

## İzoenzim Elektroferez Tekniğinin Bitki İslahında Kullanımı

**M. Sinan TAŞPINAR**      **Metin TOSUN**  
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

**Geliş Tarihi : 04.04.2002**

**ÖZET:** İzoenzimler aynı biyokimyasal reaksiyonu katalizledikleri halde farklı molekül yapısına sahip olan enzim formlarıdır. İzoenzimler elektroforetik olarak ayrıştırıldıktan sonra oluşan bant desenleri kullanılarak, bitkilerin genetik yapılarındaki benzerlik ve farklılıklar ortaya konulabilmektedir. İzoenzim elektroferez tekniği seleksiyon süresinin kısaltılmasında, genetik akrabalıkların belirlenmesinde, çeşit ayrımında, sistematik çalışmalarda ve dayanıklılık ıslahında yaygın olarak kullanılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** İzoenzim, elektroferez, bitki ıslahı

### Use of Isoenzyme Electrophoretic Technique in Plant Breeding

**ABSTRACT:** Although isoenzymes catalyze same biochemical reaction, they are enzyme form possessing different molecular structure. Similarities and divergence in plant genetic structure can be presented by means of electrophoretic separation of isoenzymes. Isoenzyme electrophoretic technique can be used widely for shortening selection period, phylogenetic, systematic study and breeding programs.

**Key Words:** Isoenzymes, electrophoresis, plant breeding

#### Giriş

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu oluştururlar. Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 1993). İzoenzimleri ilk kez tanımlayan Markert ve Moller'e (1959) göre izoenzimler, farklı lokustaki genler tarafından kodlanan aynı substrat özelliğindeki enzimlerin çoklu moleküler formlarıdır (Bilgen ve ark. 1995). Yine, Rodwell (1993), izoenzimleri aynı organizmanın farklı dokularında ve farklı hücre tiplerinde aynı karakteristik aktivitenin farklı şekilleri olarak açıklamıştır.

Yakın zamana kadar, tür teşhisinde ve canlı popülasyonlarda genetik çeşitliliğin saptanmasıyla ilgili çalışmaların çoğunda morfometrik karakterler kullanılmaktaydı. Son zamanlarda ise genetik çeşitlilik, elektroferez yöntemi kullanılarak protein düzeyinde ölçülmeye başlanmıştır (Bushuk ve Zillman; 1978; Bushuk, 1982; Karim ve ark., 1984; Köksel ve ark., 1991; Liu ve ark, 1999; Lane, 2000; Persson ve Von Bothmer, 2000; Liu ve ark, 2001).

Elektroferez; proteinlerin, enzimlerin veya nükleik asitlerin jel üzerinde, elektrik akımının etkisiyle jelin bir ucundan diğer ucuna yürütüldüğü bir yöntemdir (Chaisurisri ve El-Kassaby, 1993). Yine, Bilgen ve ark. (1995) elektroferez tekniğini, çeşitli varyasyonları belirlemede kullanılan ve belirli bir elektriksiz alan içerisinde farklı yükler taşıyan parçacıkların anot ya da katot yönünde hareket etmesi ilkesine dayanan bir yöntem olarak tanımlamışlardır.

Günümüzde izoenzim analizleri tür ayrımında, evrim çalışmalarında, bitki varyetelerinin varyasyon analizlerinde ve ıslah programlarında sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca belirli idiotip (canlının çekirdek

ve sitoplazmasındaki faktörler tarafından kontrol edilen karakterlerin toplamı), genotip ve farklı linkage gruplarının izoenzim elektroferez tekniğiyle belirlenmesi konusunda da yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. (Seidel, 1989; Skiebe ve Selinger, 1990; Drefahl ve Buschbeck, 1991).

#### İzoenzim Elektroferez Tekniğinin Bitki İslahında Kullanım Alanları

Yıllardan beri araştırmacılar varyasyon çalışmalarında genotipi tam olarak ortaya koyabilecek, dış koşullardan etkilenmeyen özellikleri belirlemeye çalışmışlardır. Bu karakterlerden biri de o genotipin sahip olduğu protein kompozisyonudur. Gen ekspresyonunun doğrudan tercüme edildiği proteinler parmak izi olarak görev yaparlar. Her çeşidin kendine özgü biyokimyasal özelliklerinin varlığından yararlanarak, proteinlerin elektroferez yöntemi yoluyla ayrımı ve oluşan bant desenleri aracılığıyla genetik işaretçi olarak yararlanılması yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, proteinlerin elektroferezi genotiplerin belirlenmesinde, gen işaretçilerinin oluşturulmasında, genetik ve evrimsel ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılmaktadır (İlbi ve Eser, 1995; Seyhan ve ark., 1995). Ayrıca, popülasyon genetiğinde, döllenme biyolojisinde ve biyosistemikte izoenzim bantlarından yararlanılmaktadır. İzoenzim çalışmaları bakterilerde, insanlarda, kültür bitkilerinde ve ağaçlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Chaisurisri ve El-Kassaby, 1993).

