

**KONYA BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN
BAZI *VICIA L. (LEGUMINOSAE)* TÜRLERİNİN
TOHUM PROTEİN PROFİLLERİNİN SDS-PAGE
İLE BELİRLENMESİ**

Doç. Dr. Hüseyin DURAL

Şerife BEYAZBENLİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONYA BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI VICIA L. (*LEGUMINOSAE*)
TÜRLERİNİN TOHUM PROTEİN PROFİLLERİNİN SDS-PAGE İLE
BELİRLENMESİ**

**Şerife BEYAZBENLİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KONYA, 2006**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONYA BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI VICIA L. (*LEGUMINOSAE*)
TÜRLERİNİN TOHUM PROTEİN PROFİLLERİNİN SDS-PAGE İLE
BELİRLENMESİ**

Şerife BEYAZBENLİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez jüri tarafından 07. 03. 2006 tarihinde oy çokluğu / oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr. Hüseyin
DURAL**

.....
(DANIŞMAN)

**Prof. Dr. Kuddisi
ERTUĞRUL**

.....
(ÜYE)

**Yrd. Doç. Dr. Emine
ARSLAN**

.....
(ÜYE)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KONYA BÖLGESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI *VICIA* L. (*LEGUMINOSAE*) TÜRLERİNİN TOHUM PROTEİN PROFİLLERİNİN SDS-PAGE İLE BELİRLENMESİ

Şerife BEYAZBENLİ

Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin DURAL

2006, 30 sayfa

Jüri: Doç. Dr. Hüseyin DURAL

Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

Bu çalışmada, Konya bölgesindeki *Vicia* L. (*Leguminosae*) türlerinin tohum depo protein profilleri SDS-PAGE yöntemi ile belirlenmiştir. *V. cracca* subsp. *stenophylla*, *V. canescens* subsp. *gregaria*, *V. caesarea*, *V. erviliae*, *V. peregrina*, *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*, *V. narbonensis* var. *narbonensis*, *V. galilaea* ve *V. faba* türleri arasındaki genetik uzaklıklar hesaplanmış ve Sintax Jaccard bilgisayar programı ile dendrogramları çıkarılmıştır. *Vicia* türleri arasında polimorfizm SDS-PAGE yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *V. narbonensis* var. *narbonensis* ve *V. galilaea* Türkiye Florası'ndaki gibi birbirine oldukça yakın bulunurken aynı grupta yer alan *V. canescens* subsp. *gregaria* ve *V. caesarea* diğer *Vicia* türlerine oldukça uzak bulunmuştur. Protein profili *Vicia* türlerinin sınıflandırılmasında morfolojik incelemelere ilave olarak faydalı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Vicia*, SDS-PAGE, Protein profili

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION BY SDS-PAGE OF SEED PROTEIN PROFILE OF SOME *VICIA* L. (*LEGUMINOSAE*) SPECIES IN KONYA REGION

Şerife BEYAZBENLİ

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Hüseyin DURAL

2006, 30 Page

Jury: Doç. Dr. Hüseyin DURAL

Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN

In this study, seed store protein profiles of *Vicia* L. (*Leguminosae*) species were determined by SDS-PAGE methods in Konya. Genetic distances between *V. cracca* subsp. *stenophylla*, *V. canescens* subsp. *gregaria*, *V. caesarea*, *V. ervilia*, *V. peregrina*, *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*, *V. narbonensis* var. *narbonensis*, *V. galilaea* and *V. faba* species were calculated and dendrograms were obtained with the Sintax Jaccard computer program. Polymorphism between *Vicia* species were determined by using SDS-PAGE method. While *V. narbonensis* var. *narbonensis* and *V. galilaea* species are found rather close each other as determined by Davis in Flora of Turkey, *V. canescens* and *V. caesarea* that place in same group are founded rather far to other *Vicia* species as genetically. Protein profiling was founded useful method as an addition to the morphological investigations in the classification of the *Vicia* species.

Key words: *Vicia*, SDS-PAGE, Protein profile

ÖNSÖZ

Bu çalışmada SDS-PAGE yöntemi ile *Vicia* cinsine ait *V. cracca* subsp. *stenophylla*, *V. canescens* subsp. *gregaria*, *V. caesarea*, *V. ervilia*, *V. peregrina*, *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*, *V. narbonensis* var. *narbonensis*, *V. galilaea* ve *V. faba* türlerinin birbirine olan yakınlık derecelerini ve türler arası polimorfizmin derecesini ve SDS-PAGE tekniğinin sistematik açıdan önemini incelemeyi amaçladık.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden, çalışmalarımı büyük bir titizlikle yürüten ve hiçbir yardımı esirgemediye yetişmemi sağlayan tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Hüseyin DURAL'a içtenlikle teşekkür ederim. Bütün çalışmalarım da manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a, laboratuvar çalışmalarım da beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Sn. Yrd. Doç. Dr. Emine ARSLAN'a, tez yazımım da bana yardımcı olan Sn. Arş. Gör. Atilla ARSLAN'a ve arkadaşım Mehmet DEMİRALAY'a, sabır ve özveriyle daima yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER	vi
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1.Leguminosae Familyasının Özellikleri	4
2.1.1.Vicia L. cinsi özellikleri.....	4
2.1.1.1.V.cracca L. subsp. stenophylla Vel	5
2.1.1.2.V.canescens Lab. subsp. gregaria (Boiss.& Heldr.) Davis	6
2.1.1.3.V.caesarea Boiss. & Bal.	6
2.1.1.4.V.ervilia (L.) Willd.	7
2.1.1.5.V.peregrina L.	7
2.1.1.6.V.sativa L. subsp. nigra (L.) Ehrh. var. nigra	8
2.1.1.7.V.narbonensis L. var. narbonensis	9
2.1.1.8.V.galilaea Plitm. & Zoh.	10
2.1.1.9.V.faba L.	10
2.2.Protein Analizinde Kullanılan Elektroforetik Teknikler	10
2.2.1.Doğal Jel Elektforezi	11
2.2.2.Doğal Olmayan (Denatüre) Jel Elektforezi : SDS-PAGE.....	13
2.2.3.Düşük Molekül Ağırlıklı Poplipeptidlerin Elektforezi.....	16
2.2.4.İzoelektrik Odaklama ve İki Boyutlu Elektforez (2-DE).....	16
3.MATERYAL VE METOT	18
3.1.Materyal	18
3.2.Protein Profili Analizi	18
3.2.1.Protein İzolasyonu.....	18
3.2.2.Jelin Hazırlanması.....	19

3.2.3.İzole Edilen Proteinlerin Elektroforezi	20
3.2.4.Jellerin Değerlendirilmesi.....	20
4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	21
5.KAYNAKLAR.....	27

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
APS	Amonyum Persülfat
ark	Arkadaşları
kDa	Kilodalton
mA	miliamper
μ	mikron
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezis
TCA	Triklorasetik Asit
TEMED	N,N,N,N – Tetrametiletilendiamin
Tris	Tris (hidroksimetilaminometan)

1. GİRİŞ

Çalışma materyalini oluşturan *Vicia* L. cinsi'ne ait taksonlar *Leguminosae* familyası içinde yer almaktadır. *Leguminosae* familyasının ülkemizde 69 cinsi vardır ve bunlara ait takson sayısı 1128 olup, endemik tür takson sayısı 375'dir. Endemizm oranı %39.1'dir. *Vicia* L. cinsine ait tür sayısı 87'dir. Bunun 5 tanesi endemiktir. Endemizm oranı %8.5'dir (Davis 1988).

Vicia L. cinsinin birçok türü (*V. sativa*, *V. faba*, *V. ervilia* vb...) ülkemizde kültüre alınmıştır ve halen tarımı yapılmaktadır. Bu cinse ait türler arasında oldukça yüksek varyasyona rastlanılır, homolog varyasyon oldukça yaygındır, tür altı kategorilerdeki birey sayısı da oldukça yüksektir (Davis 1970).

Vavilov (1950), Türkiye'nin Adi fiğın (*Vicia sativa* L.) gen merkezi olduğunu belirtmektedir. Tamkoç ve Avcı (1997), yabancı kökenli fiğ hatları üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda, hatlar arasında bazı önemli özellikler bakımından farklılıklar olduğunu ve bunlardan faydalanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Legume tohumları, yüksek protein miktarı (20-50%) nedeniyle insan ve hayvan beslenmesinde önemlidir. Protein miktarı, geleneksel temel ürünlerden çok fazla etkili ve tahıl tohumlarında bulunan seviyenin iki katıdır (Ustimenko ve Bakumovsky 1983). Kuru *legumeler*, dünyanın birçok yerinde, günlük besinin önemli malzemesi ve az gelirli insanlar için çok önemli gıda kaynakları kabul edilmektedir (Bressani ve Elias 1979). *Leguminosae* tohumları, diğer ürünler ile sıra ile ekildiği zaman, bazı çevresel şartlar altında zararlı ot hastalık ve zararlı şeylerin oluş derecesini azaltır ve toprak verimliliğini artırabilir (Mwanamwenge ve ark 1998). Bugün Avrupa'da bakla ikinci yaygın olarak yetiştirilen *legume* kuru tohumudur. Avrupa, dünyanın dördüncü en büyük üreticisidir (FAO 2003).

