *L. setifolius*'un ilk kümeyi oluşturduğunu, *L. roseus*, *L. tuberosus* ve *L. belinensis*'in de ikinci kümenin elemanları olduğunu görmekteyiz. Ancak *L. roseus*'un *L. tuberosus*'la benzerlik gösterdiğini görmekteyiz. Yine *L. vinealis*, *L. sphaericus* ile benzerlik göstermekte ve bu iki türe en yakın band profilini ise *L. saxatilis* taşımaktadır. Benzer şekilde *L. inconspicuus* ile *L. tauricola* benzer protein bandlarına sahiplerken bu iki türe en yakın band profilini ise *L. setifolius* taşımaktadır.



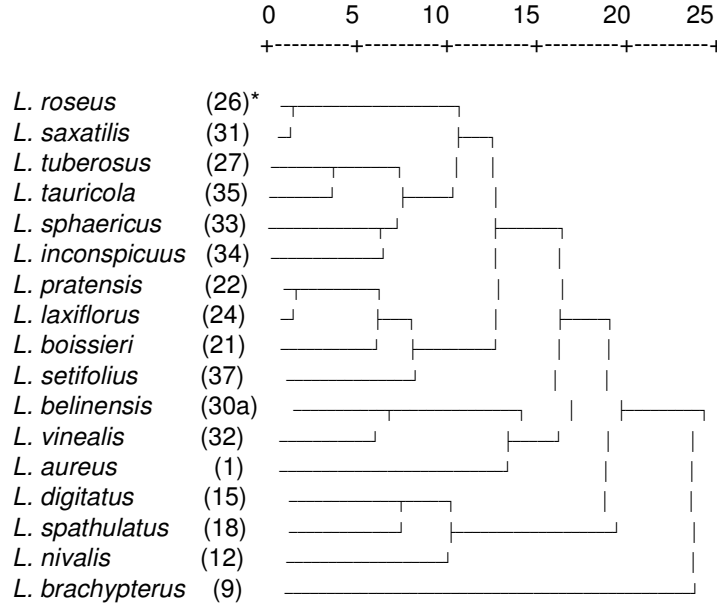
Şekil 8.8. *Orobon*, *Lathyrus* ve *Orobastrum* seksiyonlarına ait bazı türlerin glutelin örneklerine göre oluşturulan dendrogram

Glutelin fraksiyonlarına baktığımız zaman ise globulin B'ye benzer sonuçlar görmekteyiz. İlk kümede *L. tauricola* ise *L. setifolius* birbirlerine daha benzerlik gösterirken *L. inconspicuus* ise bu iki türle birlikte kümelenmektedir. Aynı şekilde *L. saxatilis*, *L. sphaericus* ve *L. vinealis* benzer band profili göstermekte ancak *L. saxatilis* ile *L. sphaericus*, *L. vinealis*'e göre daha yakın benzerlik göstermektedir. İkinci kümede ise *L. tuberosus* ile *L. belinensis* birlikte kümelenmekte ve dendrogramda *L. roseus* ise bu iki türle birlikte yer almaktadır.

Floraya bakıldığında *Lathyrus* seksiyonu ile *Orobus* seksiyonu arasında bir yerde olan ve çok farklı bir tür olduğu belirtilen *L. roseus*'un elektroforetik band profillerinin *Lathyrus* seksiyonuna ait *L. tuberosus* ve *L. belinensis*'e benzer olduğunu görmekteyiz [3]. Ancak Bağcı ve Şahin tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada ise *L. roseus*'un yağ asidi kompozisyonunun *Lathyrus* seksiyonunun üyesi olan *L. tuberosus*'unda dahil olduğu çalışılan diğer türlerden farklı olduğu bulunmuştur [139]. Yine sistematik pozisyonu şüpheli olan *L. saxatilis*'in band profillerine baktığımız zaman *Orobastrum* seksiyonunun üyeleri olan *L. vinealis*, *L. inconspicuus* ve *L. sphaericus*'a daha yakın olduğu görülse de Bağcı ve Şahin (2004) yaptıkları çalışmada *L. saxatilis*'in yağ asidi kompozisyonunun çalışılan *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinden (*L. vinealis*, *L. sphaericus*, *L. inconspicuus* ve *L. setifolius*) farklı olduğunu bulmuşlardır [139]. Ayrıca Şahin ve Altan (1990) tarafından yapılan *L. saxatilis*, *L. vinealis*, *L. inconspicuus* ve *L. setifolius*'un karyotip analizleri sonucunda da *L. saxatilis*'in diğer üç türden farklı karyolojik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur [5]. Kupicha (1983) ise *L. saxatilis*'i