Elektroforetik analizler sonucu oluşacak protein veya enzim bant desenlerinin genotipik bir özellik olması ve çevre koşullarından etkilenmemesi gibi nedenlerle özellikle çeşit tanısı, biyotip kontrolü, ebeveyn seçimi ve erken generasyonların izlenmesi, sertifikasyon çalışmaları, gen havuzundaki genetik

çeşitliliğin ortaya konulması, saf tohum üretimi, piyasadaki çeşitlerin saflığının kontrolü, sitogenetik araştırmalar, benzer morfolojik özelliklere sahip ancak biyokimyasal olarak farklı ıslah hatlarının ayırt edilmesi, akrabalıkların saptanması, bitkilerin orijini ve atalarının belirlenmesi, dayanıklılık ıslahı, populasyon genetiği ve taksonomik çalışmalar gibi konularda yararlanılmaktadır (Du Cros ve Wrigley, 1979; Shewry ve ark., 1983; Bilgen ve Çelen., 1991; Köksel ve ark., 1992; Keskin ve ark., 1995; Tanyolaç ve ark. 1995; Taşpınar, 1996; Kanlı, 1999).

### 1. Islah Programının Kısaltılmasında ve Seleksiyon Çalışmalarında Kullanımı

Bitki ıslahı programlarında seleksiyon en önemli basamaklardan birisidir. Islahçı istediği tarımsal özelliklere sahip bitkileri elde etmek için çok sayıda melezlemeler yapmaktadır. Melezleme sonucu elde ettiği projenilerin amaçlanan genetik yapıda olup olmadığının ya da verici ebeveyne genetik olarak benzeyip benzemediğinin belirlenmesi seleksiyonun en zor yönünü oluşturmaktadır. Tarla koşullarında yapılan seleksiyon çalışmaları genellikle uzun bir süreyi kapsamaktadır. Bitki ıslahçısı izoenzim elektroferez yöntemi ile bu konuda daha kısa sürede deneye dayalı sonuçlar elde edebilmektedir. Nitekim, Köksel ve ark. (1991), elektroferez tekniğinin makarnalık buğday ıslah programlarında materyalin kalite yönünden seçiminde kullanılabilecek bir test olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, elektroferez tekniği ile elde edilen protein dağılım deseninin, çeşidin genetik yapısı hakkında önemli bilgiler verdiğini bildirmişlerdir. Yine, makarnalık buğdaylarda proteinlerin elektroferez yöntemi ile incelendiği araştırmalarda, elektroferezin ıslah programlarında makarna kalitesinin, özellikle gluteninin gerçek yapısının tahmininde çok güçlü bir araç olduğu belirlenmiştir (Köksel ve ark., 1992; Veli ve ark., 1994).

Herhangi bir kültür bitkisinde istenilen tarımsal özellikleri kontrol eden bir veya bir kaç geni bir araya getirmek amacıyla yapılacak melezlemelerin planlanmasında, ebeveynlerin genetik haritalarının bilinmesi başarıyı artıracaktır. İzoenzimlerin elektroforetik analizleri ile linkage haritalarının oluşturulması, hem temel genetik araştırmalarda hem de pratik uygulamalarda önemli bir yere sahiptir (Vaquero ve ark., 1990). İzoenzimler kodominant kalıtmı oldukları için, bunların elektroforetik analizi sonucunda tüm açılma generasyonlarında homozigot genotipler heterozigotlardan ayırt edilebilirler (Bilgen ve ark., 1995)

### 2. Genetik Akrabalıkların Belirlenmesinde ve Çeşit Ayrımında Kullanımı

Bitki ıslahı programlarında, özellikle cinsler ve türler arası melezlemelerde kullanılacak ebeveynlerin birbirine genetik yönden benzer (akraba) olması melez

bitki elde edilmesi konusunda başarıyı artıracaktır. Bu nedenle melezleme programına başlamadan önce, kullanılacak genotiplerin akrabalıklarının bilinmesi yararlı olacaktır. Örneğin, bu yöntemle *Medicago sativa* ve *Medicago falcata* arasındaki akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur (Bingham ve Yeh., 1971). Yine, triticale ile bu bitkinin ebeveynleri olan buğday ve çavdarda protein elektroferezi yoluyla karşılaştırma yapan Chen ve Bushuk (1970), bu üç bitkide de benzer birçok bant gözlemiş ve türler arasındaki genetik akrabalık ile bir bitkinin evriminde genitör olarak yer alan bitkilerin belirlenmesinde elektroferez tekniğinin kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bir yazlık ve iki kışlık kültür çavdarı ile *Secale montanum*'dan elde edilmiş bir çavdar hattının 7 günlük fidelerinden alınan yapraklarda nişasta jel elektroferezi kullanılarak analizler yapılmış ve bu hatlarda bantların yoğunluklarının hattan hatta değiştiği, bu değişikliklerin de hatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyduğu bildirilmiştir (Puchalski ve Molski, 1973).