Olgun bakla tohumları, protein, nişasta, selüloz ve minerallerin iyi bir kaynağıdır. Bakla, bakır, nikotinik asit, folat ve vitamin C ihtiva eder. Beklenildiği gibi bunların besleyiciliği çok fazla özellikle vitamin C, taze taneler içinde kurudan fazladır (Hamilton 2005) Bakla gelecekte insan ve hayvan gıdası için öneme sahip bir üründür. Gerçi baklanın dünyada 80'den fazla farklı tipinin, sadece 18'i (örneğin,

soya, kuru fasulye) yaygın olarak ekilebilmektedir (El-Tabey Shehata, 1992). Yüksek mahsul verme, küçük tohumlar, daha çok besinsel faktörler, yüksek adaptasyon yeteneği, modern tarımla, çiftçiler, yem ve yiyecek fabrikatörleri için bu bitkiyi daha çok çekici yapabilecek (Duc 1997).

Bununla beraber bakla batı ülkelerinde daha az tüketilmiştir. Onlar, Afrika, Asya ve Latin Amerika'nın fazlasıyla protein ve enerjide tek ana kaynağı olmuştur. Bakla, pahalı et ve balık proteinine iyi bir alternatiftir. Onların cazibeli noktaları, depolama ömrünün uzunluğu, ulaşımının kolaylığı ve çiftçiler için ucuz fiyatı olmuştur (Haciseferoğulları ve ark. 2003).

Türkiye'de 1999'da, 21.000 ha ekilebilmiştir. Toplam verim 39.000 ton ve verimlilik 1856 kg/ha olmuştur (SSI 2000).

Birçok tohum tabanlı sınıflandırma sadece tohum morfolojisi üzerindeki bir kaç özelliğe (şekil, renk, hilum uzunluk bağıntısı, hilum şekli vb.) bağlıdır. Bu özellikler türde genellikle ortaktır. Bu sebeptendir ki, tarlada yetişen *Vicia* örneklerini teşhis etmek için yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Piergiovanni ve Taranto 2005).

Nicel ve nitel protein analizleri, metabolizmanın işleyişi hakkında önemli ipuçları sağladığından, canlı ile ilişkili tüm temel bilim dallarında büyük yer tutmaktadır (Temizkan ve ark. 2004).

Yapı-fonksiyon-regülasyon ile ilgili araştırmalarda ve bazı aktivite belirleme çalışmalarında saf proteinlere gereksinim vardır. Ayrıca çeşitli endüstriyel üretim süreçleri ancak ileri derecede saflaştırılmış proteinlerle yürütülebilmektedir (Temizkan ve ark. 2004).

Kolay ve üretken bir metod olan tohum proteinlerinin elektroforetik analizi, güvenilir tohum analizi ve çok önemli ürünler için mevcut olan birçok ilgili literatür için genellikle denendi. Bazı *Vicia* türlerinin ayırım yapılmasında poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmıştır (Perrino ve ark. 1987; Lucchese ve ark. 1997).

Poliakrilamid jel tekniği, türleri ve kültürleri belirlemede değerli bir araçtır. Poliakrilamid jelin bize sağladıkları;

Her bir türün taksonları arasında varyasyonu teşhis etmek, kültürlerin daima artan sayılarının saflığını korumak, koleksiyon içinde iki veya daha çok morfolojik olmayan özdeş çoğalmalar olup olmadığını aynı elektroforetik teknik ile araştırmak, ürün üretiminin çoğalması ve miktar saptanması tedarik edilerek yabani akraba ve elde edilen soyun önemli özelliklerini kullanmaktır (Sammour 1991).

Tohum depo proteinlerinin elektroforetik markırları kullanılarak; kültürler arası teşhis etmeyi, tür kimliğini kontrol etmeyi, biyosistematik analize yardım etmeyi, türlerin filogenetik akrabalık ilişkisini araştırmayı sağlar. Ayrıca, tamamlanan değerlendirme ile ilgili bilgi meydana getirmek ve giriş bilgisi ile ona uyarak germplasm koleksiyonlarında materyalin genetik çeşitliliği bilgisini artırmak sağlanır (Sammour 1991).

Bu çalışmada SDS-PAGE yöntemi ile *Vicia* L. cinsine ait, *V. cracca* subsp. *stenophylla*, *V. canescens* subsp. *gregaria*, *V. caesarea*, *V. ervilia*, *V. peregrina*, *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*, *V. narbonensis* var. *narbonensis*, *V. galilaea* ve *V. faba* türlerinin birbirine olan yakınlık derecelerini ve türler arası polimorfizmin derecesini ve SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) tekniğinin sistematik açıdan önemini incelemeyi amaçladık.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Leguminosae* Familyasının Özellikleri

Odunsu yada otsudurlar. Yapraklar, alternate dizilişli, genellikle stipullu, bipinnate, basit pinnate, digitate, trifoliate yada basitdir. Çiçekler, actinomorf yada zygomorf simetrilidir, hypogin (ovaryum üst durumlu) yada bazen perigin (ovaryum alt durumlu) dır. Genellikle hermafroditdirler ve rasem halindedirler. Spika yada umbel yada tek tek çıkarlar. Sepal (4-)5. Petaller (1-)5, kanat yada imbricate şeklinde birleşmiş bazen serbest yada nadiren kısmi olarak yakınlaşmıştır. Stamen 4- çok, genellikle 10, hepsi bir tüp şeklinde birleşmiş (monodelphous) yada en üstteki stamen ayrı, diğerleri tüp şeklinde birleşmiş (diadelphous) dirler. Bazen de hepsi serbest olabilir. Karpel 1 superior, marginal plasentalanma vardır. Meyva bir legume dir (Hem ventral hem de dorsal olarak birleşmiş uzunca açılan bir meyvedir). Tohumlar bir yada daha çoktur (Davis 1970).

2.1.1. *Vicia* L. Cinsi Özellikleri

Tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık bitkilerdir. Salgı tüyleri yoktur. Gövdeleri kanatsız, sıklık tırmanıcıdır. Yapraklar genellikle paripinnat ve tendril yada bir mukro ile sonlanır. Yapraklar nadiren imparipinnatdır. Yaprakçıklar bir ya da çok çiftten oluşur. Yaprak kenarları düz ya da nadiren dişlidir. Damarlanma anastomosing'dir. Stipul düz ya da dişli, koyu nektarium bölgeleri olabilir yada olmaz. Çiçekler, bir aksilden çıkan rasemdir yada tek tek çıkar. Kaliks düzenliden, iki dudaklıya kadar değişebilir. Kalikte kese olabilir. Kaliks dişleri eşit uzunlukta olabilir ve yapraksı değildir. Çiçekte kayıkçık, bayrakçılarla birleşik yada ayrıktır. Stilin tepe kısmı pubescent tüylü yada sadece aşağı kısmı üzerinde sakalsı tüyler vardır. Bazen de, nadir olarak sadece üst kısmında bir hat halinde tüy vardır. Tüysüz de olabilir. Legüm (meyva) aşağı yukarı basık, bir yada çok tohumludur. Meyva kabuğunun birleşme yerleri kanatsızdır. Tohumlar hemen hemen küresel, bazen basık, hilum çoğu zaman uzuncadır.

Bu cins *Lathyrus* ve *Lens*'ten çok zor ayrılmıştır. Özellikle *Faba* seksiyonunda bulunan türler *Lathyrus*'a benzerlik gösterir. *V. crocea* yanlışlıkla

Lathyrus aereus olarak tanımlanmıştır. Bu cinsin çoğu türü hem çevresel farklılıklardan hemde genetik olarak oldukça yüksek varyasyon gösterirler. Homolog varyasyonu geniş yayışlıdır.

2.1.1.1. *V. cracca* L.

Zayıf, çok yıllık, dik veya tırmanıcı, hemen hemen tüysüz ya da tüylüdür. Yaprakçıklar (5-) 8-16(-20) çift 0,8-4 cm boyunda ovat oblang'dan lineara (ipliksi - şeritsi). Stipullar zayıf semihastate yada hemen hemen düz olabilir. Tendriller dallanmıştır. Pedinkul kısa yada yapraktan uzundur. Rasem 10-40 çiçekli yoğun yada gevşekdir. Çiçekler 13-18 (-20) mm, menekşe yada lilak rengindedir, nadiren beyazdır. Kaliks 3-6 mm, hemen hemen gibbous genellikle morumsu, en aşağıdaki diş kısa olabilir yada kaliks tüpünden çok az uzundur. Standart ayası claw ile aynı boyda olabileceği gibi iki katı kadar da olabilir. Style yanlardan bastırılmıştır. Legüm (meyve) 20-30 mm her zaman tüsüzdür. Tohumlar birden fazladır.