Orobastrum seksiyonundan çıkarıp *Viciopsis* seksiyonu adı altında monotipik bir seksiyona dahil etmiştir [4]. Ayrıca Flora’da yaprakçık sayıları farklı olmasına rağmen yakın akraba oldukları belirtilen *L. sphaericus* ile *L. vinealis*’in tohum depo proteini alt fraksiyonlarının elektroforez görüntülerine baktığımız zaman bu iki türün globulin B proteinlerinin benzer olduğunu ve dendogramda birlikte kümelenediklerini yine glutelin örneklerinin de globulin B kadar olmasa da benzer olduğunu görmekteyiz. Ancak albumin ve globulin A proteinlerinde ise farklılığın arttığını ve dendogramda bu yüzden farklı pozisyonlarda yer aldıklarını görmekteyiz. Yapılan çalışmayla bu iki türün oleik asit (C18:1 n-9) kompozisyonları dışında diğer yağ asidi kompozisyonlarının da oldukça benzer olduğu belirtilmiştir [139]. *Orobastrum* seksiyonunun iki üyesi olan *L. tauricola* ve *L. setifolius* ise globulin B örnekleri dışında diğer üç depo proteinine göre sürekli dendogramda birlikte yer almışlardır. Genç ve Şahin (2001) *L. tauricola* ve *L. setifolius*’un karyotip analizlerini yapmış ve *L. tauricola* ile *L. setifolius*’un sadece III. kromozomlarında farklılık olduğunu bulmuşlardır [140]. *L. tauricola*’nın III. kromozomu median iken *L. setifolius*’un aynı kromozomu ise submedian olarak tespit edilmiştir [140]. *L. inconspicuus* ise albumin proteinlerine göre dendogramda *L. vinealis* ile globulin A proteinlerine göre de dendogramda *L. saxatilis* ile daha çok benzerlik göstermesine rağmen globulin B ve glutelin örneklerine göre ise *L. tauricola* ve *L. setifolius* ile benzerlik göstermektedir. Bağcı ve Şahin (2004) *L. inconspicuus*’un özellikle doymuş yağ asidi ve tekli doymamış yağ asidi (oleik asit) kompozisyonunun *Orobastrum* seksiyonunun diğer üyelerinden (*L. saxatilis*, *L. vinealis*, *L. sphaericus*, *L. setifolius*) farklı olduğunu bulmuşlardır [139]. Aynı çalışmada *L. setifolius*’un yağ asidi kompozisyonu bakımından da kısmen *L. vinealis* ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur [139]. Ancak tohum depo proteinleri incelendiğinde *L. setifolius*’un *L. vinealis* ile düşük oranda benzerlik gösterdiğini görmekteyiz.

Aynı zamanda *L. belinensis*, *L. tauricola* ve *L. setifolius* dışındaki diğer türlerin globulin B ve glutelin band profilleri benzerlikler göstermektedirler. Örneğin ortalama 65 kDa’luk protein bandı globulin B ve glutelin proteinlerinin her ikisi için de çalışılan taksonlarda aynı yoğunluktadır. Aynı şekilde globulin B ve glutelin proteinlerinin 53 kDa’luk protein bandı da çalışılan taksonlarda benzer yoğunluktadır. Aynı zamanda 45 kDa, 35 kDa ve 32 kDa’luk protein bandları için de benzer durum söz konusudur.



Şekil 8.9. Rf değerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram (*Taksonların yanında parantez içerisinde verilen numaralar taksonların Flora'daki sıra numaralarıdır.)

Şekil 8.9'da ise tezdaki toplam on yedi taksona ait depo proteini alt fraksiyonlarının Rf değerleri kullanılarak SPSS 12.0 for Windows programı yardımıyla oluşturulan dendrogram verilmiştir. Dendrograma bakıldığı zaman üç ayrı kümenin oluştuğunu görmekteyiz. Birinci kümede *L. roseus*, *L. saxatilis*, *L. tuberosus*, *L. tauricola*, *L. sphaericus*, *L. inconspicuus*, *L. pratensis*, *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus*, *L. boissieri*, *L. setifolius*'un olduğunu görmekteyiz. İkinci kümede ise *L. belinensis*, *L. vinealis* ve *L. aureus* yer almaktadır. *L. digitatus*, *L. spathulatus*, *L. nivalis* ise üçüncü kümeyi oluşturmaktadır. Poliploid bir takson olan *L. brachypterus* var. *brachypterus* ise bu üç kümenin dışında kalmaktadır.