Ferguson ve Grabe (1986), varyeteler arasında genetik farklılıkların ayırt edilmesinde doğru ve hızlı laboratuvar tekniklerinin öneminden bahsetmişler ve bu amaçla elektroferez tekniğinin kullanılmasının başarıyı artıracığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar çok yıllık çimin (*Lolium perenne* L.) 28 varyetesini ele almışlar ve varyeteler arasındaki farklılıkları protein bantlarına göre belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmada ölçüt olarak bantların varlığı veya yokluğu ile bant yoğunlukları dikkate alınmıştır. Proteinler, sodyum dodecyl sülfat-poliakrilamid jel elektroferez (SDS-PAGE) yöntemiyle analiz edilmiş ve araştırma sonunda toplam 27 bant belirlenmiştir. Ayrıca, SDS-PAGE yoluyla elde edilen protein bant desenlerinin yıl, üretim yeri, tohum sınıfı, tohumun canlılığı veya iriliği tarafından etkilenmediği ileri sürülmüştür.

Weibull ve ark. (1991), koyun yumağı (*Festuca ovina* S.L.) bitkisinin doğal populasyonları ve ticari varyeteleri arasındaki genetik varyasyonu belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmanın sonucunda varyetelerin orijinlerinin belirlenmesinde ve taksonomik çalışmalarda izoenzim farklılıklarının kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Farklı yulaf hatları arasındaki genetik ilişkilerin araştırıldığı bir çalışmada RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) tekniği ve izoenzimlerin elektroforetik analizi birlikte ele alınmış ve bu amaçla 23 izoenzim sistemi kullanılmıştır. Deneme sonuçlarına göre incelenen hatlarda 23 izoenzimin 21 tanesi hatlar arasındaki varyasyonu belirlemede kullanılabileceği belirlenmiştir (Heun ve ark., 1994).

Mısır bitkisinde genetik saflığın kontrolü amacıyla dört farklı izoenzim (MDH, PGI, ADH ve PGM) kullanarak elektroforetik analiz yapan Bilgen ve ark. (1995), her bir melez mısırdan değişik bantlar elde etmişler ve bu bant desenlerini gösteren zimogramlar çizmişlerdir. Araştırmacılar zimogramaları anodal

migrasyonlu bantların sayısına ve kalınlığına göre değerlendirmişler ve böylece MDH izoenziminin melez mısır ticari varyetelerinde polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda izoenzim elektroforezinin hem genotiplerin belirlenmesinde, hem de melez bitkilerin genetik saflığının kontrol edilmesinde uygun bir yöntem olduğunu ve buna bağlı olarak izoenzimlerin temel araştırmalar ile ticari uygulamalarda güvenilir genetik işaretçi olarak geniş bir uygulama alanı bulacağını bildirmişlerdir.

Tohum biçimi, rengi, kökçük biçimi, kılçıklılık gibi morfolojik özellikleri birbirine benzeyen yulaf çeşitlerinin ayırımında izoenzim elektroforezi kullanılmış ve belirtilen özellikler bakımından benzerlikler gösteren çeşitler genetik olarak birbirlerinden ayrılmıştır (Örçen ve ark. 1995).

Persson ve Von Bothmer (2000), değişik bölgelerden topladıkları 26 çavdar genotipinde izoenzim elektroforez yöntemini kullanarak, genotipler arasındaki farklılıkları ve birbirlerine yakınlık derecelerini belirlemişlerdir. Ayrıca, çeşit ayırımında ve türlerin genetik akrabalıklarının belirlenmesinde izoenzim elektroforezinin güvenilir bir yol olduğu bildirilmiştir.

### 3. Sitogenetik Çalışmalarda Kullanımı

Farklı buğday-çavdar adisyon hatlarında (bir veya birkaç kromozom ilave edilmiş hatlar) çalışan Salinas ve Benito (1984), çavdarda (*Secale cereale* L.) peroksidaz izoenziminin meydana gelmesini sağlayan yapısal genlerin kromozomlardaki yerlerini belirlemek amacıyla kuru tohum, yaprak ve köklerden izole ettikleri enzimler üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar, bu enzimi kontrol eden genlerin kromozom kolları üzerindeki yerlerini saptamışlardır. Yine Salinas ve Benito (1985) tarafından aynı materyalle yapılan başka bir denemede, malat dehidrogenaz izoenziminin kodlandığı yapısal genler belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırmacılar, malat dehidrogenaz enziminin monomerik ve dimerik davranışlarıyla, bu enzimin sentezlendiği kromozom kollarını belirlemişlerdir.