Çok polimorfizm gösteren bu türü, özellikle kalıtsal varyasyonlardan ve fenotipik esnekliklerinden dolayı ayırt etmek çok zordur. Bu kompleks en fazla varyasyonu Balkanlar'da, Anadolu'da ve Kafkasya'da gösterir Türkiye için 5 tane alt tür tanımlanmıştır. Bunlar subsp. *cracca* ve subsp. *stenophylla* birbirinden bariz farklıdır. *V. cracca* kompleksi Avrupa'da biosistematik çalışmalara alındığı halde bu grubun Anadolu ve Kafkasya'da bulunanları için sitogenetik bir bilgi yoktur. Aşağıdaki açıklama kesin değildir. Kafkasya'nın doğu sınırlarından tanımlanan birkaç türünün durumu kesin değildir. Bunun nedeni ise, tür kalıntılarının tam olmamasıdır. Bu durum Kafkasya'dan tanımlanan bu türlerin statüsünü tartışılabilir hale getirmiştir *V. cracca sensu lato* örnekleri *V. villosa* ile sık sık karıştırılır.

subsp. *stenophylla* Vel

Pedinkul ve rasem, diğer alt türlere göre daha uzundur ve çiçekler solgun renklidir. Standard ayası clawın 2 katından daha uzundur. Mavi, lilak yada menekşe mavidir nadiren beyaz olabilir. Yaprakçıklar 10-40mm. Her zaman paralel kenarlıdır. Meyva, 22-30 mm. Olup bir saptan çıkar, uzunca bir sapı vardır. Bitki dik, pedinkul 4-13 cm. Yaprakçıklar darca şeritsi 10-30×0.5-2(-3)mm, ucu acute, çalı şeklinde

inflorescence genellikle gevşek, çiçekler yayılmış, Standard ayası, clawın 1.5 katı kadardır. Meyva oblanceolate doğru meyillidir ve diğer alttırlere göre alt tarafında daha attenuate dır.

2.1.1.2. *V. canescens* Lab

Belirgin, çok yıllık, 12-80 cm boyunda dik yada ascending'dir. Az tüylüden yoğun tüylüye kadar, yoğun beyaz tüylüden parlak tüylüye kadar değişebilir. Yapraklar tendrilli veya tendrilsiz olabilir. Yaprakçılar 5-12 çift 5-40 mm boyunda, eliptikden linear-lanceolata kadar değişebilir. Stipullar semihastate veya düz olabilir. Çiçek durumu açık bir şekilde 3-18 çiçeklidir. Pedinkul uzundur. Çiçek büyük olup 17-25 mm. Büyüklüğünde lilak ya da menekşe mavisidir. Kaliks 6-13 mm. pek belli olmayan gibbosluk vardır. Kaliks rengi mordur. En alttaki kaliks dişi, kaliks tüpünün yarısı kadardır ya da kaliks tüpü kadardır. Style sırttan bastırılmıştır. Meyva dikdörtgenimsi 26-35x 7-11 mm yoğun yapışık villous tüylüdür. Pilose tüylü ya da pubescent yada tüysüz olabilir. Meyva kabuklarının birleşme yeri silli olabilir. Birkaç tohumludur.

subsp. *gregaria* (Boiss & Heldr) Davis

Bitki pilose tüylü, yeşilimsi yada grimsi renkte. Meyva yoğun yapışık pilose tüylü, pubescent yada glabrous ve meyva zarflarının kabuklarının birleştiği yer sili, yapraklar tendrillidir. Gövde 1.5-3mm. çapında düz yada bükülmüş hemen hemen katı yapılı stipullar, gövde genişliğinden daha dardır. Yaprakçıkların hemen hepsi linear- lanceolate dır. Aşağıdaki yapraklar üstteki yapraklardan daha az akut dur. Gövde dik yada ascending-erect dir. Tendriller çoğunlukla basitdir.

2.1.1.3. *V. caesarea* Boiss & Bal

Yoğun villous tüylü, ascending gövdeli, tekyıllık (bazende tabanda sertleşmiş olabilir) 10-50 cm boylarında (2-)3-6 çift yaprakçıklıdır. Yaprakçıklar, 4-15x1-4 mm, oblong-lineardan elliptic - lanceolate uca doğru sivrilebilir. Stipullar lanceolate - ovate, tendriller basit, peduncullar bazen kısa olabildiği gibi bazende yapraklardan uzundur. Peduncullar 2-5 çiçeklidir. Pedisel geriye doğru kıvrıktır. Çiçekler 9-12 (-14) mm, iki renklidir. Kaliks 6 mm, belli belirsiz gibbouslu villous

tüylü ve meyilli bir ağzı vardır. Kaliks dişleri en azından kaliks tüpü kadar fili form - subulate şeklinde üstteki dişler alttakilerden çok az uzundur. Standardın ayası lavanta mavisi clawinkinden daha uzundur. Alalar ve karina beyazımsıdır. Meyva 15-23x4-5 mm boyutlarında oblong - linear kuvvetlice torulasedur. Meyve tüysüzdür. Tohumlar (1-)2-4, hilum kısadır. Beşinci - altıncı aylarda çiçeklenir. Aşınmış erezyona uğramış yamaçlarda tarlalarda görülür. 800 - 1600 m'ler arasında toplanmıştır. Endemik Ir-Tur elementidir.

2.1.1.4. *V. ervilia* (L.) Willd

Tüysüzden az çokyapışık pubescent tüylüye, tekyıllık, 8-70 cm boyunda diktir. Yapraklar bir mucro ile sonlanır. Yaprakçıklar (5-) 8-15(-20)- çiftir, (3-)5-15(-17)x1-3(-4) mm, darca şeritsiden oblong - lansoeolatadır. Stipullar semihastate, uzun dişlidir. Pedinkul 1-4(-5)-çiçekli, çiçek boyunda yada daha uzundur Yapraklardan çok kısadır. Çiçekler 7-12 mm, lilak pembe, solgun sarı ya da beyazdır. Kaliks 5-7 mm, az çokyapışık pubescent tüylü ağız subolique, dişler bazen tüpden uzun, eşit iğne şeklindedir. Standard geriye kıvrılmamıştır. Karina kayık şeklindedir. Legume (meyva) oblong-linear, 12-25x3-5 mm, boğumludan tesbih dizisi şekline ve çok az puberulent'dir. Tohumlar 2-4(-5), hilum çok kısadır. Kromozom sayısı $2n=14$, Üçüncü-altıncı aylarda çiçeklenir. Meşe çalılarında, taşlık yamaçlarda, dağ etekleri, taş yığınlarında, tarlalarda, asma bahçelerinde, yol kenarlarında bulunur. 1700 m'ye kadar görülür. Aynı zamanda kültürü de vardı.

2.1.1.5. *V. peregrina* L.

Yapışık puberulent yada pubescent tek yıllıktır. 10-70 (-95) cm, sürünücüden dik gövdeliye kadar değişir Yaprakçıklar (2-)3-7 çift 5-35(-40)x 0,5-5 (-6) mm darca lineardan oblanceolate kadar yada darca cuneate dan, tabanda incelen, retuse den praemorse (çentikli) ye, bazen acuminate yada obtuse olabilir. Stipullar 3-4 mm semihastate bazen de iki parçalıdır ve subulate (iğnemsî) dir. Üst tarafı lanceolatedır. Tendriller basit yada dallanmış olabilir. Pedinkul belirsiz, pedisel kaliks kadardır. Çiçekler 1 (-2), mavi ya da bazen süt beyazıdır (10-) 12-21 mm Kaliks 6-9 mm'dir. Bazen kaliks dudağına yönelmiş bir gibbosluk olabilir. Kaliks dişleri hemen hemen tüp kadar olup lanceolate - acuminedir. Standart ayası

yaklaşık clawn 2 katıdır. Meyva darca oblong (15-) 20-40x(4-)6-11(-12) mm, kısa gagalı yapışık puberulent tüylü bazen de tüsüzdür. Tohumlar (2-)3-7, hemen hemen küresel (3-)4-6(-7) mm çapında, hilum çok kısa $2n=12$ kromozomludur. Üçüncü ve altıncı aylarda çiçeklenir. Meşe çalılıklarında, phrygana, taşlık yamaçlarda, mısır tarlaları kenarında bulunur.

Bu polimorfik takson çok değişik karakterler gösterebilir. Bunlar yaprakçık boyu ve yaprak genişliği, pedisel uzunluğu, çiçek kısımlarının boyutları, korolla rengi, meyva boyutu ve meyvanın tüy durumu, tohum boyutu ve rengidir.

2.1.1.6. *V. sativa* L.

Tüylüden, hemen hemen tüsüze kadar değişebilir. Tek yıllık 20-80(-100) cm boyunda, yatık gövdeli, dik yada tırmanıcıdır. Yaprakçıklar (2-)4-8(-9)- çifttir. Genellikle 10-40x2-15 mm boyutlarında lineardan (şeritsi), lanseolate (mızraksı), oblong yada ovate ve nadiren derince dişlidir. Stipul semihastate dentate; tendriller genellikle dallanmıştır. Çiçekler 1-2(-3), aksiler, (10-)14-27(-30) mm, solgun pembeden morumsu menekşeye kadar, nadiren beyaz; kısa pediselli ve çok nadiren kısa pedinkulludur. Kaliks 7-20 mm, çan şeklinde - tüpsü, hemen hemen düzenli pubescent tüylü; kaliks dişleri (3-)5-11(-14) mm, neredeyse eşit linear-subulate yada mızraksıdır. Meyva (25-)35-65(-70) x 5-9 (-12) mm, linear, bazen gagalı genellikle tüylü, bazen meyvası görünmese de 1-2 tohumludur. Tohumlar genellikle 6-12 adet olup düz ve 2-7 mm çapındadır. Hilum kısadır.