İlk kümede *L. tuberosus* ve *L. tauricola*'nın, *L. sphaericus* ile *L. inconspicuus*'un birbirine daha yakın olduğunu görmekteyiz. Sistematik pozisyonu şüpheli olarak tanımlanan *L. saxatilis* ile çok farklı bir tür olarak ifade edilen ve *Lathyrus* seksiyonu ile *Orobis* seksiyonu arasında bir yerde bulunan *L. roseus* ise yine ilk kümede birlikte yer almışlardır [3]. İlk kümede yer alan ve *Pratensis* seksiyonunun üyeleri olan *L. pratensis* ile *L. laxiflorus* subsp. *laxiflorus* oldukça fazla benzerlik sergilemişler ve ayrıca bu iki taksona *L. boissieri* ve *L. setifolius* benzerlik göstermişlerdir. İkinci kümenin elemanlarından *L. belinensis* ile *L. vinealis* dendrogramda birlikte yer almışlar ve bunlarla birlikte *L. aureus* kümelenmiştir. *Platystylis* seksiyonuna ait türler olan *L. digitatus*, *L. spathulatus* ve *L. nivalis* ise birlikte kümelenerek üçüncü kümeyi oluşturmuşlardır. Ancak *L. digitatus* ile *L. spathulatus* daha çok benzerlik göstermektedirler.

Sonuç olarak, bu doktora tezi birkez daha SDS-PAGE tekniğinin özellikle morfolojik sistematığa katkıda bulunan ve moleküler taksonomide faydalanılması gereken tekniklerden biri olduğunu göstermiştir. Ayrıca poliploid bir takson olan *L. brachypterus* var. *brachypterus*'un (2n:28) çok düşük çıkan albumin ve globulin A değerleri literatürlerde sıkça araştırması yapılan gen suskunluğuna iyi bir örnek teşkil etmektedir. Bundan başka, glutelin proteinlerinin elektroforetik band profillerinin globulin B proteinlerinin band profilleriyle benzerliği de tezimizde göze çarpan sonuçlardan biridir. Böylelikle bu sonuç, literatürlerde son zamanlarda dile getirilen ve klasik Osborne sınıflandırmasına alternatif olan glutelinlerin globulin proteinlerine dahil edilmesine ve depo poretinlerinin albuminler, globulinler ve prolaminler şeklinde sınıflandırılması fikrine destek sağlamaktadır. Ancak bundan sonra ise SDS-PAGE'e ilaveten Western Blot tekniğiyle ilgili çalışmalar, izozimlerin elektroforeziyle ilgili çalışmalar, ya da RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA; Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Kesilmiş Fragmentlerin Uzunluğundaki Polimorfizm; Restriction Fragment Length Polymorphism) gibi çalışmaların yapılması sistematik problemlerin çözülmesine büyük katkı sağlayacaktır. Aynı zamanda elde edilen SDS-PAGE jellerindeki tüm türlerde bulunan ortak protein bandlarının amino asit dizilerinin tayini yapılarak uygulamalar daha da ileriye götürülebilir.

KAYNAKLAR

1. Genç, H., 1997, Batı Akdeniz ve güney Ege bölgesinde yetişen bazı *Lathyrus* L. türleri üzerinde sitotaksonomik araştırmalar, Doktora tezi Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 93s.
2. El-Shanshoury, A.R., 1997, The use of seed proteins revealed by SDS PAGE in taxonomy and phylogeny of some *Lathyrus* species, *Biologia Plantarum*, 39, 4, 553-559.
3. Davis, P.H., 1970, *Lathyrus* L. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol.3., Edinburgh University Press, Edinburgh.
4. Kupicha, F.K., 1983, The infrageneric structure of *Lathyrus*. *Notes RBG Edinburg*, 41, 29, 209-244.
5. Şahin, A., Altan, Y., 1990, Türkiye'nin bazı *Lathyrus* L. türleri [*L.saxatilis* (Vent.) Vis., *L. vinealis* Boiss&Noe, *L. inconspicuus* L., *L. setifolius* L.] üzerinde sitotaksonomik araştırmalar, *Doğa J. of Botany*, 15, 50-56.
6. Ayaz, F.A., Inceer, H. and Hayırlıoğlu-Ayaz, S., 1999, An electrophoretic analysis of the seed proteins of some *Vicia* L. species from northeast Anatolia (Turkey), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2, 4, 1139-1142.
7. Kamel, E.A., Hassan, H.Z. and Ahmed, S.M., 2003, Electrophoretic characterization and the relationship between some Egyptian *Cruferae*, *Online Journal of Biological Sciences*, 3, 9, 834-842.
8. Acık, L., Ekici, M., Celebi, M., 2004, Taxonomic relationships in *Astragalus* sections *Hololeuce* and *Synochreati* (Fabaceae): evidence from RAPD-PCR and SDS-PAGE of seed proteins, *Ann. Bot. Fennici*, 41, 305-317.
9. Jha, S.S, Ohri, D., 2002, Comparative study of seed protein profiles in the genus *Pisum*, *Biologia Plantarum*, 45, 4, 529-532.
10. Przybylska, J., Przybylska, Z.Z., 1993, Electrophoretic seed albumin patterns in the cultivated *Phaseolus* species: albumin variants with trypsin inhibitory activity, *Genetica Polonica*, 34, 1, 15-25.
11. Przybylska, J., Przybylska, Z.Z., Krajewski, P., 1999, Diversity of seed albumins in some *Lathyrus* species related to *L. sativus*: An electrophoretic study, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 46, 3, 261-266.
12. Przybylska, J., Przybylska, Z.Z., Krajewski, P., 2000, Diversity of seed globulins in *Lathyrus sativus* L. and some related species, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 3, 239-246.