Buğday, çavdar ve arpanın bazı adisyon hatları üzerinde yapılan bir çalışmada peroksidaz izoenzimlerinin oluşturduğu bantlar incelenerek bu bitkiler arasındaki genetik ilişki belirlenmiştir. İzoenzim analizleri için tohumlar filtre kağıtları üzerinde çimlendirilmiş ve 12 günlük fidelerin yaprakları kullanılmıştır. Araştırma sonucunda peroksidaz izoenzimine ait yapısal genlerin çavdarda 2R, buğdayda 2B, 2D ve muhtemelen 2A, arpada ise 2H kromozom kolları üzerinde yer aldığı ve peroksidaz izoenzimlerinin bu kromozomlar için yeni bir genetik işaretçi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Bosch ve ark. 1986).

Skiebe ve Selinger (1990), 4 çavdar varyetesinde aspartate aminotransferase ve NAD-aromatik alkol dehidrogenaz izoenzimlerini analiz etmişler ve bu izoenzimlerin iki gen lokusundan kaynaklandığını ortaya koymuşlardır. Enzim analizleri yoluyla nulliplex (aaaa),

simplex (Aaaa), dublex (AAaa), triplex (AAAa) ve quadriples (AAAA) tipleri ayırt edebilmişlerdir. Araştırmacılar, bu tip genetik yapıya sahip bitkileri daha embriyo gelişimi dönemindeyken izoenzim işaretçileri ile belirlemişlerdir. Bu çalışma sonunda, enzimlerin zimogramlardaki bant pozisyonu ve yoğunluğu ile genetik yapı arasındaki ilişkinin saptanması durumunda, autopoliploidlerin ıslahında karşılaşılan bir takım zorlukların daha kolay aşılmasına yardımcı olabileceği ortaya konulmuştur.

### 4. Sistematik Çalışmalarda Kullanımı

Bitkilerde sistematik çalışmaların fenotipik özelliklere göre yapılması nispeten uzun bir süre gerektiren bir uygulama olduğu gibi, bazı durumlarda tam bir ayırım da yapılamayabilir. Bu amaçla enzim veya DNA düzeyinde elektroforez çalışmalarının yapılması oldukça yararlıdır. Nitekim, dört farklı *Iris* türünde izoenzim ve protein elektroforezi yoluyla bir karşılaştırma yapılmıştır. Bu amaçla protein ve polifenol oksidaz (PPO) ile peroksidaz (PRX) izoenzim bantları oluşturulmuş ve oluşan bantlara göre *I. taochia* ile *I. iberica* arasında ve *I. spuria* ile *I. sari* arasında benzerlikler olduğu tespit edilmiştir (Şenel ve Kadioğlu, 1992). *Iris* sistematğinde olduğu gibi tüm sistematik çalışmalarda izoenzim elektroforezi tekniğinin tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Taşpınar (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, hem kültür çavdarının hem de çok yıllık çavdarın diploid ve tetraploidleri elektroforez yönteminden yararlanılarak bazı izoenzimler (peroksidaz, polifenol oksidaz ve malat dehidrogenaz) yönünden karşılaştırılmıştır. Bu enzimlerin, tek yıllık kültür çavdarı ile çok yıllık çavdar arasında genetik akrabalığın incelenmesinde kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır. Araştırma sonucunda incelenen enzimlerin oluşturdukları bant desenlerine göre, *Secale cereale*'nin evrimine *Secale montanum*'un genitör olarak katıldığı belirlenmiştir. Böylece çavdarda yapılacak akrabalık belirleme çalışmalarında bu enzimlerin kullanılabileceği bildirilmiştir.

Farklı gül çeşitlerinin genetik olarak tanımlanması ve taksonomisi için yapılan çalışmaların daha önce morfometrik karakterlerle yürütüldüğünü bildiren Grossi ve ark. (1997) izoenzim elektroforez tekniğini kullanarak, 21 gül popülasyonunda bu amaçla bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar, sistematik çalışmalarda izoenzimlerle yapılacak elektroforetik değerlendirmelerin, diğer yöntemlerle belirlenmesi zor olan uzak genetik akrabalıkları ortaya çıkarmada çok başarılı sonuçlar verdiğini ve parmak izi analizi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Gauthier ve ark. (1999), domuz ayrığı, Toumi ve Lumaret (2001) ise meşe bitkisi için yaptıkları sistematik çalışmalarda izoenzim elektroforez tekniğini kullanmışlardır.

