

İzmir Su Kurbağası (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) Populasyonlarında Laktat Dehidrogenaz, Malat Dehidrogenaz ve Superosid Dismutaz Fenotipleri

Nurşen Alpagut Keskin¹, Beria Falakalı Mutaf²

¹ Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, 35100, Bornova İzmir
² Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimleri Bölümü, 07058, Antalya

Abstract: *Lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase ve superosid dismutase phenotypes of Izmir waterfrog populations.* In the water frogs collected from Izmir Region pertaining to *R. ridibunda*, lactate dehydrogenase (LDH E.C. 1.1.1.27), malate dehydrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37) and superoxide dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1.) loci were studied by applying Polyacrylamide Gel Disc Electrophoresis on extracts of liver, skeletal and heart muscle. All the loci that we examined exhibit different phenotypes for each tissue extracts. Our study presents a procedure for each enzyme loci that observing all the variations related to different tissues and electroporetic conditions.

Key Words: Rana, waterfrog, electrophoresis, isozyme, allozyme.

Özet: İzmir civarından elde edilen *Rana ridibunda* türüne dahil su kurbağalarında laktat dehidrogenaz (LDH E.C. 1.1.1.27), malat dehidrogenaz (MDH, E.C. 1.1.1.37) ve superoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1.) lokusları karaciğer, kas ve kalp kası ekstraktlarında poliakrilamid disk jel elektroforeziyle çalışılmıştır. İncelenen tüm lokuslar her bir doku ekstraktı için farklı fenotipler sergilemiştir. Çalışmamız her bir enzim lokusu için doku ve elektroforetik koşullara bağlı varyasyonların izlenebileceği bir prosedür sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Rana, su kurbağası, elektroforez, izoenzim, alloenzim.

Giriş

Rana genusuna dahil su kurbağaları oldukça konservatif bir morfolojiye sahiptir. Ayrıca çok farklı coğrafya ve habitatlara başarıyla uyum sağlayabilmektedir. Türkiye'nin de dahil olduğu batı Paleartik bölgede, *Rana* genusunun 7 gerçek türü ile geçmişte ve günümüzde, türler arası hibridizasyonlardan kaynaklanmış bir çok hibrid formların yaşadığı belirlenmiştir (Berger, 1973; Schultz, 1969; 1977; Hotz 1974; 1983; Dubois, 1977; Hotz ve Bruno, 1980; Graf ve Pelaz, 1989). Bu türler Graf and Pelaz (1989)'da *R. ridibunda*, *R. lessonae*, *R. perezi*, *R. saharica*, *R. epirotica*, *Rana* species I ve *Rana* species Y olarak belirtilmektedir. Ancak

bugün bölge için verilen listelerde tür sayısı ve birçok türün dağılım alanı değişmiştir (Dubois ve Ohler, 1994).

Türkiye'de yaşayan su kurbağaları, yapılan birçok araştırmada *Rana ridibunda* (*Rana ridibunda* Pallas, 1771) türüne dahil edilmektedir (Mertens, 1952; Başoğlu ve Özeti, 1973; Baran ve Atatür, 1997) Morfolojik (Arıkan, 1988, 1990; Kumlutaş ve diğ., 1999; Sinsch ve Schneider, 1999) ve serolojik (Arıkan 1983, c1990) araştırmalar Batı ve Kuzey Anadolu'da (Kumlutaş ve diğ., 1999) *R. ridibunda ridibunda* ve Beyşehir gölü (Arıkan, 1988), Eğirdir, Suğla gölleriyle Çarşamba Suyu ve kolları (Atatür ve diğ., 1990) Gölcük, Hotamış gölü ve Torosların eteklerine kadar (Arıkan ve diğ., 1994) *R. ridibunda caralitana*

Arıkan 1988 olmak üzere iki farklı alttürün bulunduğunu göstermiştir. Sitotaksonomik analizlerle bu iki formun karyolojik olarak da birbirinden ayrıldığı gösterilmiştir (Alpagut ve Falakalı, 1995). Ayrıca Batı ve Güney Anadolu populasyonları *Rana levantina* Schneider ve diğ. 1992 populasyonlarına (Joermann ve diğ., 1988) ve Gülşehir populasyonu ise Kazakistan, Ermenistan ve Trakya populasyonlarına (Schneider ve Sinsch, 1999) biyoakustik olarak daha yakın bulunmuştur. Bugün için hem *R. ridibunda caralitana* hem de *R. levantina*, nomenklatür önceliği nedeniyle *Rana bedriagae* Camerano 1882'nin sinonimi olarak ele alınmakta ancak belirtilen sinonimliliğin daha ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerekliliği vurgulanmaktadır (Dubois ve Ohler, 1994; Sinsch ve Schneider, 1999). Bunun yanı sıra, Anadolu'da bazı morfolojik farklar gösteren formların varlığı bilinmektedir (Budak ve diğ., 2000; Tok ve diğ., 2000).