13. Emre, İ., Turgut-Balık, D., Genç, H. and Şahin, A., 2006, The use of seed proteins revealed by SDS-PAGE in taxonomy of some *Lathyrus* L. species grown in Turkey, Pakistan Journal of Biological Sciences, 9, 12, 2358-2361.
14. Aiken, S.G., Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Wilson, B.L., Consaul, L.L., 1998, Implications from SDS-PAGE analyses of seed proteins in the classification of taxa of *Festuca* and *Lolium* (Poaceae), Biochemical Systematics and Ecology, 26, 511-533.
15. Sales, M.P., Gerhard, I.R., Grossi-de-Sa, M.F. and Xavier-Filho, J., 2000, Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids, Plant Physiology, 124, 515-522.
16. Rosa, M.J.S., Ferreira, R.B. and Teixeira, A.R., 2000, Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds, J. Agric. Food Chem, 48, 5432-5439.
17. Duenas, M., Hernandez, T., Estrella, I., 2006, Assesment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents, Food Chemistry, 98, 95-103.
18. Mandal, S. and Mandal, R.K., 2000, Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering, Current Science, 79, 5, 576-586.
19. Cronquist, A., 1968, The evolution and classification of flowering plants, London.
20. Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005, *Legumes of the World*, Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
21. Summerfield, R.J. and Roberts, E.H., 1985, *Grain legume crops*, Collins Pub., London, UK.
22. Alkin, R., Goyder, D.J., Bisby, F.A., White, R.J., 1986, *Names and Synonyms Species and subspecies in the Viciae*, Issue 3 Database Project, Experimental Taxonomic Information Products, Publication No 7., University of Southampton, Southampton.
23. Ertekin, S.A., Saya, O., 1990, A new record for the Flora of Turkey, Turk. J. Bot., 15, 1, 75-77.
24. Ertekin, S.A., 1994, A new record for the Flora of Turkey, Turk. J.Bot., 18, 1, 33-34.
25. Davis, P.H., Mill, R.R., Kit, T., 1988, *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol.10, Edinburgh University Press, Edinburgh.
26. Maxted, N., Goyder, D.J., 1988, A new species of *Lathyrus* Sect. *Lathyrus* (*Leguminosae*, *Papilionodeae*) from Turkey, Kew Bulletin, 43, 4, 711-714.
27. Güner, F., Özhatay, N., 2000, *Lathyrus* L. in Güner A, Özhatay N, Ekim, T, Baser KHC. eds. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 11., Edinburgh University, Press, Edinburgh.

28. Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F. and Young, N.D., 2005, Legumes as a model plant family, Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference, *Plant Physiology*, 137, 1228-1235.
29. Duranti, M., 2006, Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia*, 77, 67-82.
30. Rego, E.J.L., de Carvalho, D.D., Marangino, S., de Oliveira, B., Novello, J.C., 2002, Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox), *Phytochemistry*, 60, 441-446.
31. Bardocz, S., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.J., Pusztai, A. and Pryme, I.F., 1995, Effect of PHA on intestinal cell proliferation and tumor growth: role of polyamines, Abstracts of the 16th International Lectin Meeting, p.49.
32. Valentiner, U., Fabian, S., Schumacher, U., Leathem, A.J., 2003, The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro, *Anticancer Res.*, 23, 2B, 1197-206.
33. Hanbury, C.D., White, C.L., Mullan, B.P., Siddique, K.H.M., 2000, A review of the potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed, *Animal Feed Science and Technology*, 87, 1-27.
34. Goldberg, R.B., Barker, S.J., and Grald, P., 1989, Regulation of gene expression during plant embryogenesis, *Cell*, 56, 149-160.
35. Barrat, D.H.P., Whitford, P.N., Cook, S.K., Butcher, G. and Wang, T.L. 1989, An analysis of seed development in *Pisum sativum* L. VIII. Does abscisic acid prevent precocious germination and control storage protein synthesis? *J.Exp.Bot.*, 40, 1009-1014.
36. Dasgupta, S. and Mandal, R.K., 1993, Compositional changes and storage protein synthesis in developing seeds of *Brassica campestris*, *Seed Sci. Technol.*, 21, 291-299.
37. Millerd, A., 1975, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26, 56-72.
38. Fukushima, D., 1991, Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology, and nutrition, *Food Rev. Int.*, 7, 3, 323-351.
39. Osborne, T.B., 1924, *The vegetable proteins*. Longmans Green, London.
40. Derbyshire, E., Wright, D.J., Boulter, D., 1976, Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds, *Phytochemistry*, 15, 3-24.
41. Higgins, T.J.V., 1984, Synthesis and regulation of major proteins in seeds, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 191-221.
42. Shewry, P.R., Napier, J.A. and Tatham, A.S., 1995a, Seed storage proteins: structures and biosynthesis, *The Plant Cell*, 7, 945-956.