## 5. Populasyon Genetiği Çalışmalarında Kullanımı

Bitki populasyonlarında yapılacak populasyon içi ve populasyonlar arası genetik ilişkilerin belirlenmesinde izoenzim elektroferez yöntemi yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Lumeret ve Hanotte (1987), Doğu İsviçre Alplerindeki domuz ayrığı populasyonlarında 7 enzim sistemiyle çalışarak populasyonlar arası farklılığı izoenzim elektroferezi yolu ile araştırmışlardır. Bu populasyonlar arasında çeşitli enzimatik farklılıklar olduğunu belirten araştırmacılar, bu populasyonlar arasında gen alış-verişinin meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Güneydoğu Asya'da yetişen *Agathis borneensis*'in doğal populasyonlarında 12 enzim kullanılarak populasyonlar arasındaki farklılıklar izoenzim elektroferez yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Populasyonlar arasında önemli farklılıklar olduğu, bu farklılıkların populasyonlar arasındaki gen alış-verişinin sınırlı olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Kitamura ve Rahman, 1992).

Buğday, çavdar ve tritcalede cinsler arası ve tür içi varyasyonların belirlenmesinde elektroferez yöntemi kullanılmıştır (Sesli ve ark. 1995).

Erzurum yöresinde doğal olarak yetişen domuz ayrığının dört populasyonunda populasyonlar arası ve populasyon içi varyasyonları belirlemek ve bunlar arasındaki genetik akrabalık derecesini tespit etmek amacıyla malat dehidrogenaz, peroksidaz ve polifenoloksidaz enzimleri kullanılarak elektroferez tekniği uygulanmıştır. Hem populasyon içinde hem de populasyonlar arasında incelenen enzimler yönünden geniş varyasyon olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada domuz ayrığında genotipler arasındaki varyasyonu belirlemede söz konusu enzimler kullanılarak bu yöntemden yararlanılabileceği ortaya konulmuştur (Tosun, vd., 2002).

Moghaddam ve ark. (2000), izoenzim elektroferez tekniğini kullanarak Türkiye, Suriye, Lübnan, Ermenistan ve İran bölgesine ait 23 *Triticum urartu* populasyonunda genetik yakınlık, populasyon içi ve populasyonlar arası varyasyonu belirlemiştir. Populasyonlar arası varyasyon en fazla İran, daha sonra Türkiye populasyonlarında gözlenmiştir. Ermenistan populasyonları ise en fazla genetik yakınlık gösteren populasyonlar olmuştur. Türkiye ve Ermenistan populasyonlarına ait bitkiler coğrafik olarak diğerlerine göre daha yakın bölgelerden toplanmış olmalarına rağmen, aralarında en fazla varyasyon gösteren populasyonlar olmuşlardır. Araştırmacılar, populasyonların genetik yakınlıklarının belirlenmesinde izoenzim elektroferez tekniğinin kısa sürede kesin sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Birçok bitkide populasyon içi ve populasyonlar arası varyasyonların belirlenmesinde izoenzim elektroferez tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır (Ağar, 1996;

Reeves ve ark., 1998; Lia ve ark., 1999; Casler ve ark., 2000).

## 6. Dayanıklılık Islahı Çalışmalarında Kullanımı

Hastalıklara, zararlılara veya çeşitli çevresel streslere dayanıklı çeşit elde etmek bitki ıslahının en önemli konuları arasında yer almaktadır. Geleneksel ıslah yöntemi ile çeşitli biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı bitkilerin belirlenmesi ve seçimi oldukça yoğun bir iş gücünü ve uzun bir süreyi gerektirmektedir. Dayanıklı bitkilerin seçimi aşamasında izoenzim elektroferez tekniğinden yararlanılabilmesi durumunda hem süre kısalacak hem de iş gücü ve maliyet en az düzeye inecektir.

Hassett ve ark. (1993), dünyadaki mevcut heksaploid buğday hatlarından rastgele seçilen 250 hatta, buğday hastalık ve zararlılarına karşı dayanıklılığı sağlamada etkili olduğu tespit edilmiş akonitaz, alkol dehidrogenaz ve glukoz fosfat izomeraz izoenzimleri kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar, söz konusu enzimler kullanılarak heksaploid buğdaylarda dayanıklı genotiplerin seçilebileceğini bildirmişlerdir.

Soğuğa dayanıklılık çalışmalarında izoenzim elektroferezi önemli bir moleküler işaretçi olarak kullanılmaktadır. Bir çok araştırmacı izoenzim elektroferez yöntemini soğuğa dayanıklı çeşitlerin belirlenmesinde kullandıklarını bildirmişlerdir (Krasnuk ve ark., 1978 a; Gatschet ve ark., 1996; Montene ve ark., 1997; Castonguay ve Nadeau, 1998). Örneğin, soğuğa toleranslı Vernal ve soğuğa duyarlı Sonora yonca çeşitlerinde soğuğa dayanıklılık ile glutamat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, izositrat dehidrogenaz, 6-fosfoglikonat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri arasındaki ilişki elektroferez yöntemini kullanarak incelenmiştir (Krasnuk ve ark. 1978a). Araştırmada, çözünebilir proteinlerin soğuğa dayanıklılıkla ilişkileri olduğu ve soğuk uygulaması ile glutamat dehidrogenaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerinin arttığı, bu enzimlerin soğuğa dayanıklılık çalışmalarında bir seleksiyon ölçütü olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Yine, soğuğa duyarlı ve soğuğa toleranslı yonca çeşitleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada bitkilere değişik soğuk (-6, -8 ve -10 °C) uygulaması yapılmıştır. Toplam çözünebilir protein içeriği soğuğa toleranslı çeşitlerde daha yüksek olmuştur (Krasnuk ve ark., 1978 b). Yine, Ostroumova ve ark. (2001) soğuğa dayanıklılık çalışmalarında izoenzim elektroferez yönteminin kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Arpada topraktan bulaşan virüslere (Erdoğan ve ark., 1995), buğdayda hastalık ve soğuğa (Küsmenoğlu ve ark. 1995) dayanıklı genotiplerin seçilmesi çalışmalarında, izoenzim elektroferez tekniği kullanılmıştır.