Elektroforetik enzim analizleri, tür içi ve türler arası genetik varyasyon araştırmalarında yaygın bir yöntemdir. Elde edilen allel frekanslarının analiziyle türler ve bir türün farklı populasyonları arasındaki genetik uzaklık (*D*: genetic distance) hesaplanabilmektedir. Taksonomik ve filogenetik çalışmalarda önemli bir veri grubu oluşturan allel kompozisyonu ve bir lokustaki allel frekanslarının analizi için çok değişik analiz yöntemleri bulunur (Nei, 1972; 1976; Buth, 1984; Swofford ve Selander, 1981; Felsenstein, 1985). Amphibiler'de türler arası *D* değeri yaklaşık 0.1-3 ve *Rana* genusu içinde türler arası ortalama uzaklığın 0.9 (0.35-1.5) olduğu belirlenmiştir (Avise ve Aquadro, 1982; Sumida ve Nishioka, 1994b).

Kurbağalardan ekstrakte edilen çeşitli enzimlerin elektroforetik analizleri, ilk kez *Rana pipiens*, *R. palustris* ve *R. sylvatica*'da laktat dehidrogenaz (LDH) (Wright ve Moyer, 1966; 1968) ve daha

sonra *Rana pipiens* grubunda malat dehidrogenaz (MDH), izositrat dehidrogenaz (IDH), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6-PGD) için gerçekleştirilmiştir (Wright ve Subtelny, 1971; 1973; Subtelny, 1974; Wright, 1975; 1976; 1978; Wright ve diğ., 1976).

Batı Palearktık bölgede yaşayan su kurbağaları grubunda benzer analizler üyeler arasındaki olası ilişkileri belirlemek ve özellikle farklı coğrafik bölgelerde yaşayan populasyonlar ve hibridogenetik olarak üreyen türlerde ebeveyn türler ve hibridlerini karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Orta Avrupa *R. ridibunda*, *R. lessonae* ve hibrid tür *R. esculenta* populasyonları karşılaştırıldığında *R. ridibunda* ve *R. lessonae*'nin özellikle α -GPD ve AAT fenotipleri bakımından kolaylıkla ayırt edilebildiği, ancak bu iki türün gen havuzlarının bazı noktalarda birbirine karışabildiği belirtilmektedir. Ayrıca *R. ridibunda* populasyonları için, GPI lokusundaki hızlı allelin frekansında, kesin olmamakla birlikte, enlemsel bir meyil saptanmıştır (Uzzell ve Berger, 1975). Bunu izleyen çalışmalarda Türkiye'den elde edilen *R. ridibunda* örneklerinin, Orta Avrupalı örneklerden daha çok "*lessonae*" benzeri allellere sahip oldukları belirtilmektedir (Uzzell ve diğ. 1977). Bu üç tür, Palearktık bölgede dağılım gösteren doğulu türlerle birlikte incelendiklerinde en küçük *D* değerleri *R. esculenta* ve ebeveyn türleri arasında elde edilmiştir (Nishioka ve Sumida, 1992).

Rana ridibunda'nın orta ve güney Avrupa, Kuzey Afrika ve batı Asya'da geniş bir dağılımı olduğuna dair görüşler lokal populasyonlar arası elektroforetik enzim çalışmalarıyla yavaş yavaş değişmeye başlamıştır. İsrail su kurbağaları 11 populasyonda (n:340) 28 enzim lokusu bakımından incelendiğinde homojen bir görünüm sergilemiş ve populasyonlar arası ortalama *D*: 0.028 (0.006-0.056 aralığında) olarak

hesaplanmıştır (Nevo ve Yang, 1982). Ancak bu populasyonlar (3 populasyon, n:6) Yunanistan su kurbağalarıyla (1 populasyon, n:6) 41 enzim lokusu bakımından karşılaştırıldığında 16 lokus, populasyon içi ve populasyonlar arası polimorfizm göstermiştir. Bu iki populasyon arasında belirlenen *D*: 0247 değerinin ve 1.200.000 yıl öncesi olarak hesaplanan evlasyonel ayrılma zamanının, İsrail ve Yunanistan populasyonlarının evlasyonel olarak Orta Pleistosen'de ayrılan çok yakın ikiz türler olduğu görüşünü ortaya çıkarmıştır (Nevo ve Fillipucci, 1988).

İzoenzim analizleri 90'lı yıllarda tanımlanan yeni *Rana* taksonlarında da etkin olarak kullanılmıştır. Schneider ve diğ. (1992) *R. levantina*'nın özellikle ME-1, G3PDH, IDH-2 ve ACO-1 lokuslarındaki alleller bakımından *R. ridibunda*'dan fark gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde *R. cretensis* ve *R. cerigensis* (Beerli ve diğ., 1994) özellikle enzim elektroforezi ve ses analizleriyle yeni türler olarak tanımlanmışlardır. Bu iki yeni tür için, özellikle batı Paleartik su kurbağalarıyla allelik ortaklık gösteren lokuslarda sabit allellerin bulunmasının diagnostik önem kazandığı belirtilmektedirler. Schneider ve Sinsch (1992) ve Schneider ve diğ. (1993) Yunanistan'da, çiftleşme çağrı yapıları bakımından, Trakya ve Samothraki adası *R. ridibunda* populasyonlarından farklı ikinci bir türün bulunduğunu belirterek, *Rana balcanica*'yı yeni bir tür olarak tanımlamışlardır. Türün LDH-1, 6-PGDH, ve ADA lokuslarında *R. ridibunda*'da bulunanlardan daha hızlı elektromorflarının bulunmasıyla karakterize olduğu belirtilmektedir. Biyoakustik verilere dayanarak *R. ridibunda* ve *R. balcanica* aynı Avrasyalı bir soydan, *R. levantina* ve *R. perezi* bağımsız diğer bir soydan ikiz türler olarak ele alınmaktadır (Schneider ve

Sinsch, 1992).