Vicia cinsinin en fazla varyasyon gösteren (genetik ve fenotip olarak) kozmopolit türleridir. *Vicia sativa* kompleksinde ayırt edilebilir. 5 ana takson vardır. Populasyondaki veya tüm taksondaki *sativa*'nın değişkenliği homolog paralel ve sonuç olarak üst üstedir, pek çok alt bölümün en azından bazı mesafeden birbirleriyle beslendikleri bilinmektedir. Türler hemen hemen her özellik için öneli farklılıklar gösterir. Fakat özellikle yaprakçık morfolojisi ve temel kromozom sayısı açısından gösterir.

subsp. **nigra** (L.) Ehrh var. **nigra**

Meyvalar ve çiçekleri tek çeşit, hepsi havaya doğru çıkan gövdeden çıkar. Meyva dar ve kanatları zayıftır. Yeşilimsi kahverengiden siyaha kadar değişir.

Korolla 14-27 mm'dir. Meyva torulose değildir. Genellikle küçüktür. Genişliği 6,5 mm'den daha azdır. Tohumlar 2-5 mm'dir. Kaliks dişleri genellikle 6 mm'den kısa yada çok uzundur. Yaprakçıkların ucu sivri olabilir yada emerginatedır, 4-7 çifttir.

Yaprakçıklar genellikle 1-6 mm genişliğinde, lineardan oblanceolate yada oblangdur. Bazen eliptik, kesimden küte: kaliks 7-12 mm, dişler 2,5-7 mm; korolla (10-)14-20 mm bitki ince uzundur.

2.1.1.7. *V. narbonensis* L.

Kuvvetli, hemen hemen tüysüzden pilose- hirsute tüylüye kadar değişebilen tek yıllık (8-)15-70 cm. En üst yapraklar 2-3(-4) çift yaprakçıklıdır. Aşağıdaki yapraklar ise 1(-2) çiftlidir. Yaprakçıklar büyük (7-)10-40(50) x (5) 9-20(-30) mm boyutlarında eliptik yada oblonglanseolattan, ovate orbiculara değişebilir, ovate olabilir. Stipule semihastate dan semiorbiculara olabilir. Kenarları düz ya da dişli olabilir veya kesilmiştir. Tendril basit ya da dallı olabilir. Pedinkul çiçekden kısadır. 1-6 çiçeklidir. Çiçekler 16-30 mm. hepsi aynı renkte, genellikle koyu menekşe arasına krema çalar. Kaliks (7-)8-10(-13) mm, kaliks ağzı çok az meyillidir. Dişler genellikle eşit değildir. Aşağı yukarı lanseolatedır ve kaliks tüpünün yarı uzunluğudur. Standart, kaliksin boyuna eşit ya da 2 katı kadardır. Standart ayası standart clawı kadardır. Standart ayası açıkça alalardan daha uzundur. Meyva 35-50 (-70) x 8-11(-15) mm, linear - oblong ve kıvrık bir gagası vardır. Az çok tuberculer tüylüdür. Meyva, olgunken, kenarındaki tuberculer siller hariç tüysüz olur. Tohumlar (3-) 4-6 (-7) hemen hemen küresel 4-6 mm boyutlarında, hilumları kısadır. Çiçeklenme dördüncü-altıncı aylarda olur. Çoğu zaman tarla kenarlarında, kireç taşlarında ve volkanik topraklarda 1500 m'ye kadar toplanmıştır.

var. *narbonensis*

Yaprakçıklar ovateden eliptiğe yada obovate, kenarları düz bazende tepe kısmına doğru az çok denticulatedir. Stipullar düz yada dentatedir.

2.1.1.8. *V. galilaea* Plitm & Zoh

V. narbonensis'den farkı daha az yaprakçıklı olmasıdır (1-2(-3) çift) yaprakçıklar ovate den orbiculara kadar değişebilir. Yaprakçıları çoğu zaman daha büyüktür ve daha azdır (1-3). Çiçekler iki renklidir. Korolla, kaliksin 2,5-3 katı kadar olur. Standardın oyası genellikle lilak ve clavın boyuna denk yada daha kısa olabilir. Çoğunlukla ayası geriye bükülmüştür ve alalardan çok az uzundur. Alaların rengi beyaz ve koyu tiplidir. Meyva, daha geniştir (10-14 mm) ve yoğun pilose tüylüdür. Üçüncü-beşinci aylarda çiçeklenir. Kayalık, kireç taşı yamaçlarda, tarlalarda ve yikıntılarda görülür.

Türkiye'den toparlanan materyal örnekleri *V. narbonensis* ve *V. galilaea* karakterlerinin birleşimidir. Toplanan birçok örnek bunu gösterir.

2.1.1.9. *V. faba* L.

V. narbonensis'den ayırım daha sağlamdır. Yapraklar tendrilsizdir. Yaprakçıklar genellikle uzundur. Sık sık beyazımsı olan korolla, siyahımsı alalara sahiptir. Pubescent tüylü meyvası daha büyüktür (50-200 x 10 - 20 mm) Meyva kabuklarının birleşme yerleri düzdür ve daha büyük tohumları vardır. (8-30 mm). Çoğu zaman oval - ablong ve düzdür. Kültüre edilmiştir ve tarlalarda mevcuttur.

Bakla, Türkiye'de genişçe kültüre alınmıştır. Zhukovsky'e göre varyetelerin referans edilebilir biçimleri büyük bakla (broad bean), at baklası (horse bean) küçük bakla (tic bean) yetiştirilir.

2.2. Protein Analizinde Kullanılan Elektroforetik Teknikler

Doğadaki en önemli makromolekül gruplarından biri de proteinlerdir. Hücrede pekçok işlev binlerce farklı tipte protein molekülü tarafından yürütülür. Bu büyük çeşitliliğe ve farklı işlevlere karşın temelde oldukça benzer yapıları olan bu moleküllerin, üstlendikleri önemli görevler nedeniyle yapılarının aydınlatılması, sentezlerinin, işlevlerinin, regülasyonlarının ortaya konulması çok büyük önem taşır (Temizkan ve Arda 2004).

Bitki sistematikçileri tür ayırımında sadece morfolojik karakterleri kullandıkları için çeşitli zorluklarla karşılaşabilmekte ve morfolojik olarak birbirine

benzer iki türü ayırmada tereddüte düşmektedirler. Kromozom sayıları da eşitse bu ayırım oldukça zorlaşmaktadır. Bu nedenle sistematik açıdan problemli taksonomik grupların (cins, tür, varyete vs.) ayırımında moleküler genetik çalışmalar kullanılmaya başlanmıştır. Problemli taksonomik grupların ayırımında kullanılabilen tekniklerden bazıları, Doğal (native) Jel Elektroforezi, Doğal Olmayan (Denatüre) Jel Elektroforezi: SDS PAGE, Düşük Molekül Ağırlıklı Polipeptidlerin Elektroforezi, İzoelektrik Odaklama ve İki Boyutlu Elektroforez (2-DE)'dir.

Yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmaları temeline dayanan elektroforez tekniği, proteinlerin analizinde ve ayrılmasında da geniş çapta kullanılır. Temelde protein tanımlama (molekül ağırlığını, oligomerik mi, monomerik mi olduğunu, miktarını, saflığını belirlemek vb.) ve saflaştırma amacıyla kullanılan bu yöntem doğal veya rekombinant bir proteinin sentezlenip sentezlenmediği; sentezleniyorsa işlevsel olup olmadığı hakkında da bilgi verir (Temizkan ve Arda 2004).

Proteinler, ihtiva ettikleri aminoasitlere bağlı olarak, negatif veya pozitif net yüke sahiptirler. Şayet protein karışımı ihtiva eden bir çözeltiye elektrik alanı uygulanırsa, karışımdaki protein molekülleri, elektrik alanda, farklı hızla hareket ederek, moleküller birbirinden ayrılır (Hames ve Rickwood 1990).

Elektrik alanda moleküllerin hareket hızları, molekülün büyüklüğüne, biçimine, yüküne ve elektrik alanının şiddetine bağlı olduğu gibi moleküllerin hareket ettiği ortamın viskozitesine, sıcaklığına ve iyonik şiddetine bağlı olarak da değişir (Richards 1998).

Elektroforezde ayrıştırılacak olan karışımdaki moleküllerin (numune), üzerinde hareket ettiği ortama destek (support) matriksi denir. Kağıt, selüloz asetat, nişasta, agaroz ve poliakrilamid jel elektroforez ile ayrıştırmada destek matriksi olarak kullanılmaktadır. Poliakrilamid jel, proteinlerin ayrıştırılmasında en yaygın tercih edilen destek matriksidir (Alberts ve ark. 1989).

Poliakrilamid jelin tercih nedenleri; Birçok amaç için ayırma gücünün yeterli olması, kullanımının kolay ve zaman kazandırıcı olması, karşılaştırma gerektiren çalışmalarda, bir çok örneğin birlikte yan yana ayrıştırılabilmesi,

poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmış örneklere, gümüş (silver) gibi hassas boyama metotlarının geliştirilmesi, poliakrilamid jel elektroforezinde analizi yapılmış örneğin nitroselüloz membrana transferini sağlayan (blot) metodun geliştirilmesidir (Bret ve ark.1989).