Farklı ploidi seviyesindeki domuz ayrığı genotiplerinde kurağa dayanıklılığın belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada fosfoglikoizomeraz,

tetrazolium oksidaz, glutamat-oksalosetat transaminaz ve asit fosfataz enzimleri kullanılarak elektroforez yapılmıştır. Araştırmada, tetraploid bitkilerin diplodlere göre daha fazla polimorfizm gösterdiği ve kullanılan genotiplerin kurağa dayanıklılık yönünden ayrıldığı bildirilmiştir (Garcia ve Lindner, 1998).

Tuz stresinde etkili olduğu belirlenen glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi kullanılarak buğdayda yapılan bir çalışmada, izoenzim elektroforez tekniği ile dayanıklı genotiplerin belirlenebileceği bildirilmiştir (Nemoto ve Sasakuma, 2000).

## KAYNAKLAR

- Ağar, G., 1996. *Vicia canescens* populasyonlarında izoenzim varyasyonu. Doktora Tezi. Atatürk Üniv. Fen Bilim. Enst., Erzurum.
- Bilgen, G., Çelen, A.E., 1991. İzoenzim elektroforez tekniğinin yonca ıslahında kullanıma olanakları. Türkiye 2. Çayır-Mer'a ve Yembitkileri Kongresi, 28-31 Mayıs 1991, İzmir, s. 532-539.
- Bilgen, G., Erdoğan, M., Özdemir, N., Yavuzylmaz, E., 1995. Melez mısır ticari varyetelerinde izoenzim elektroforez yöntemiyle genetik saflık kontrolü üzerine bir araştırma. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s119-125.
- Bingham, E.T., Yeh, K.J., 1971. Electrophoretic pattern among alfalfa seed proteins from selected varieties, experimental stocks, and species accessions. *Crop Sci.*, 11, 58-61.
- Bosch, A., Figueiras, Ana M., Gonzales-Jaen, M.T., Benito, C., 1986. Leaf peroxidases-A biochemical marker for the group2 chromosomes in the *Triticinae*. *Genetical Research.*, 47, 103-107.
- Bushuk, W., Zillman, R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. *Can. J. Plant. Sci.*, 58, 505-515.
- Bushuk, W., 1982. Wheat proteins, their properties and role in Breadmaking quality of flour. *Grains and Oilseeds-Handling, Marketing, Processing.* s.531-551.
- Casler MD, Fales SL, McElroy AR, Hall MH, Hoffman LD, Leath KT., 2000. Genetic progress from 40 years of orchardgrass breeding in North America measured under hay management. *Crop. Sci.* 40 (4): 1019-1025.
- Castonguay Y., Nadeau, P., 1998. Enzymatic control of carbohydrate accumulation in cold-acclimated crowns of alfalfa. *Crop. Sci.* 38:1183-1189.
- Chaisurisri, K., El-Kassaby, Y.A., 1993. Genetic control of isoenzymes in Sitka Spruce. *J. of Heredity.*, 84, 206-211.
- Chen, C.H., Bushuk, W., 1970. Nature of proteins in triticale and its parentel species III. a comparison of their electrophoretic patterns. *Can. J. Plant Sci.*, 50, 25-30.
- Drefahl, S., Buschbeck, R., 1991. Gene localization of Aspartate Aminotransferase and Endopeptidase isozymes in Wheat and Rye using developmental and organ-specific patterns. *Plant Breed.*, 107, 218-225.
- Du Cros, D.L., Wrigley, C.W., 1979. improved electrophoretic methods for identifying cereal varieties. *J. Sci. Food. Agric.*, 30, 785-794.
- Erdoğan, M., Le Gouis, J., Ordon, F., Friedt, W., 1995. Toprakta bulaşan virüslere karşı Mukavemet ıslahında izoenzim elektroforezinden yararlanma olanakları. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s28-33.
- Ferguson, J.M., Grabe, D.F., 1986. Identification of cultivars of perennial Ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. *Crop Sci.*, 26, 170-176.
- Garcia, A., Lindner, R., 1998. *Dactylis glomerata* genetic researches: Allozyme frequencies and performance of two subspecies on an acid sandy loam with summer drought. *Euphytica* 102:255-264.
- Gatschet, M.J., Taliaferro, C.M., Porter, D.R., Anderson, M.P., Anderson, J.A., Jackson, K.W., 1996. A cold-regulated protein from bermudagrass crowns is a chitinase. *Crop. Sci.* 36, 712-718.