43. Yunes, A.N. A, Andrade, M.T., Sales, M.P., Morais, R.A., Fernandes, K.V.S., Gomes, V.M. and Xavier-Filbo, J., 1998, Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)), J. Sci Food Agric, 76, 111-116.
44. Octavia, P.L., 1999, *Molecular biotechnology for plant food production*. Technomic Publishing Company, Inc. Lancaster; Pennsylvania, USA, 416-417.
45. Lindsey, K., 1998, *Transgenic Plant Research*. OPA
46. Herman, E.M. and Larkins B.A., 1999, Protein bodies and vacuoles, The Plant Cell, 11, 601-613.
47. Herman, E.M., 1994, Multiple origins of intravacuolar protein accumulation of plant cells, Adv. Struct. Bot., 3, 244-283.
48. Shewry, P.R., 1995b, Plant storage proteins, Biol. Rev., 70, 375-426.
49. Muench, D.G., Okita, T.W, 1997, *The storage proteins of rice and oat*. In: Larkins, B.A., Vasill, K (eds), Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
50. Nielsen, N.C., Bassüner, R., Beaman, T., 1997, *The biochemistry and cell biology of embryo storage proteins*. In: Larkins B.A., Vasill, I.K. (eds.), Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
51. Galili, G., 1997, *The prolamin storage proteins of wheat and its relatives*. In: Larkins B.A., Vasill, I.K. (eds.), Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
52. Müntz, K., 1998, Deposition of storage proteins, Plant Molecular Biology, 38, 77-99.
53. Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. and Akazawa, T., 1985, Biosynthesis and intracellular transport of 11S globulin in developing pumpkin cotyledons, Plant Physiol., 77, 747-752.
54. Larkins, B.A. and Hurkman, W.J., 1978, Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm, Plant Physiol., 62, 256-263.
55. Li, X., Franceschi, V., and Okita, T.W., 1993a, Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells, Cell, 72, 869-879.
56. Li, X., Wu, Y., Zhang, D.Z., Gillikin, J.W., Boston, R.S., Franceschi, V.R. and Okita, T.W., 1993b, Rice prolamin protein protein body biogenesis: A BIP-mediated process, Science, 262, 1054-1056.
57. Rubin, R., Levanony, H., and Galili, G., 1992, Characterization of two types of protein bodies in developing wheat endosperm, Plant Physiol., 99, 718-724.

58. Rechinger, K.B., Simpson, D.J., Svendsen, I., and Cameron-Mills, V., 1993, A role for $\gamma 3$ hordein in the transport and targeting of prolamin polypeptides to the vacuole of developing barley endosperm, *Plant J.*, 4, 841-853.
59. Von Heijn, G., 1984, How signal sequences maintain cleavage specificity, *J. Mol. Biol.*, 173, 243-251.
60. Bowles, D.J., Pappin, D.J., 1988, Traffic and assembly of concanavalin, *Trends Biochem. Sci.*, 13, 60-64.
61. Sonnewald, U., Strum, A., Chrispeels, M.J., Willmitzer, L., 1989, Targeting and glycosylation of patatin in the major potato tuber protein in leaves of transgenic tobacco, *Planta*, 179, 174-180.
62. Sonnewald, U., Schaewen, A., Willmitzer, L., 1990, Expression of mutant patatin protein in transgenic tobacco plants: role of glycans and intracellular location, *Plant Cell*, 2, 345-355.
63. Ballini, R., Vitale, A. and Chrispeels, M.J., 1983, *In vivo* and *in vitro* processing of seed reserve protein in the endoplasmic reticulum: Evidence for two glycosylation steps, *J. Cell Biol.* 96, 999-1007.
64. Faye, L., Johnson, K.D., Sturm, A. and Chrispeels, M.J., 1989, Structural biosynthesis and function of asparagine-linked glycans on plant proteins, *Physiol. Plant*, 75, 309-314.
65. Chrispeels, M.J., 1991, Sorting of proteins in the secretory system, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 42, 21-53.
66. Duranti, M., Guerrieri, N., Takashi, T., Cerletti, P., 1988, The legumin-like storage protein of *Lupinus albus* seeds, *Phytochemistry*, 27, 15-23.
67. Duranti, M., Horstman, C., Gilray, J., Cray, R.R.D., 1995, The molecular basis of N-glycosylation in the 11S globulin (legumin) of lupin seeds, *J. Protein Chem*, 14, 107-110.
68. Sturm, A., 1995, *N-glycosylation of plant proteins*. in Montreuil J., Schacter, H., Vliegenthart, JFG(eds). *Glycoproteins. Comprehensive Biochemistry 29A*, 521-541. Elsevier, Amsterdam.
69. Lupattelli, F., Pedrazzini, E., Bollini, R., Vitale, A., 1997, The rate of phaseolin assembly is controlled by the glucosylation state of its-linked oligosaccharide chains, *Plant Cell*, 9, 597-609.
70. Shewry, P.R., Tahtam, A.S., 1990, The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution, *Biochem. J.*, 267, 1-12.
71. Coleman, C.E., Dannenhoffer, J.M., Larkins, B.A., 1997, *The prolamin proteins of maize, sorghum and Coix*. In: Larkins, B.A., Vasill, K. (eds), *Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