Elektroforezde kesiksiz (continuous) ve kesikli (discontinuous) olmak üzere 2 farklı tampon sistemi kullanılabilir. Kesiksiz sistemde tek bir ayırıcı jel vardır; tanklarda ve jelde aynı tampon kullanılır. Kesikli sistemde ise jel farklı tamponlarda hazırlanmış iki kısımdan oluşur: (1) büyük porlu yükleme (stacking) jeli (örneğin %5 total akrilamid içerir.); (2) küçük porlu ayırma (separating) jeli (örneğin %10 total akrilamid içerir). Bu sistemde kullanılan tank tamponları da jel tamponlarından farklıdır (Temizkan ve ark. 2004).

Proteinler denatüre (SDS içeren) bir jelde molekül büyüklüğüne; doğal (native) bir jelde ise molekül biçimi, büyüklüğü ve yüküne göre ayrılırlar. Denatüre ortamda gerçekleştirilen elektroforez (SDS-PAGE) molekül ağırlığı belirlemelerinde kullanılır (Temizkan ve ark. 2004).

2.2.1. Doğal Jel Elektroforezi

Doğal (native) jel elektroforezinde kullanılan tamponlar, deterjan ve diğer denatüre edici maddeleri içermediğinden, prosedür doğal koşullarda gerçekleşir. Bu yöntem:

Fazla sayıda protein içeren karışımların (örneğin, ham özütler) ayrılmasında;

Bir protein ya da protein kompleksinin aktivitesi veya yapısı ile ilgili elektroforetik çalışmalarda;

Proteinin saflığının kontrolünde ve tek bir protein bandı ortaya koyan oligomerik bir proteinin belirlenmesinde;

Proteinin denatüre olup olmadığının saptanmasında kullanılır.

Doğal jelde proteinin molekül ağırlığı hakkında kesin bir bilgi edinmek mümkün değildir, çünkü molekül büyüklüğü yanında molekül şekli ve yükü de

ayırımı etkiler. Bununla beraber karşılaştırma yapabilmek için referans olarak kullanılabilecek standart protein karışımları geliştirilmiştir (Temizkan ve ark. 2004).

2.2.2. Doğal Olmayan (Denatüre) Jel Elektroforezi: SDS-PAGE

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE), polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS; polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır. Ayrıca moleküllere negatif bir yük de kazandırmaktadır (Temizkan ve ark. 2004).

SDS - PAGE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine olanak vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen protein örneği, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte, aynı jel üzerinde yan yana ceplere uygulanır ve ayrı hatlarda elektroforetik olarak ayrılır. Boyama sonrasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilir. Ayrıca bu tip bir ayrışımın sonuçlarını matematiksel olarak değerlendirerek molekül ağırlığını belirlemek de olasıdır (Temizkan ve ark. 2004).

Fayed (1989), *Vicia faba*'nın bir Alman ve 4 Mısır varyetesiyle 3 büyük tipine ait üç mutantı elektroforez bant modelleri ve tohumlardaki toplam protein miktarı bakımından incelemiş ve varyeteler, mutantlar ve tipler arasında büyük farklılıklar görmüştür. Sonuçta tiplerin henüz alt tür seviyesinde olmadığına karar vermiştir.

Polignano ve ark. (1991), yaptıkları çalışmada SDS-PAGE kullanılarak Afganistan ve Habeşistan'dan 64 *Vicia faba* genotipi ortaya çıkarmışlardır. Materyal incelemesinde toplam 11 farklı protein numunesi teşhis edildi. Bütün genotipler içinde en fazla polimorfizm, 45 kDa'dan fazla moleküler ağırlık ile polipeptidler arasında keşfedildi.

Mudzana ve ark. (1995), *Vicia faba* bitkisinin varyetelerinin ayrımında morfolojik karakterler, bilgisayarlı imaj analizi ve tohum protein elektroforezi

metotlarını kullanmışlar ve bu üç metodun tür içerisindeki 12 varyetenin tanımlanmasında kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Piergiovanni ve ark. (1995), Tohum depo proteinleri ve C-bandlanma karyotipleri farklı coğrafi kökenden *V. benghalensis*'in 27 çeşidinden teki için analiz edildi. Yüksek derecede polimorfik ve allogamik oran için ayırıcı özelliklerle ilgili fikir veren çalışmada *V. benghalensis*'in heteromorfik olduğu anlaşıldı.

El - Shanshoury ve Soliman (1996), *Vicia* cinsinin *Vicilla* alt cinsindeki dört seksiyon ile *Vicia* alt cinsindeki üç senksiyona ait toplam 26 *Vicia* türünün proteinlerinin SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle incelemişler, sonuçları sayısal analiz yöntemiyle karşılaştırarak daha önce morfolojik özelliklere dayanan sonuçlara benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Potokina (1997), yaptığı çalışmada RAPD analysis ve tohum protein elektroforezi *V. segetalis* üzerinde iki coğrafik grup gösterdi: Kırım - Kafkasya ve Orta Asya. Bölgeler arasında kesin ayırıcı özellik fenotipik düzeyde keşfedilmedi. *V. segetalis* için morfolojik çeşitliliğin merkezi Kırım ve Kafkasya'dan ziyade Orta Asya olduğu görüldü.

Eggi ve Potokina (1998), yaptıkları çalışmada *legume* (*Fabaceae*) türünün tohum depo proteinlerinin SDS-PAGE'i üreme sistemini belirlemede kullanmışlardır. Protein PAGE örneklerinden, belirlenmiş olan polinasyon şekli hesaplanarak otogam ve allogam türler arasında protein değişikliği dikkatle gözlemlendi. Sonuçlar, legumesin polinasyon mekaniği tipi hakkında elde mevcut bilgiler ile karşılaştırıldı.

Potokina ve Eggi (1999), *V. sativa* ve *V. angustifolia*'nın farklı coğrafik bölgelerden toplanan 82 çeşidinin toplam proteinlerini SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle incelemişler, legümin bandı kombinasyonuna dayanarak *V. sativa*'da 6 tip protein, *V. angustifolia*'da ise 3 tip protein tanımlanmıştır. Neticede bu iki türü tohum protein profilleri ile kolayca birbirinden ayırmıştır.

Kamel ve El-Mashad (2000), yaptıkları çalışmada *Vicia* cinsine ait dört büyük seksiyonu temsil eden 16 farklı *Vicia* türü arasındaki akrabalık ilişkisini SDS-

PAGE elektroforez metoduyla ortaya koymuşlardır. Sonuçta bu metodun 4 büyük seksiyonu kolayca ayırdığı ortaya konmuştur.

Potokina ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada Akdeniz ülkelerinden elde ettikleri *V. macrocarpa*'nın üç, *V. cordata*'nın iki çeşidi ve *V. sativa*'nın dört kültür çeşidi ile Sovyetler Birliğinden elde edilen *V. sativa* grubunu oluşturan bir popülasyonla 58 doğal *Vicia* taksonu arasındaki genetik uzaklıklar RAPD-PCR ve SDS-PAGE elektroforez yöntemleriyle incelemişlerdir. Sonuçta bu iki metodun popülasyonlarda gözlenen genetik varyasyonla onların coğrafik dağılımları arasındaki ilişkiyi ortaya çıkardığı tespit edilmiştir.

El-Shemy ve ark. (2000), Soya tohumlarının farklı kültürlerinde depo proteinlerinin genetik akrabalığını göstermek için basit bir metod olan SDS-PAGE kullanmışlardır. SDS-PAGE numuneleri kullanılarak farklı kültürlerden örneklerde depo proteinlerinin karşılaştırılmasından kazanılan bilgi ile soy ağacı düzenlenmiştir.

Bertoza ve Valls (2001), Native - PAGE ve SDS - PAGE'in protein profilleri fenotipik olarak özel grupların kimlik tespiti ve sınıflandırılması için özellikle faydalı ve *Arachis pintoi* çoğalmaları arasında muhtemel hibriti teşhis etmek için yararlı bulunmuştur.

Valizadeh (2001), *Legumes* tohumunun 11 türe ve 4 tribe ait olan 47 çeşidinin tohum protein profilleri, tek tek tohumdan her bir çeşitte toplam protein parçaları yapılan SDS – PAGE ile çalışmıştır. Morfolojical karakterler üzerine kurulan sınıflama tür ile iyi uyum içinde filogenetik akrabalığı gösterdi.

Minelli ve Cionini (2002), *Vicia faba*'da tohum depo proteinlerinin sentez ve birikim kontrolünde genotip ve çevrenin rolünü araştırmışlardır. 25 bireyin tohumlarında tuzda çözülebilir proteinler SDS-PAGE ile parçalara ayrıldı ve coomassie blue boyamasından sonra sıralı parça seçildi. Albumin içeriğindeki değişimler tuzda çözülür toplam protein miktarının değişimine globulin içeriğindeki değişikliklerden daha az bağlıdır. Elde edilen sonuçlara göre kotiledondaki albumin ve globulin yığılmaları ve sentezleri bağımsız kontrol altındadır ve genetik ve çevresel faktörler tarafından farklı şekillerde etkilenmektedir.

Cuadrado ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada 2 *Vicia faba* kotiledonlarının filizlenme ve filiz büyümesi süresince büyük depo proteinlerinin [legümlerin (11S) visilinlerin (7S) ve albüminlerin (2S)] nitel değişimleri SDS-PAGE ile değerlendirildi. *Legume* depo proteinleri, filizlenmeden sonra ve filiz büyümesi süresince harekete geçer. Visilin bozulması çimlenme (1-2 DAI) fazı boyunca daha erken başlamıştır. Albumin hareketliliği geç tohum gelişimine bağlanmamıştır.