- Gauthier, P., Lumaret, R., Buducarrats, A., 1999. Genetic introgression between tetraploid *Dactylis glomerata* subsp. *reichenbachii* and *glomerata* in the French Alps. Insight from morphological and allozyme variation. *Plant Systematics and Evolution* 214:219-234.
- Grossi, C., Raymond, O., Jay, M., 1997. Isozyme polymorphism of *Rosa* spp. and cultivar identification. *Euphytica* 98: 11-19.
- Hasset, S.W., Mcmillin, D.E., Johnson, J.W., 1993. Aconitase and glucose phosphate isomerase variation in hexaploid wheat. *Can. J. Plant Sci.*, 73, 743-748.
- Heun, M., Murphy, J.P., Phillips, T.D., 1994. A comparison of RAPD and isoenzymes analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.*, 87, 689-696.
- İlbi, H., Eser, B., 1995. *Brassica oleracea* türünde botanik varyete ve kültür varyetelerinin tohum proteinleri ile ayırıldılması. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s89-96.
- Karim, M.A., Mehta, S.L., Singh, M.P., 1984. Studies on esterase isoenzyme pattern in anthers and seeds of male sterile Wheats. *Z. Pflanzzüchtg.*, 93, 309-319.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, İ., 1993. *Biyokimya. Derya Kitapevi Yay. Trabzon*, s. 90-134.
- Keskin, S., Asal, S., Koyuncu, O., 1995. Bazı Türk ekmeçlik buğday çeşitlerinin melezlerinde gliadin bant patternlerinin genetik analizi. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s45-51.
- Kitamura, K., Rahman, M.Y.B.A., 1992. Genetic diversity among natural populations of *Agathis borneensis* (Araucariaceae), a tropical rain forest conifer from Brunei Darussalam, Borneo, Southeast Asia. *Can. J. Bot.*, 70: 1945-1949.
- Köksel, H., Özkaya, H., Atlı, A., Koçak, N., 1991. Elektroforez tekniği ile makarnalık buğdaylarda kalite belirlenmesi. *Doğa Türk Tar. ve Orm. Der.*, 16, 392-399.
- Köksel, H., Atlı, A., Özkaya, H., 1992. Makarnalık buğday ıslahı programlarında kalite seleksiyonunda markör proteinlerin kullanımı. *Doğa Türk Tar. ve Orm. Der.*, 17, 531-536.
- Krasnuk M., Jung, G.A., Witham, F.H., 1978 a. Dehydrogenase levels in cold-sensitive alfalfa. *Agr. J.* 70,605-613.
- Krasnuk, M., Witham, F.H., Jung, G.A., 1978 b. Hydrolytic enzyme differences in cold-tolerant and cold-sensitive alfalfa. *Agron. J.* 70,597-605.
- Küsmenoğlu, İ., Akçin, A., Erskine, W., Aydın, N., 1995. Mercimekte (*Lens culinaris medik.*) isozyme varyasyonu ve kış mukavemet ile ilişkisi. Workshop Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s34-44.
- Lane, B.G., 2000. Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: Germins. *Biochemical Journal.* 349:309-321.
- Lia, V., Comas, C.I., Cortés, M.C., Hunziker, J.H., 1999. Isozyme variation in *Larrea ameghinoi* and *Larrea nitida* (Zygophyllaceae): genetic diversity and its bearing on their relationship. *Genetica* 106:197-207.
- Liu F., von Bothmer, R., Salomon, B., 1999. Genetic diversity among East Asian accessions of the barley core collection as revealed by six isozyme loci. *Theor Appl Genet* 98:1226-1233.
- Liu F., Sun, G.L., Salomon, B., 2001. Distribution of allozymic alleles and genetic diversity in the American Barley Core Collection. *Theor Appl Genet* 102:606-615.
- Lumaret, I., Hanotte, C., 1987. Evidence of ecotype of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.) from subalpine dolomitic meadows in Griosons (Switzerland). Origin and gene Exchange with cocksfoot from adjacent fields. *Acta Oecologica.* 8:3-20.
- Markert, C.L., Moller, F., 1959. Multiple forms of enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45:753-763.
- Moghaddam, M., Ehdaie, B., Waines, J.G., 2000. Genetic diversity in populations of wild diploid wheat *Triticum urartu* Tum. ex. Gandil. revealed by isozyme markers. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 47:323-334.