Elektroforetik enzim analizleri, taksonomik araştırmalar dışında yetiştirme denemeleri ve oosit kromozom özellikleriyle birlikte, çalışılan enzim lokuslarının kromozomal yerleşimlerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Bu yöndeki bağlantı analizleri, ilk kez *Rana nigromaculata* ve *R. brevipoda*'da LDH, MDH, α -GDH, IDH, Hb, Ab ve serum protein C lokuslarında gerçekleştirilmiştir (Nishioka ve diğ., 1980). Bunu izleyen araştırmalar özellikle farklılaşmış cinsiyet kromozomlarına sahip türlerde cinsiyete bağlı genlerin belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Ferrier ve diğ., 1983; Dournon ve diğ., 1984; Wright and Richards, 1983; Wright ve diğ., 1983; Sumida ve Nishioka, 1994a). Amfibiler'de ataya ait, korunmuş cinsiyete bağlantılı bir lokusun bulunmaması bu araştırmaların en önemli sonuçlarından birisi olarak belirtilmektedir (Schmid ve diğ., 1991).

Araştırmamızda, öncelikle, Türkiye'deki dağılımı son yıllarda yapılan çalışmalarla farklılaşan *R. ridibunda* İzmir populasyonları, özellikle birden fazla allelin etkili olduğu belirtilen enzim lokusları açısından değerlendirilmiştir. Bir ön çalışma niteliğindeki araştırma, üretme denemeleriyle ve daha çok sayıda enzim dahil edilerek yapılacak çalışmalar için temel teşkil edecektir. Ayrıca daha geniş alanda yapılacak çalışmalarla son yıllarda gerçekten tartışmalı olan isimlendirme trafiğine bir yönlendirme getirmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Toplam 12 su kurbağası (6 ♀♀, 6 ♂♂) 1997-1999 yıllarında üreme mevsimi olan Mayıs-Eylül ayları içinde toplanmıştır. Örnekler ölçülüp cinsiyetleri belirlenmiş ve numaralanmıştır. Her bir örneğin kas ve karaciğer dokularında laktat dehidrogenaz (LDH, E.C.1.1.1.27), malat

dehidrogenaz (MDH, E.C.1.1.1.37) ve superoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1) enzim fenotipleri belirlenmiştir. Yaklaşık 1 cm³ büyüklüğünde karaciğer, iskelet ve kalp kası örnekleri 2 ml soğuk ekstraksiyon sıvısı (EB) içine alınmıştır (EB, 100mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM potasyum HEPES, 50 mM Sükroz pH 7.7).

Doku parçaları EB içinde homojenize edilerek 14.000 RPM'de (+4°C) 25 dakika santrifüjlenmiştir. Tamamen temiz süpernatantlar ayrı bir tüpe alınıp -25°C'de saklanmıştır. Doku

parçalarının elde edildiği örnekler de Ege Üniversitesi Zooloji Anabilim Dalı'nda -25°C'de saklanmaktadır.

Enzim separasyonu poliakrilamid disk jel elektroforezi GELCELL aparatı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LDH ve SOD için sürekli bir buffer sistemi (Tris-glisin pH 8.3) MDH için sürekli olmayan bir sistem (jel buffer Tris-Glisin-Temed pH 8.3, yürütme buffer Tris-Sitrat pH 7.0) kullanılmıştır (Tablo 1). Elektroforez, enzime bağlı olarak +4°C'de 14 mA sabit akımda 2-6 saat sürdürülmüştür.

Tablo 1. İzmir bölgesi *R. ridibunda* örneklerinde analiz edilen enzimler, ilgili lokus ve allel sayıları. H: Kalp Kası, L: Karaciğer, M: İskelet Kası ekstraktı TG: Tris-Glisin Buffer, TC: Tris-Sitrat Buffer.

Enzim	E. C. No	Lokus	Allozim sayısı	Buffer	Doku
Laktat dehidrogenaz LDH	1.1.1.27	LD1, LD2, LD3	7, 3, 5	TG pH 8.3	H, L, M
Malat dehidrogenaz MDH	1.1.1.37	MD1, MD2	8, 6	TC pH 7.0	H, L, M
Superoksit dismutaz SOD	1.15.1.1	SOD2	3	TG pH 8.3	H, L, M

Enzimler, Manchenko (1994)'ya göre bazı ufak değişikliklerle boyanmıştır. Her enzim için etkili lokus sayısı anodan katoda doğru numaralanmış (1, 2, 3, ...) ve her bir lokustaki alleller (allozimler) anoda en yakın olandan başlayarak küçük harflerle (a, b, c, ...) sembolize edilmiştir.