Okumuş ve Gülümser (2004), Türkiye’de toplanan 4 tırmanıcı *Vicia* türünün 7 tane alt grubunun tohum depo proteinlerini SDS-PAGE ile analiz etmişlerdir. Genotiplerin protein bandları, genetik uzaklığı tahminde proteinlerin varlık, yokluk ve kullanımı için değerlendirildi. Benzerlik matrix analizinde kullanıldı. %33’den %83’e kadar *Vicia* alt türlerinin genotipleri genetik benzerlik gösterdi. *Vicia* genotipleri çok önemli protein örneklerine sahip, aynı zamanda bazı bakla türleri (*V. villosa* ve *V. pannonica*) içinde önemli fark göstermektedir.

2.2.3. Düşük Molekül Ağırlıklı Polipeptidlerin Elektrofrez

15 kDa’nun altındaki polipeptidlerin elektroforetik analizinde %0,5 çapraz bağlayıcı (200:1, akrilamid: bis) içeren %18 veya %20’lik jeller kullanılır. Çapraz bağlayıcı oranının düşük olması nedeniyle oldukça yumuşak olan bu tip jellerin %10 gliserol de içermesi difüzyonu yavaşlatır ve göç hızını azaltır. Ayırma jelinin pH’sı SDS-PAGE’dekine oranla daha yüksektir (pH 9.3). Bu da proteinleri yavaşlatır, dolayısıyla daha iyi bir ayırım sağlar. İnce (0.75 mm) jellerde az miktarda örneklerle çalışma ve gümüş boyama daha iyi sonuç verir (Temizkan ve ark. 2004).

2.2.4. İzoelektrik Odaklama ve İki Boyutlu Elektrofrez (2-DE)

Polipeptidlerin farklı izoelektrik noktalara sahip olmalarından yararlanılarak ayrılmalarını sağlayan izoelektrik odaklama (isoelectric focusing) yöntemi analitik veya preparatif amaçlı olarak tek başına kullanılabileceği gibi, iki boyutlu elektrofrezin (2-DE) birinci boyutunu da oluşturabilir. Dolayısıyla hem yatay hem de dikey [kılcal (kapiler) bir tüpte ya da kolonda] sistemlerde gerçekleştirilebilir (Temizkan ve ark. 2004).

Bu yöntemde jel boyunca bir pH gradienti oluşturmak için izoelektrik noktaları belli, düşük molekül ağırlıklı amfolitler kullanılır. Belli pH aralıkları ortaya

koyan karışımlar şeklinde satılan bu maddeler, sentetik alifatik poliamino polikarboksilik asit yapılarındadırlar. Çalışmada kullanılacak amfolit karışımı seçilirken, ayrılması istenen proteinlerin izoelektrik noktaları göz önünde bulundurulur. Ayırım geniş bir pH aralığında (örneğin, pH 3-10) gerçekleştirilebileceği gibi, daha dar bir alanda da (örneğin pH 4-5) yürütülebilir (Temizkan ve ark. 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışma materyallerimizi aşağıda isim ve lokaliteleri belirtilen bitki örnekleri oluşturmaktadır. Numuneler özellikle bitkilerin çiçekli ve meyvalı devrelerinde araziden elde edilmiştir.

1. *V. cracca* subsp. *stenophylla*; C4 Konya Sille Büyükgevele tepesi batı yamacı. Ca: 1450-1700m.

2. *V. canescens* subsp. *gregaria*; C4 Konya Bozkır Küçükgeyik Dağı. Ca: 2000m.

3. *V. caesarea*; C4 Konya Sille Büyükgevele tepesi batı yamacı. Ca: 1450m.

4. *V. ervilia*; C4 Konya Karapınar Karacadağ Karaören Köyü üstü. Ca: 1350m.

5. *V. peregrina*; C4 Konya Karapınar Karacadağ Akören Köyü üstü meşelik yerler. Ca: 1350m.

6. *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*; C4 Konya Karapınar Karacadağ Oymak Köyü Kemerhan Yaylası. Ca: 1450m.

7. *V. narbonensis* var. *narbonensis*; C4 Konya Seydişehir Gölyüzü Köyü arası *Quercus libani* birliği. Ca: 1200m.

8. *V. galilaea*; C4 Konya Karapınar Karacadağ Akören Köyü. Ca: 1300m.

9. *V. faba*; C4 Konya kültür.

3.2. Protein Profili Analizi

3.2.1. Protein İzolasyonu

Türlerin protein profili analizleri, Saraswati (1993)'ye göre yapılmıştır. Her tür için ayrı ayrı 40 mg tohum tartılmıştır. Havanda dövülerek toz haline getirilmiş ve 1,5 ml'lik ependorf tüplerine konulmuştur.

Üzerine ekstraksiyon tamponu (tablo 1) ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir. 3 dak. kaynar suda kaynatılmış ve 10.000 rpm’de 10 dak. santrifüjlenmiştir. Süpernatant yükleme yapılıncaya kadar -20°C de saklanmıştır (Saraswati ve ark. 1993).

Tablo 1. Protein profili analizinde kullanılan tampon ve çözeltiler

Tampon ve Çözeltinin İsmi	İçeriği	Miktarı
Ekstraksiyon Tamponu	0.5 M Tris HCl (pH 6.8) %10 SDS 2-Merkaptoetanol Üre Saf su	125µl 200µl 50µl 480 mg 275 µl
Elektroforez Yürütme Tamponu 5 x Stok Çözelti (pH 8.3)	Tris Glisin SDS Saf su	15 gr 94 gr 5 gr 1 lt ye tamamlanır.
Boyama Çözeltisi I	%100 TCA Metanol Saf su	25 ml 82.5 ml 142.5 ml
Boyama Çözeltisi II	%2’lik Comassie Brilliant Blue G-250 10 N KOH %100 TCA	150 ml. 12.5 ml 50 ml
%5’lik Poliakrilamid Jel (Ön ayırma jeli)	%30 akrilamid – Bisakrilamid 1 M Tris – HCl Saf su %10 SDS %10APS TEMED	1.7 ml 1.25 ml 6.8 ml 0.1 ml 0.1 ml 0.01 ml
%10’luk Poliakrilamid Jel (Ayırma jeli)	%30 Akrilamid - Bisakrilamid 1.5M Tris - HCl Saf su %10 SDS %10 APS TEMED	30 ml. 18.75 ml 24.75 ml 0.75 ml 0.75 ml 0.030 ml

3.2.2. Jelin Hazırlanması

%10’luk separating (ayırma) poliakrilamid jel Tablo 1 deki gibi hazırlanmıştır. Üzerine % 5 lik stacking (ön ayırma) poliakrilamid jel hazırlanıp

(Tablo 1) dökülmüştür ve tarak yerleştirilmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılmıştır. Herbir kuyucuğa 15µl örnek yüklenmiştir (Laemli 1970).

3.2.3. İzole Edilen Proteinlerin Elektroforezi

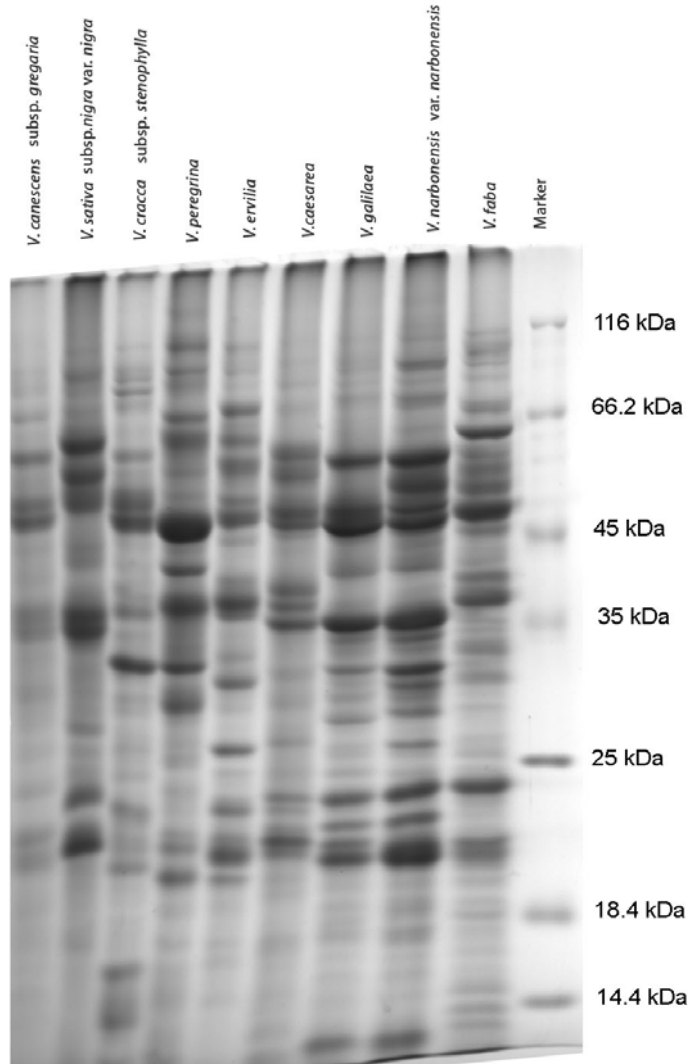
Jele Yüklenen örnekler, ön ayırma jelinde 16 mA, ayırma jelinde 30mA de izleme boyası jelin sonuna gelene kadar yürütülmüştür (Laemli 1970). Jel, boyama çözeltisi I'e (Tablo 1) alınarak bir gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra boyama çözeltisi II'ye (Tablo 1) alınmıştır (Demiralp ve ark. 2000). Saf su ile birkaç kez yıkandıktan sonra fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4. Jellerin Değerlendirilmesi