72. Zhang, F., Boston, R.S., 1992, Increases in binding protein (BIP) accompany changes in protein body morphology in three high-lysine mutants of maize, *Protoplasma*, 171, 142-152.
73. Chrispeels, M.J., Higgins, T.J.V., Craig, S. and Spencer, D., 1982a, Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons, *J. Cell Biol.*, 93, 5-14.
74. Chrispeels, M.J., Higgins, T.J.V. and Spencer, D., 1982b, Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons, *J. Cell Biol.*, 93, 306-313.
75. Ceriotti, A., Pedrazzini, E., Bielli, A., Giovino, G., Bollini, R. and Vitale, A., 1995, Assembly and intracellular transport of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L., *J. Plant Physiol.*, 145, 648-653.
76. Barton, K.A., Thompson, J.F., Madison, J.T., Rosenthal, R., Jarvis, N.P., Beachy, R.N., 1982, The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin subunits, *J. Biol. Chem.*, 257, 6089-6095.
77. Pedrazzini, E., Giovino, G., Bielli, A., Virgilio, M., Frigerio, L., Pesca, M., Faoro, F., Ballini, R., Ceriotti, A., Vitale, A., 1997, Protein quality control along the route to the plant vacuole, *Plant Cell*, 9, 1869-1880.
78. Gatehouse, J.A., Lycett, G.W., Croy, R.R.D., Boulter, D., 1982, The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (*Pisum sativum* L.), *Biochem J.*, 207, 629-632.
79. Gatehouse, J.A., Lycett, G.W., Delauney, A.J., Croy, R.R.D., Boulter, D., 1983, Sequence specificity of the post-translational proteolytic cleavage of vicilin, a seed storage protein of pea (*Pisum sativum* L.), *Biochem J.*, 212, 427-432.
80. Chrispeels, M. and Herman, E.M., 2000, Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles, *Plant Physiology*, 123, 1227-1233.
81. Okamoto, T., Minamikawa, T., 1998, A vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP) that digests seed storage globulin: characterization, regulation of gene expression and post-translational processing, *J. Plant Physiol.*, 152, 675-682.
82. Toyooka, K., Okamoto, T., Minamikawa, T., 2000, Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by ER-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds, *J. Cell Biol.*, 148, 3, 453-464.
83. Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F., Gietl, C., 1998, A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment, *Planta*, 206, 466-475.

84. Holwerda, BC., Galvin, N.J., Baranski, .T.J., Rogers, J.C., 1990, In vitro processing of aleurain, a barley vacuolar thiol protease, *Plant Cell*, 2, 1091-1106.
85. Clercq, AD., Vandewiele, M., Damme, J.V., Guerche, P., Montago, M.V., Vandekerckhove, J. and Krebbers, E., 1990, Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants, *Plant Physiol*, 94, 970-979.
86. Teuber, S.S., Dandekar, A.M., Peterson, W.R., Sellers, C.L., 1998, Cloning and sequencing of a gene encoding a 2S albumin seed storage protein precursor from English walnut (*Juglans regia*), a major food allergen, *J Allergy Clin Immunol.*, 807-808.
87. Hudson, B.J.F., 1994, *New and developing sources of food proteins*. Chapman&Hall, UK
88. Krebbers, E., Herdeis, L., Clerco, A. D., Seurinck, J., Leemans, J., Damme, J.V., Segura, M., Gheysen, G., Van Montagu, M., Vandekerckhove, J., 1988, Determination of the processing sites of an *Arabidopsis* 2S albumin and characterization of the complete gene family, *Plant Physiol.*, 87, 4, 859-866.
89. Larkins, B.A. and Vasil, I.K., 1997, *Cellular and molecular biology of plant seed development*, Kluwer Academic Publishers.
90. Regente, M. and Canal, L.D., 2001, Are storage albumins also defensive proteins? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, 275-276.
91. Osborne, T.B., Campbell, G.F., 1898, Proteins of the pea, *J. Am. Chem. Soc.*, 20, 348-362.
92. Danielson, C.E., 1949, Seed globulins of the *Gramineae* and *Leguminosae*. *Biochem. J.*, 44, 387-400.
93. Ribeiro, A.C., Teixeira, A.R. and Ferreira, R.B., 2004, Characterization of globulins from common vetch (*Vicia sativa* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4913-4920.
94. Stöger, E., Parker, M., Christou, P. and Casey, R., 2001, Pea legumin overexpressed in wheat endosperm assembles into an ordered paracrystalline matrix, *Plant Physiology*, 125, 1732-1742.
95. Baumlein, H., Wobus, U., Pusteli, J. and Kafatos, C.F., 1986, The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element, *Nucleic Acids Research*, 14, 6, 2707-2708.
96. Duranti, M., Gius, C., 1997, Legume seed protein content and nutritional value, *Field Crop Research*, 53, 31-45.
97. Blobel, G. and Dobberstein, B., 1975, Transfer of protein accross membrane. Part 1: presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membranes bound ribosomes of murine myeloma, *J. Cell Biol.*, 67, 835-851.