Bulgular

İzmir civarından elde edilen su kurbağalarına ait karaciğer, kalp ve iskelet kası ekstraktlarında LDH, MDH ve SOD enzim lokusları analiz edilmiştir. Bulgularımız bu enzimlerin en azından 7 lokus tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. Analiz edilen enzimler özellikle izoenzimik ve allozimik görünümleri yönüyle değerlendirilmiştir. Her enzim için farklı elektroforetik mobilitelere sahip lokuslardaki fenotipler belirlenmiştir.

Laktat Dehidrogenaz

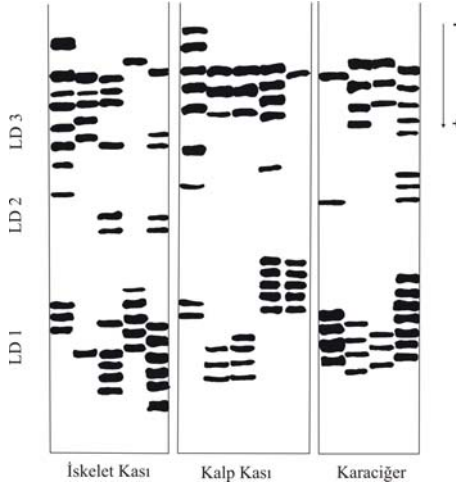
İncelenen grup içerisinde LDH fenotipleri oldukça büyük polimorfizm sergiler.

Ancak genelde herhangi bir doku spesifikliğı göstermeyen üç lokus (izoform ya da izoenzim olarak ayrılan) belirgin olarak ayırt edilir. Bunlar anodan katoda doğru LD1, L12, LD3 olarak isimlendirilmiştir. LD1 lokusunda 7, LD2'de 5 ve LD3'de 7 tane allel (allelomorf ya da allozim) gözlenmiştir. Karaciğer, kalp ve iskelet kası ekstraktlarında LDH enzimi için belirlenen fenotipler Şekil 1'de gösterilmiştir.

LD1 lokusu bariz olarak 7 allozim içermektedir. Bazı bireylerde bu 7 allozimin hepsi tek bir doku örneğinde dahi gözlenmiştir. Ancak dokular arasında bazı önemli farklar da kaydedilmiştir. Kalp kası ekstraktları genelde 5 bantlı bir yapı sergilerken karaciğer ve iskelet kası ekstraktları farklı bant kompozisyonları gösterebilmektedir (Şekil 1). 7 bantlı fenotip çok belirgin olarak karaciğer ekstraktlarında gözlenmiştir (Şekil 1).

LD2 lokusu tüm doku ekstraktlarında 3 allelomorf içermekte ve

incelenen bireyler genelde heterozigot bir fenotip sergilemektedir. a/c heterozigotları 3 bantlı, a/b ve b/c heterozigotları 2 bantlı yapı sergilemektedir. Bazı bireyler LD2 negatiftir.



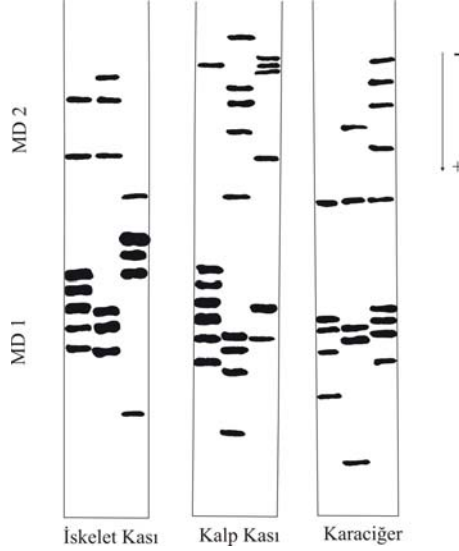
Şekil 1. Laktat dehidrogenaz(LDH) için iskelet kası, kalp kası ve karaciğer ekstraktlarında belirlenen fenotipler.

LD3 lokusunda 5 bant gözlenmiştir. Ancak iskelet ve kalp kası ekstraktlarında ek olarak iki yavaş bant bulunmaktadır. İncelenen örneklerde karaciğer ekstraktlarında bu iki bant mevcut değildir. Tüm doku ekstraktları, bu iki bant dışında, LD3 için genelde 3, 4 ya da 5 bantlı fenotip sergilemektedir. Ancak genellemeyi güçleştiren bir durum olarak bazı bireylerde tek bantlı fenotip de gözlenmiştir.