Fotoğrafları çekilen *Vicia* türleri bantlarının varlığına ve yokluğuna göre 10 olarak değerlendirilmiştir. Syntax Jaccard bilgisayar programı ile dendrogramları yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Vicia* cinsine ait *V. cracca* subsp. *stenophylla*, *V. canescens* subsp. *gregaria*, *V. caesarea*, *V. ervilia*, *V. peregrina*, *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*, *V. narbonensis* var. *narbonensis*, *V. galilaea* ve *V. faba* türlerinin SDS-PAGE yöntemi ile protein profilleri çıkarılmıştır. Jelin fotoğrafı çekildikten sonra (Şekil 4.1) bantların varlığı (1) ve yokluğu (0)'na göre (Tablo 4.1), Syntax Jaccard bilgisayar programı ile dendrogram çıkarılmıştır (Şekil 4.2).



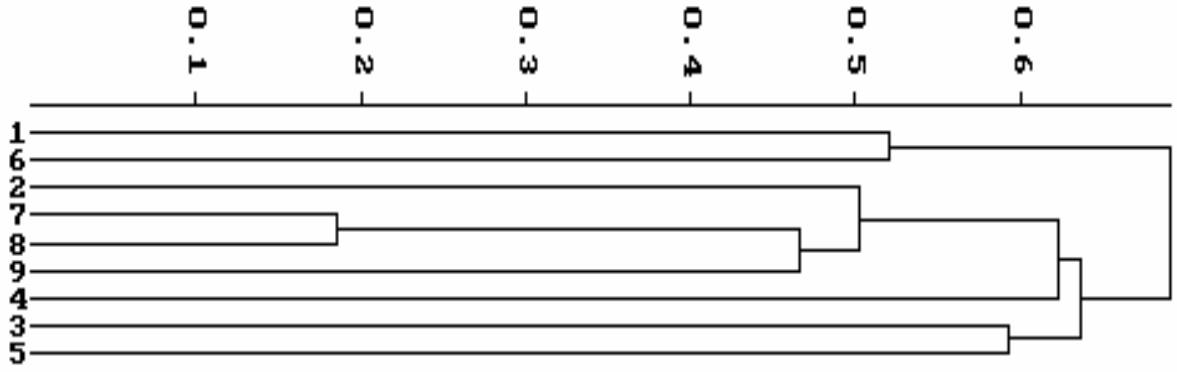
Protein Fotoğrafi : Şekil 4.1. *Vicia* türlerinin SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen elektroforogramı.

Marker: β galaktosidaz (116.0 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), laktate dehidrogenaz (35 kDa), RE Bsp 981 (25.0 kDa), β laktoglobulin (18.4 kDa), lizozim (14.4 kDa).

- 1) *V. canescens* subsp. *gregaria*
- 2) *V. sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*
- 3) *V. cracca* subsp. *stenophylla*
- 4) *V. peregrina*
- 5) *V. ervilia*
- 6) *V. caesarea*
- 7) *V. galilaea*
- 8) *V. narbonensis* var. *narbonensis*
- 9) *V. faba*
- 10) Marker

Tablo 4.1: Şekil 4.1 deki *Vicia* türlerine ait protein bant sayılarının karşılaştırmalı sonuçları, 0 sayısı bant yokluğunu, 1 sayısı bant varlığını göstermektedir.

İncelenen tür isimleri	<i>V.canescens</i>	<i>V.sativa</i> subsp. <i>nigra</i> var. <i>nigra</i>	<i>V.cracca</i>	<i>V.peregrina</i>	<i>V.ervilia</i>	<i>V.caesarea</i>	<i>V.galilaea</i>	<i>V.narbonensis</i> var. <i>narbonensis</i>	<i>V.faba</i>
Bantların varlığı veya yokluğu	0	1	1	1	1	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	1	0	0	1
	0	1	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	0	1	0	1	1	0	0	1	1
	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	0	1	0	1	1	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1	1	1	1	0	0	0	1	1
	0	0	0	1	0	1	0	0	1
	0	1	1	0	1	0	1	1	1
	0	0	1	0	0	1	0	0	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	1	1	0	1	0	1	1	1
	0	0	1	0	0	1	0	0	0
	0	0	1	1	1	1	1	1	0
	0	1	0	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	0	1	1	0	1	1	1	1	1
	0	1	0	1	0	1	1	1	1
	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	1	1	0	1	1	1	1	1	0
	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	1	0	1	0	1	0	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	0	1	1	1
	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	1	0	1	1	1



Şekil 4.2: *Vicia* türlerinin SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen protein profili dendrogramı.

- 1) *V.canescens* subsp. *gregaria*
- 2) *V.sativa* subsp. *nigra* var. *nigra*
- 3) *V.cracca* subsp. *stenophylla*
- 4) *V.peregrina*
- 5) *V.ervilia*
- 6) *V.caesarea*
- 7) *V.galilaea*
- 8) *V.narbonensis* var. *narbonensis*
- 9) *V.faba*

Şekil 4.2 de görülen dendrograma göre *Vicia* türleri iki ana gruba ayrılmıştır. Bu grup üyelerinin genetik uzaklıkları % 18 ile %70 değerleri arasında değişen *Vicia* türlerinin toplam protein sayıları 16 ile 33 arasında değiştiği görülmüştür (şekil 4.1). Birinci grup üyesi olan *V. canescens* subsp. *gregaria* ve *V. caesarea* türleri birbirine %52 oranında uzak olduğu görülürken birinci grubun üyeleri, ikinci grubun üyelerinden %70 oranında uzak olduğu görülmüştür. İkinci grup yine iki alt gruba ayrılmıştır. Alt grubun biri, birbirine %60 oranında uzak olan *V. ervilia* ve *V. cracca* subsp. *stenophylla*'dan oluştuğu görülmektedir. İkinci alt grup kendi içinde küçük gruplar oluştururken *V. galilaea* ve *V. narbonensis* var. *narbonensis* birbirine %18 oranında uzak bulunmuştur. Buda bu iki türün birbirine oldukça yakın olduğu (% 82) anlamına gelmektedir. *V. faba*'nın bu iki türe % 55 oranında yakın olduğu görülmüştür. *V. sativa* bu üç türe % 50 yakın bulunmuştur. *V. peregrina* ise bu küçük gruba oldukça uzak olduğu bulunmuştur (%62).

Türler, Türkiye florasında morfolojilerine göre 4 seksiyon altında toplanmıştır. Sırası ile

Sect.: *Cracca* S.F. Gray

Vicia cracca L. subsp. *stenophylla* Vel

Vicia canescens Lab. subsp. *gregaria* (Boiss & Heldr) Davis

Sect.: *Ervum* (L.) S.F. Gray

Vicia caesarea Boiss & Bal

Vicia ervilia (L.) Willd

Sect.: *Vicia*

Vicia peregrina L.

Vicia sativa subsp. *nigra* (L.) Ehrh. var. *nigra*

Sect.: *Faba* Aschers & Graebn

Vicia narbonensis L. var. *narbonensis*

Vicia galilaea Plitm & Zoh

Vicia faba L.

şeklinde yer almaktadır. SDS-PAGE ile ortaya konulan *Vicia* türleri arasındaki uzaklıklar Davis'in (1970) Türkiye Florası'nda belirtmiş olduğu türler

arası uzaklıklarla benzer bulunmuştur. *V. canascens* subsp. *gregaria* ve *V. caesarea* farklı seksiyonlarda yer almasına rağmen filogenetik olarak birbirine yakın olması SDS-PAGE sonuçları ile uyumlu çıkmıştır. Dördüncü seksiyonda yer alan *V. narbonensis* var. *narbonensis*, *V. galilaea* SDS-PAGE sonuçlarına göre oldukça benzer bulunurken *V. faba* %55 oranda bu iki türün yanında yer almıştır. Floradan farklı olarak bu gruba *V. sativa* subsp. *nigra* da dahil edilmiştir ve *V. peregrina* oldukça uzak bulunmuştur. *V. cracca* subsp. *stenophylla* ve *V. ervilia* floraya göre farklı seksiyonlarda yer almasına rağmen bu seksiyonlar birbirinin ardışıdır. SDS-PAGE sonucuna göre bu iki tür aynı grupta %58 oranında birbirine genetik olarak uzak bulunmuştur. Dolayısı ile *Vicia* cinsine ait incelenen türlerin sınıflandırılmasında morfolojik incelemelere ilave olarak SDS-PAGE yönteminin de faydalı olduğu gözlenmiştir.

Okumuş ve Gülümser (2004)'in yaptıkları bazı *Vicia* türlerinin tohum proteinlerinin genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada *Vicia* türlerinin %33 ve %83 arasında değişen oranda genetik benzerlik gösterdiklerini bulmuşlardır.