98. Müntz, K., Bassiner, R., Lichtenfeld, C., Scholz, G. and Weber, E., 1985, Proteolytic cleavage of storage proteins during embryogenesis and germination of seeds, *Physiol. Veg.*, 23, 75-94.
99. Gatehouse, J.A., Croy, R.R.D. and Boulter, D., 1984, The synthesis and structure of pea storage proteins, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1, 287-314.
100. Müntz, K., 1989, Intracellular protein sorting and the formation protein reserves in storage tissue cells of plant seeds, *Physiol. Veg.*, 23, 75-84.
101. Nielsen, N.C., Dickinson, C.D., Cho, T.J., Thanh, V.H., Scallon, B.J., Fisher, R.L., Sims, T.L., Drews, G.N., Goldberg, R.B., 1989, Characterization of the glycinin gene family in soybean, *Plant Cell*, 1, 313-328.
102. Duranti, M., Guerrieri, N., Cerletti, P. and Vecchio, 1992, The legumin precursor from white lupin seed, *Eur. J. Biochem.*, 206, 941-947.
103. Breiteneder, H. and Radauer, C., 2004, A classification of plant food allergens, *J. Allergy Clin Immunol.*, 113, 5, 821-825.
104. Sathe, S.K., 2002, Dry bean protein functionally, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 2, 175-223.
105. Thanh, V.H and Shibasaki, K., 1979, Major proteins of soybean seeds. Reversible and irreversible dissociation of β -conglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, 27, 805-811.
106. Müntz, K., Jung, R. and Saalbach, G., 1993, *Synthesis, processing and targeting of legume seed proteins*. In seed storage compounds: biosynthesis, interactions, and manipulation, P.R. Shewry and A.K. Stobart, eds., Oxford, Oxford University Pres, 128-146.
107. Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrova, R.J. and Colman, P.M., 1994, Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins, *J. Mol Biol.*, 238, 748-776.
108. Gibbs, E.M.P., Strongin, K.B. and McPherson, A., 1989, Evolution of legume seed storage proteins-A domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins, *Mol. Biol. Evol.*, 6, 6, 614-623.
109. Slightom, J.L., Sun, S.M. and Hall, T.C., 1983, Complete nucleotide sequence of a French bean storage protein gene: phaseolin, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 80, 1897-1901.
110. Harada, J.J., Barker, S.J., and Goldberg, R.B., 1989, Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes, *Plant Cell*, 1, 415-425.