Malat Dehidrogenaz

Malat Dehidrogenaz için iki lokus (MD1 ve MD2) belirlenmiştir. Daha hızlı olan lokus MD1'de 8 allelomorf, MD2'den ise 6 allelomorf belirlenmiştir. Genel olarak dokuya özel bir fenotip sergiledikleri belirlenmemiştir. Ancak yine de bazı farklılıklar gözlenmektedir. Karaciğer, iskelet ve kalp kası ekstraktları MD1 ve MD2 lokuslarında gözlenen fenotipler

Şekil 2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2. İskelet kası, kalp kası ve karaciğer ekstraktlarında belirlenen Malat dehidrogenaz (MDH) fenotipler

Superoksid Dismutaz

Enzim için iki lokus belirlenmiştir. Bu iki izoenzim aynı jel üzerinde belirlenemeyecek şekilde farklı pH'larda izlenebilmektedir. Bu yüzden sadece SOD 2 lokusu değerlendirilmeye alınmıştır. İncelenen tüm örneklerde bu enzim herhangi bir doku spesifikliği göstermeksizin iki bantlı bir fenotip sergilemiştir. SOD 2 lokusunda gözlenen fenotip Şekil 3'de gösterilmektedir.



Şekil 3. Superoksid Dismutaz-2 lokusunda gözlenen fenotip.

Tartışma

Bu çalışmayla Türkiye su kurbağaları dokuya özel enzim fenotipleri bakımından

ilk kez değerlendirilmiş ve küçük bir örnekleme grubuyla da olsa önemli bulgular elde edilmiştir. İncelediğimiz örnekler LDH ve MDH için bugüne kadar Batı Palearktık bölgede yapılan çalışmalardan fark göstermektedir ve heterozigotluk çok yüksek bir değerdedir. Bu çerçevede Türkiye su kurbağalarının farklı oldukları söylenebilir. Ancak çalışmamız daha çok ele alınan enzimler için optimum elektroforetik şartların belirlenmesi ve bu koşullar altında farklı doku ekstraktlarındaki izoenzim ve alloenzim fenotiplerinin belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Son yıllarda Batı Palearktık bölge su kurbağaları üzerine yapılan taksonomik amaçlı bir çok araştırmada enzim elektroforezi etkin olarak kullanılmış ve yeni türler tanımlanmıştır. Ancak su kurbağaları grubu enzim yapılarının ayrıntılı olarak çalışıldığı bir grup değildir. Sadece *Xenopus laevis*'de birkaç enzim saflaştırılarak alt birim ve allozim sayısı belirlenebilmiştir. Bu açıdan enzim elektroforetik verilerin taksonomik ve filogenetik amaçlı kullanımlarında, kullanılacak yöntem ve izlenecek prosedür tartışmaya açık olmak üzere, enzim yapısının belirlenmesi ve elektroforetik koşulların optimumunda ve standart olması çok önemlidir.

Bir çok canlı grubunda izoenzim dağılışı türden türe, bir popülasyonun bireyleri arasında ve hatta tek bir organizmanın farklı dokuları arasında ya da bir hücrenin farklı kısımları arasında dahi fark gösterebilmektedir (Wilkinson, 1975). Bu açıdan farklı dokulara özel izoenzim ve alloenzim fenotiplerinin ayrı ayrı belirlenmesi önemli olacaktır. Ayrıca elektroforetik ve enzim aktivitesini etkileyebilecek pH, ısı, ışık gibi diğer bütün koşullar da fenotiplerin farklı görünmesinde etkili olabilmektedir. Enzim elektromorflarının gözlenmesinde etkili diğer önemli nokta elektroforez işleminin gerçekleştirildiği süzücü

ortamdır. Bir çok çalışmada yaygın olarak kullanılan ortam, nişasta ya da poliakrilamiddir. Nişasta jel elektroforezi daha kaba bir ayırım sağlarken, poliakrilamid jel elektroforeziyle moleküler ağırlıkları birbirinden çok az farklı olan alt birimler dahi ayrılır ve rezolüsyon birdenbire yükselir. Her iki yöntemin pratikte bazı dezavantajları bulunmaktadır. Ancak poliakrilamid jel elektroforezinde bu dezavantajlar dikkatli bir çalışmayla kolaylıkla azalabilirken, nişasta jel elektroforezinde birbirine yakın yüksek moleküler ağırlığa sahip alt birimlerin ayrılması sağlanmayabilir. Bu açıdan nişasta ve poliakrilamid jel elektroforez sonuçları birbiriyle karşılaştırılabilir değildir. Taksonomik amaçlı çalışmalarda bu tip bir karşılaştırma problem yaratabilir.

Çalışmalarda standart olmayan ve en büyük güçlüklerden birini yaratan bir diğer durum elektromorfların isimlendirilmesi ve fenotiplerin belirlenmesindedir. Elektromorflar bazı araştırmalarda anoddan katoda (Nevo ve Filippucci, 1988; Nishioka ve Sumida, 1992; Sofianidou ve diğ., 1994), bazı araştırmalarda katottan anoda (Sinsch ve Eblenkamp, 1994) isimlendirilmiştir. Ayrıca fenotiplere ait zimogramların bulunmaması karşılaştırmalarda sorun yaratmaktadır.