Sommour (1991), *Vicia* türlerinin filogenetik akrabalıklarını SDS-PAGE kullanarak yaptığı çalışmada *V. narbonensis* var. *narbonensis* ile *V. faba*'nın % 70 oranında benzer olduğunu göstermiştir. *V. faba*'nın da *V. sativa*'ya % 50 oranında benzer olduğunu bulmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada da *V. narbonensis* var. *narbonensis* ve *V. faba* % 55 oranında bu iki türe yakın bulunmuştur. Dolayısıyla bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Sonuç olarak, çalışmamızda SDS-PAGE yöntemine göre *Vicia* türleri arasındaki akrabalık derecesi Davis' in Türkiye florasındaki morfolojik karakterlere göre akrabalık derecesi ile uyumlu bulunurken birkaç tür floradan çok uzak olmamak kaydıyla farklı bulunmuştur. Çok sayıda primerle yapılacak olan RAPD-PCR ile tekrar akrabalık dereceleri belirlenebilir. Aynı zamanda korunmuş bölgeler olan ribozomal DNA' lar kullanılarak da genetik uzaklıklar belirlenebilir.

5. KAYNAKLAR

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. And Watson, J.D. 1989. *Molecular Biology of The Cell*. 2 nd ed. Garland Publishing Inc. New York.
- Bertoza, M.R., Vals, J.F.M. 2001. Seed Storage Protein Electrophoresis in *Arachis pinto* and *A. Repens* (*Leguminosae*) for Evaluating Genetic Diversity, *Genetic Resources and Crop Evolution*. 48, 121-130.
- Bressani, R. and Elias, L.G. 1979. The Problems of Legume Protein Digestibility. *Journal of Food Science*. 39, 61-67.
- Brett, C.J., Curtis, A.S.G., Dow, J.A.T., Edwards, J.G., Lackie, J.M., Lawrence, A.J. and Moores, G.R. 1989. *The Dictionary of Cell Biology*. Lackie, J.M. and Dow, J.A.T. (ed.), Academic Press. London.
- Cuadrado, C., Guillamon, E., Goyoaga, C., Pedrosa, M.M., Altares, P., Burbano, C., Muzquiz, M., Romero, C. 2004. Modifications of Seed Storage Proteins During Germination and Seedling Growth of Faba bean Cotyledons, Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds. Toledo, Spain, 307-310.
- Davis, P.H. 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Island* Vol.10, Edinburg University Pres.
- Davis, P.H. 1970. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Vol.3, Edinburg University Pres.
- Demiralp, H., Çelik S., Köksel H. 2000. Effects of Oxidizing Agents and Defatting on the Electrophoretic Patterns of Flour Proteins During Dough Mixing, *Eur. Food Res Technol*, 211: 322-325.
- Duc, G. 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*. 53, 99-109.
- Eggi, E.E., Potokina, E.K. 1998. A Cross Pollinator or A Self Pollinator? Electrophoretic Separation of Seed Polypeptides to Determine the Type of Pollination in Leguminous Species. *Botanicheskii Zhurnal*. 83 (1), 77-83.
- El-Shanshoury, A.R., Soliman, S.A. 1996. Electrophoretic Evidence for Subgeneric and Sectional Relationships of Some Species in *Vicia* L., Pakistan. *Journal of Botany*. 28: 2, 173-182.

- El-Shemy, By.H.A., Yamana, H., Saneoka, H. and Fujita, K. 2000. Phylogenetic Comparative Analysis of Storage Protein Structure in Legume Seeds. *The Authors are with the Faculty of Applied Biological Science*. 60-62.
- El-Tabey Shehata, A.M. 1992. Hard to Cook Phenomenon in *Legumes*. *Food Review International*. 8, 191-221.
- FAO. 2003. FAO Yearbook Production 2002, Vol. 55. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Statistic Series* No: 176. Rome.
- Fayed, A.H. 1989. Variation in Protein Banding Patterns as Revealed by PAGE in the Faba Types of *Vicia* : a Contribution to the Taxonomic Dispute in the Species, *Bulletin, of Faculty , of Agriculture , University of Cairo*. 4: 1, 289-299; 16.
- Haciseferoğulları, H., Gezer, İ., Bahtiyarca, Y., Mengeş, H.O. 2003. Determination of Some Chemical and Physical Properties of Sakız Faba bean (*Vicia faba* L. var. major). *Journal of Food Engineering*, 60, 475-479.
- Hames, B.D., Rickwood, D. 1990. Gel Electrophoresis of Proteins, Second Edition, *Oxford University Press*, Oxford New York Tokyo.
- Hamilton, D. 2005. Broad bean. Available from. Htt : // www. Self sufficientish. Com / bean . htm.
- Kamel, E.A.R., El-Mashad , A.A.A. 2000. Electrophoretic Studies of Seed Proteins and the Relationships of Some Species of the Genus *Vicia* L., *FABIS Newsletter*, 42, 5-11.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural Proteins During the Assembly of Bacteriophage T4., *Nature*, 227, 680-684
- Lucchese, C., Dineli, G., Bonetti, A., Lovato, A. 1997. *Seed Sci, Technol*. 25, 253.
- Minelli, S., Cionini, P.G. 2002. Seed Storage Proteins in Selected Genotypes of *Vicia faba* L.: Content, Composition and Environmental influence, *Journal of Genetics and Breeding*, 56 (3), 287-294.
- Mudzana, G., Pickett, A.A., Jarman , R.J., Cooke, R.J. and Kefe, P.D. 1995. Variety Discrimination in Faba beans (*Vicia faba* L.): an Integrated Approach *Plant Varieties and Seeds* 8, 135-145.

- Mwanamwenge, J., Loss, S.P., Siddique, K.H.M., Cocks, P.S. 1998. Growth , Seed Yield and Water Use of Faba bean (*Vicia faba* L.) in a Shortseason Mediterranean-type Environment. *Aust. J. Exp. Agric.* 38, 171-180.
- Okumuş, A., Gülümser A. 2004. Determination of Genetic Diversity in Some Vetches (*Vicia* spp.) by seed proteins, *International Journal of Biology and Biotechnology*, 1 (2), 149-152.
- Perrino, P., Colaprico, G., Lafiandra, D. 1987. *Genet. Agric.*, 41, 375.
- Piergiorganni, A.R., Galasso, I., Perrino, P., Pignone D. 1995. Biochemical and Cytological Analyses in Natural Populations of *Vicia benghalensis* L. Evidence for Two Distinct Groups., *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42 (4), 347-352.
- Piergiorganni, A.R., Taranto, G. 2005. Specific Differentiation in *Vicia* Genus by Means of Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A* ,1069, 253-260.
- Polignano, G.B., Splendido, R., Ugenti , P. 1991. Protein Polymorphism Among Genotypes of Faba bean from Afganistan and Ethiopia, *FABIS Newsletter*, (28/29): 8-11.
- Potokina, E.K., Eggi, E. 1999. Intraspecific Diversity of *Vicia sativa* L. and *Vicia angustifolia* Rwichard Deduced from Seed Protein Electrophoresis, *FABIS Newsletter*, 40, 13-17.
- Potokina, E.K., Vaughan, D.A., Eggi, E.E., Tomooka, N. 2000. Population Diversity of the *Vicia sativa* agg. (*Fabacea*) in the Flora of the Former USSR Deduced from RAPD and Seed Protein Analyses, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47 (2), 171-183 .
- Potokina, E.K. 1997. *Vicia sativa* L. Aggregate (*Fabacea*) in the Flora of the Former USSR. *Genet Resour. Crop. Evol*, 44, 199-209 .
- Richards, P. 1998. Protein Elektrophoresis. In: Rapley C.R, Walkers J.M. (ed), *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, New York.
- Sammour, R.H. 1991. Using Electrophoretic Techniques in Varietal Identification, Biosystematic Analysis, Phylogenetic Relations and Genetic Resources Management, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 4: 3, 221-226.

- Saraswati, R., Matoh T., Phupaibul P., Lumpkin T.A., Kobayashi M. 1993. Identification of Sesbania Species from Electrophoretic Patterns of Seed Protein, *Trop. Agric. (Trinidad)*, 70(3): 282-285.
- SSI. 2000. Agricultural Indicators 1923-1998. Ankara: SSI Pres. Suthar, S.H. & Das, S.K. 1996. Some Physical Properties of Karingda Seed. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 65, 15-22.
- Tamkoç, A., Avcı, M.A. 1997. Yabancı Kökenli Fig Hatlarının (*Vicia sativa* L.) Adaptasyonu ve Bazı Tarımsal Özellikler Arası İlişkiler, *Türkiye II. Tarla Bitkileri Kongresi*, 421-425 .
- Temizkan, G., Arda, N. 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, İstanbul Üni. BİYOGEM Yayın No:2, Nobel Tıp Kitabevi.
- Ustimenko – Bakumovsky, G.V. 1983. *Plant Growing in the Tropics and Subtropics* . New York: Macmillan Publication Copy.
- Valizadeh, M. 2001 . Seed Storage Protein Profile of Grain *Legumes* Grown in Iran, Using SDS-PAGE, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 3 (4), 287-292.
- Vavilov, N.I. 1949,1950. The origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. *Chronica Botanica*. Vol. 13.