- Montené M.H., Dreyer, S., Triantaphylides, C., Kloppstech, K., 1997. Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta*, 202, 293-302.
- Nemoto, Y., Sasakuma, T., 2000. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.*, 158:53-60.
- Ostrouma E.A., Ostroumov, V.A., Sumina, O.N., Misharin, S.I., Antipina A.I., Grabelnyh, O.I., Zykova, V.V., Pobezhimova, T.P., Kolesnichenko, A.V., 2001. The search for proteins with immunochemical affinity to plant stress proteins at cold-adapted endemic Baikhal fishes. *Journal of Thermal Biol.*, 26:209-214.
- Örçen, N., Bilgen, G., Demir, İ., De Joung, D.W., 1995. Yulaf (*Avena sativa* L.) depo proteini (prolamin)'nin elektroforeziyle çeşit tanımı. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s72-80.
- Persson K., Von Bothmer, R., 2000. Assessing the variation in cultivars and Swedish landraces of rye (*Secale cereale* L.). *Hereditas*, 132:7-17.
- Puchalski, J., Molski, B., 1973. Esterases variability within some Polish rye cultivars. *Plant Breed. Abs.* 19, 479-485.
- Reeves G, Francis D., Davies MS., Rogers HJ., Hodkinson TR., 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany.* 82: 99-105
- Rodwell, V.W., 1993. Enzimler: Genel Özellikleri (Çeviren: G. Menteş). Harper'ın Biyokimyası (E.D: R. K. Murrey, P. A. Mayes, D. K. Granner, V. W. Rodwell; Çeviren: G. Menteş, B. Ersöz) Barış Kitapevi. s73-86.
- Salinas, J., Benito, C., 1984. Chromosomal Location of peroxidase structural genes in Rye (*Secale cereale* L.). *Z.Pflanzenzüchtg.*, 93, 291-308.
- Salinas, J., Benito, C., 1985. Chromosomal Location of Malat dehidrogenase structural genes in Rye (*Secale cereale* L.). *Z.Pflanzenzüchtg.*, 93, 291-308.
- Seidel, A., 1989. Isoenzyme als biochemische und genetische marker zur identifizierung von weizen chromozomen in roggen-cytoplasmatischen. Roggen-Weizen-Additionen, Diss. Math. Nath. Fak., Hochsch. Güstrow.
- Sesli, M., Erdoğan, M., Demir, İ., 1995. Bazı tahıl türlerinde glutenin ve albumin proteinlerinin parmak izlerine göre tanımlamaları üzerine araştırmalar. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s61-71.
- Seyhan, G., Bilgen, G., Demir, İ., De Joung, D.W., 1995. Buğday (*T. aestivum*, *T. durum*) depo proteinleri gluten (glutenin+gliadin)'in elektroforezi ile çeşit tanımlanması. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s81-88.
- Shewry, P.R., Parmar, S., Mifflin, B.J., 1983. Extraction, separation and polymorphism of the prolamin storage proteins (Secalins) of rye. *Cereal Chem.*, 60, 1-6.
- Skiebe, K., Selinger, P., 1990. Isoenzymes and their importance for breeding autopolyploids. *Plant Breed.*, 105, 106-111.
- Şenel, G., Kadioğlu, A., 1992. An electrophoretical study on some enzymes and proteins of four *Iris* L. species. *Doğa Tr. J. Bot.*, 16, 1-6.
- Tanyolaç, B., Bilgen, G., Demir, İ., De Joung, D.W., 1995. Gliadin ve glutenin proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforezi ile buğday çeşitlerinin tanımlanması üzerinde bir araştırma. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s 52-60.
- Toumi L, Lumaret, R., 2001. Allozyme characterisation of four Mediterranean evergreen oak species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29 (8): 799-817.
- Taşpınar, M., 1996. Diploid ve tetraploid *Secale montanum* Guss. ve *Secale cereale*'da bazı izoenzimlerin elektroforetik analizi. Atatürk Üniv. Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum.
- Tosun, M., Akgün, İ., Taşpınar, M.S., Kanlı, M., 2002. Determination of variations of some enzymes in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) ecotypes. *Acta Agric. Scandinavica Sec. B. Soil and Plant Sciences* (in pres).
- Vaquero, F., Rebordinos., L., Vences, F.J., Perez de la Vega, M., 1990. Genetic mapping of isozyme loci in *Secale cereale* L. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 88-94.
- Veli, S., Tükel, S.S., Genç, İ., Bilgin, R., Özkan, H., 1994. Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) çeşitlerinin kalite özelliklerinin SDS-PAGE ve bazı kimyasal yöntemlerle belirlenmesi. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt II, Bitki Islah Bildirileri, 25-29 Nisan 1994, İzmir, s. 5-11.
- Weibull, P., Ghatnekar, L., Bengtsson, B.O., 1991. Genetic variation in commercial varieties and natural populations of Sheep's Fescue (*Festuca ovina* S. L.). *Plant Breed.*, 107, 203-209.