Çalışmalarda kullanılan örnek sayıları da, bazı durumlarda, allel frekanslarının hesaplanmasında yetersizdir. Az sayıda örnekle hesaplanan allel frekanslarına dayanarak, popülasyon içi genetik varyasyonun ortaya konması, popülasyonlar arası karşılaştırmaların yapılabilmesi, genetik uzaklıkların hesaplanması ve nihayetinde yeni bir taksonun tanımlanabilmesi son derece imkansız görülmektedir. Ayrıca lokal bir popülasyonda saptanan genetik varyasyonun taksonomik ya da filogenetik önemi ve belli bir türü ne ölçüde temsil edebildiği de tartışmalıdır. Varyasyon

belirlenen karakterlerin diagnostik önemi, bu varyasyonun populasyon üzerindeki baskısının ne yönde olduğu, baskının komşu populasyonlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, varyasyonun ortaya çıkmasında çevre faktörlerinin etkilerinin değerlendirilmesi ve tüm bu parametrelerin filogenetik önemi göz önünde bulundurulmalıdır. Bu açıdan olabildiğince geniş bir örnekleme grubunun çok sayıda karakter açısından değerlendirilmesi taksonomik araştırmalarda daha uygun olacaktır.

İzmir *R. ridibunda* örneklerinin elektroforetik enzim fenotipleri üzerine gözlemlerimiz özellikle karaciğer, kalp ve iskelet kası ekstraktlarındaki farklı durumları ortaya çıkarmıştır. En önemli farklılık LDH ve MDH lokuslarında göze çarpmaktadır.

LDH için belirgin olarak üç lokus belirlenmiştir. LD1 ve LD3 tüm doku ekstraktlarında pozitif reaksiyon vermiştir. Dokular arasında allel kompozisyonu bakımından bazı farklar bulunsa da her iki lokus için sırasıyla 7 ve 5 elektromorf belirlenmiştir. Bu durum LD1 için karaciğer LD3 için kalp kası ve karaciğer (Şekil 1) ekstraktlarında saptanmıştır. Bugüne kadar Batı Paleartik bölge su kurbağaları için verilen bilgilere göre LDH3 olarak ayrı bir lokus belirtilmemiştir. Ayrıca LDH1 lokusunun en fazla 5 bantlı bir yapı sergilediği belirlenmiştir (Uzzell ve Berger, 1975; Uzzell ve diğ., 1977; Nevo ve Filippucci, 1988; Nishioka ve Sumida, 1992; Sinsch ve Eblenkamp, 1994; Sofianidou ve diğ., 1994). Bu bakımdan İzmir *R. ridibunda* örnekleri ilginç bir durum sergiler. Sumida ve Nishioka (1992) Adana örneklerinin (n:3) LD1 lokusunda tek allel bakımından sabit olduğunu belirtmişlerdir. Türkiye'den (Düzce ve Kayseri, n:10) *R. ridibunda* örneklerinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada (Uzzell ve diğ. 1977) bantlar sadece hızlı ve yavaş elektromorflar

olarak değerlendirilmiştir. Büyük ölçüde farklı yöntemler kullanılmasından ve farklı bölgeler çalışılmasından kaynaklanan bu durumun, taksonomik önemi şu an için belirsizdir. Ancak yine de LD1 lokusunda belirlediğimiz bu ekstra 2 yavaş bant bir hibridizasyonla ilgili olabilir. Diğer bir olasılık, farklılığın enzim altbirim sayısı ile ilişkili olmasıdır. Bugüne kadar yapılan araştırmalar LDH izoenzimlerinin genelde tetramerik yapıda olduğunu yani en fazla 5 bantlı bir yapı sergilediğini belirlemiştir (Wilkinson 1975). Bu durum birkaç Amfibi türünde de gösterilmiştir (*Triturus* genusu, LDH1 ve LDH2: Rafinski ve Arntzen 1987; *R. ridibunda* LDH1: Sofianidou ve diğ. 1994; Uzzell ve Berger 1975; LDH B: Graf ve PollsPelaz 1989). Bazı canlı gruplarında ise dimerik ve oligomerik yapıdan söz edilmektedir. Ancak bu bilgilerin çoğu sadece elektroforetik analiz sonuçlarına aittir. LDH izoenzimlerinin saflaştırıldığı ve alt birim sayısının belirlendiği grup sayısı nispeten azdır. İzmir bölgesi su kurbağası örneklerinde LD1 lokusunda saptanan 2 yavaş elektromorfun gerçek anlamı ancak saflaştırma sonrasındaki analizlerle ortaya konabilecektir.

LD2 lokusunda 3 elektromorf gözlenmiştir. Bu lokus için en önemli gözlem bazı bireylerin LD2 negatif olması ve kalp kası ekstraktları hariç nispeten zayıf reaksiyon göstermesidir. Bu durum LD2'nin incelenen dokularda daha az yoğunlukta olması ya da çalışılardan farklı pH ve ısı değerinde aktivite göstermesiyle açıklanabilir. LDH izoenzimlerinin farklı türlerde dokuya özel dağılım gösterdikleri ve aktivitelerinin inkübasyon sıcaklığına ve pH'a bağlı olarak değişebileceği gösterilmiştir (Fritz, 1967; Wilkinson, 1975).

Dokuya özel bir fenotip gözlenmemiş olmasına karşın MDH çok daha ilginç bir durum sergilemektedir.