111. Mullins, I. M., 1999, Evolutionary relationship in *Oryza* inferred from the gene that encodes the 10 kDa prolamin (seed storage proteins) polypeptide, Masters's thesis, Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.
112. Shewry, P.R. and Halford, N.G., 2002, Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization, *Journal of Experimental Botany*, 53, 370, 947-958.
113. Shewry, P.R., and Halford, N.G, The prolamin storage proteins of Sorghum and Millets.[<http://www.afripro.org.uk/papers/Paper03Shewry.pdf#search=%22the%20prolamin%20storage%20proteins%20of%20sorghum%20and%20millets%22>; (28.09.2006)]
114. Katsube, T., Kurisaka, N., Ogawa, M., Maruyama, N., Ohtsuka, R., Utsumi, C., Takaiwa, F., 1999, Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice, *Plant Physiology*, 120, 1063-1073.
115. Zhao, W-M., Gatehouse, J.A., Boulter, D., 1983, The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains; homology to pea legumin, *FEBS*, 162, 1, 96-102.
116. Takaiwa, F., Kikuchi, S., Oono, K., 1986, The structure of rice storage protein glutelin precursor deduced from cDNA, *FEBS* (4040), 206, 1, 33-35.
117. Vaz, A.C., Pinheiro, C., Martins, J.M.N., Ricardo, C.P.P., 2004, Cultivar discrimination of Portuguese *Lupinus albus* by seed protein electrophoresis: the importance of considering "glutelins" and glycoproteins, *Field Crops Research*, 87, 23-34.
118. Takaiwa, F., Ebunima, H., Kikuchi, S. And Oono, K., 1987, Nucleotide sequence of a rice glutelin gene, *FEBS*, 221,1, 43-47.
119. Okita, T.W., Hwang, Y.S., Hnilo, J., Kim, W.T., Aryan, A.P., Larson, R., Krishnan, H.B., 1989, Structure and expression of the rice glutelin multigene family, *The Journal of Biochemical Chemistry*, 264, 21, 12573-12580.
120. Reeves, C.D. and Okita, T.W., 1987, *Gene*, 52, 257-266.
121. Shotwell, M.A. and Larkins, B., 1989, *The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise* (Marcus, A. eds.), 15, 296-345.
122. Kim, W.T. and Okita, T.W., 1988, *Plant Physiol.*, 88, 649-655.
123. Campbell, M.K. and Farrell, S.O., 2003, *Biochemistry*. Fourth edition, Thomson learning, Inc., USA.
124. Ertan, H. and Arda, N., 1999, *Proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılması*. (Editörler: Prof. Dr. Güler Temizkan, Yard. Doç. Dr. Nazlı Arda). Bölüm 7, 153-172.
125. Aslan, A., 2004, Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin analizi, Yüksek Lisans Semineri, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

126. <http://www.bio.mtu.edu/campbell/bl482/lectures/lec4/482lec4.pdf#search=%22BL483%20BASIC%20BIOCHEMICAL%20TECHNIQUES%22> (28.09.2006).
127. Karp, G., 1996, *Cell and molecular biology*. (concepts and experiments), JohnWiley&Sons.Inc., NewYork.
128. Berg, J.M., Tymoczka, J.L., Stryer, L., Clarke, N.D., 2002, *Biochemistry*, Fifth edition, W.H.Freeman and Company, New York.
129. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature* 227, 680-685.
130. Przybylska, J., Blixt, S., Hurich, J. and Zimniak-Przybylska, Z., 1977, Comparative study of seed proteins in the genus *Pisum* I. Electrophoretic patterns of different protein fractions, *Genetica Polonica*, 18, 1, 27-38.
131. Cai, R., Klamczynska, B. and Baik, B.-K., 2001, Preparation of bean curds from protein fractions of six legumes, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3068-3073.
132. Monsoor, M.A. & Yusuf, H.K.M., 2002, *In vitro* protein digestibility of lathyrus pea (*Lathyrus sativus*), lentil (*Lens culinaris*) and chick pea (*Cicer arietinum*), *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 97-99.
133. Freitas, R.L., Ferreira, R.B. and Teixeira, A.R., 2000, Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comprasions within the major classes of globulins, *Int. J. Food Sci Nutr.*, 51, 5, 341-352.
134. Freitas, R. L., Teixeira, A.R. and Ferreira, R.B., 2004, Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1682-1687.
135. Lawton-Rouh, A., 2003, Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 396-409.
136. Adams, K.L., Wendel, J.F., 2004, Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton, *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 573-581.
137. Wang, J., Tian, L., Lee, H.-S, Wei, N.E., Jiang, H., Watson, B., Madlung, A., Osborn, T.C., Doerge, R.W., Comai, L. and Chen, Z.J., 2006, Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids, *Genetics*, 172, 507-517.
138. Şahin, A., Genç, H. and Bağcı, E., 1998, Cytotaxonomic investigation on some *Lathyrus* L. species growing in West Meiterranean and Southern Aegean Regions I, *Acta Botanica Hungarica*, 41, 1-4, 229-241.

139. Bağcı, E. and şahin, A., 2004, Fatty acid patterns of the seed oils of some *Lathyrus* species L. (*Papilionideae*) from Turkey, a chemotaxonomic approach, Pak. J. Bot., 36 (2), 403-412.
140. Genç, H., şahin, A., 2001, Batı Akdeniz ve Güney Ege bölgesinde yetişen bazı *Lathyrus* L. türleri üzerinde sitotaksonomik araştırmalar III, S.D.Üniv. Fen Bil. Dergisi, 5, 1, 98-112.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: İrfan EMRE

Doğum yeri-tarihi: Elazığ/Keban-27.09.1977

Lisans: Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 1998

Yüksek Lisans: Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı, Moleküler Biyoloji bilim dalı, 2002

Doktora: 2003-2007 (Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı, Botanik bilim dalı)

Çalıştığı kurumlar:

1. Milli Eğitim Bakanlığı, Sınıf Öğretmeni (1999-2002 Şubat)
2. Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim dalı Araştırma Görevlisi (2002 Şubat, devam ediyor)