MDH'in anodal (soluble MDH) ve katodal (mitokondrial MDH) olmak üzere iki formu bulunmaktadır (McReynolds ve Kito, 1970). Bizim bulgularımız anodal MDH ile ilişkilidir. MDH1 ve MDH2 lokuslarının Türkiye'den *R. ridibunda* örneklerinde (Adana; n:3) tek allel bakımında monomorfik olduğu belirtilmektedir (Nishioka ve Sumida 1992). MDH1 lokusunun monomorfik olduğu, *R. balcanica*, *R. levantina*, *R. esculenta* ve Yunanistan *R. ridibunda* örneklerinde de gösterilmiştir (Nevo ve Filippucci, 1988; Sinsch ve Eblenkamp, 1994; Sofianidou ve diğ., 1994). Ancak bizim örneklerimiz belirgin olarak polimorfiktir (Şekil 2) Ayrıca MDH izoenzimlerinin dimerik ya da tetramerik yapıda olduğu bilinmektedir (Wilkinson, 1975) Bizim bulgularımıza göre MD1 lokusunda toplam 8, MD2 lokusunda toplam 6 elektromorf bulunmaktadır. Bu durum hibridizasyon fikrini bir ölçüde desteklese de, kesin bir yargıya varabilmek için yine saflaştırma sonrası analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum monomorfik SOD2 lokusu için de geçerlidir.

Anadolu su kurbağaları, genellikle *R. ridibunda* türüne dahil edilmektedir (Başoğlu ve Özeti, 1973). Ancak İsrail'de *R. levantina* (Schneider ve diğ., 1992) ve Yunanistan'da *R. balcanica* (Schneider ve Sinsch, 1992) türlerinin tanımlanmasıyla Türkiye su kurbağaları, önce iki tür: *R. ridibunda* ve *R. levantina* (Schneider ve diğ., 1992; Baran ve Atatür, 1997), daha sonra *R. bedriagae* olmak üzere tek tür (Beerli ve diğ. 1994) ve en son olarak *R. ridibunda* ve *R. bedriagae* olmak üzere iki tür (Schneider ve Sinsch, 1999; Sinsch ve Schneider, 1999) altında toplanmıştır. Türkiye su kurbağalarının dağılım ve isimlendirilmeleri hakkındaki bu tartışmalı sonuçlar, sadece çok sınırlı bölgelerde ve çiftleşme çağrı yapılarına dayanarak ortaya koyulmuştur. Ancak çiftleşme çağrılarının koro halinde

duyulduğu *Rana* türlerinde, kaydedilen çiftleşme çağrılarının farklı erkek bireylerden kaynaklandığına dair bir kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca, sadece erkek bireylerin değerlendirilebiliyor olması, su kurbağaları gibi karmaşık hibridizasyonlar sergileyen bir grup için, sadece biyoakustik kayıtlara dayanarak yeni taksonların tanımlanmasını güçleştirmektedir. Bu açıdan biyoakustik veriler, diğer genetik veri gruplarıyla birlikte değerlendirilmelidir. *R. balcanica* ve *R. levantina* hakkında biyoakustik veriler yanında enzim elektroforetik veriler de bulunmasına rağmen (Sinsch ve Eblenkamp, 1994; Sofianidou ve diğ., 1994) Anadolu su kurbağaları hakkındaki veriler çok kısıtlıdır ve çalışmalarda incelenen örnek ve lokus sayısı tam bir değerlendirmeyi güçleştirecek şekilde yetersizdir (Uzzell ve Berger, 1977; Nishioka ve Sumida, 1992).

Hangi takson ya da taksonlara dahil edilirse edilsin Anadolu (hatta bütün Palearktik bölge) su kurbağaları hakkında bugüne kadar elde edilen bölgesel biyolojik veriler, ancak tamamlanmamış bir yapı boz görünümündedir. Birkaç populasyon farklı yöntemlerle ve daha yoğun çalışılmış olsa da henüz tüm Anadolu'yu içine alan ve farklı yaklaşımları aynı anda ele alan büyük bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca lokal populasyonlarda yapılan çalışmalarda dahi populasyonunun genetik yapısı ve populasyon üzerindeki baskılar tartışılmamıştır. Bu noktada Batı Palearktik su kurbağalarının tartışmalı taksonomik durumları kesin olarak açıklığa kavuşmadığı sürece, çalıştığımız örnek grubunun ve hatta tüm Anadolu populasyonlarının bugün için, *Rana ridibunda* kompleksi olarak ele alınması daha gerçekçi görülmektedir.

İzmir su kurbağalarında 7 enzim lokusunun karaciğer, kalp ve iskelet kası ekstraktlarındaki fenotipleri bu çalışmayla ilk kez tanımlanmıştır. Özellikle MDH ve

LDH lokuslarına ait bulgularımız, şimdye kadar, yakın su kurbağası popülasyonlarına ait çalışmalarla karşılaştırıldığında önemli farklılıklar göstermiştir. İleride yapılacak üretim denemeleri, kromozom, DNA ve enzim yapı analizleri bu çalışmada ve daha önceki çalışmalarda gösterilen farklılıkların daha açık şekilde aydınlatılmasını sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu projeye maddi destek sağlayan E.Ü. Araştırma Fon Saymanlığı'na ve çalışmalarımız sırasında gerek yöntem ve gerekse literatür bilgileri için sıklıkla yardımlarını gördüğümüz Prof. Dr. Mehmet K. ATATÜR ve Prof. Dr. Hüseyin ARIKAN'a içtenlikle teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Alpagut, N. and B. Falakalı 1995. Karyotype analysis of two *Rana ridibunda* (Ranidae; Anura) populations in Turkey. *Isr. J. Zool.* Vol.41:523-531
- Ankan, H. 1983. Ege bölgesinde yaşayan *Rana ridibunda* (Anura; Ranidae) popülasyonlarının serolojik yönden incelenmesi. *Doğa Bilim Dergisi (Temel Bilim)*, 7:37-45
- Ankan, H. 1988. On a new form of *Rana ridibunda* (Anura Ranidae) from Turkey. *İstanbul Üniv. Fen Fak. Biyoloji Der.*, 53:81-87
- Ankan, H. 1990. *Rana ridibunda* (Anura; Ranidae) popülasyonları üzerine morfolojik ve serolojik araştırmalar. *Doğa Tr. J. Of Biology*, 14(1): 40-83.
- Ankan, H., N.Özeti, İ.E. Çevik ve M. Tosunoğlu 1994. *Rana ridibunda caralitana* (Anura: Ranidae)'nin Göller Bölgesinde Dağılışı. *Doğa Tr. J. Of Zoology*, 18:141-145.
- Atatür, M.K., H Ankan, and A. Mermer 1990. A taxonomical investigation on *Rana ridibunda* Pallas (Anura; Ranidae) populations from Lake District. *İst. Üniv. Fen Fak. Biyol Der.*, 54:79-83.
- Avise, J.C. and C.F. Aquadro 1982. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates. *Evol. Biol.* 15: 151-185.
- Baran, İ. ve M.K. Atatür 1997. "Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler)." Çevre Bakanlığı, Ankara.
- Başoğlu, M. ve N. Özeti 1973. "Türkiye Amfibileri" Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar serisi, No:50.
- Berli, P., H. Hotz, H.G. Tunner, S. Heppich, and T. Uzzell 1994. Two new water frog species from the Aegean Islands Crete and Karpathos (Amphibia, Salientia, Ranidae). *Notulae Naturae, Philadelphia*, No. 470:1-9.
- Berger L. 1973. Systematics and hybridization in European green frogs. *J. Herpet.*, 7:1-10.
- Budak, A., C.V. Tok and D. Ayaz 2000. On specimens of *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura: Ranidae) collected from Işıklı Lake (Çivril-Denizli). *Tr. J. Zool.* 24: 135-137.
- Buth, D.G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *A. Rev. Ecol. Syst.* 15 : 501-522.
- Dubois, A. 1977. Les problèmes de l'espèce chez les Amphibiens Anoures. In: *Les Problèmes de l'Espèce dans le Règne Animal*. Vol. II. C. Ed. Bocquet, J. Genermont and M. Lamotte. *Mémoires Soc. Zool. de France* 39:161-284
- Dubois, A. and A. Ohler 1994. Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, genus *Rana*): A catalogue of available and valid scientific names, with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities. *Zool. Poloniae*, 39/3-4:139-204
- Felsenstein, J.1985. Confidence limits in phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Ferrier, V., F. Gasser, A. Jaylet, and C. Cayrol 1983. A genetic studies of various enzyme polymorphisms in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). II-peptidases: Demonstration of sex-linkage. *Biochem. Genet.* 21:535-549
- Fritz, P.J. 1967. Rabbit lactate dehydrogenase isozymes: effect of pH on activity. *Science* 156:82.
- Graf, J.D. and M.P. Pelaz 1989. Evolutionary Genetics of the *Rana esculenta* complex. In R.M. Dawley and J.N. Bogart

- (eds) "Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates". Bulletin 466 New York State Museum, Albany N.Y. 289-302
- Hotz, H. 1974. Ein problem aus vielen fragen-europäische Grünfrösche (*Rana esculenta*-Komplex) und ihre verbreitung. Natur und Museum 104:262-272
- Hotz, H. 1983. Genic diversity among water frog genomes inherited with and without recombination. Dissertation, Univ. Zürich
- Hotz, H. and S. Bruno 1980. Il problema delle rane verdi e l'Italia (Amphibia, Salientia). Rend. Accad. Naz. Scii detta dei XL, Mem. Sci. Fis. Nat., 98(4) (6):49-112
- Joermann, G., I. Baran and H. Schneider 1988. The mating call of *Rana ridibunda* (Amphibia:Anura) in western Turkey: Bioacoustic analysis and taxonomic consequences. Zool. Anz. 220: 225-232
- Kumlutaş, Y., M. Tosunoğlu, ve B. Göçmen 1999. Karadeniz Bölgesi *Rana ridibunda* (Anura:Ranidae) populasyonları üzerine morfolojik bir araştırma. Tr. J. Zool. 23(3):801-806
- Manchenko, G.P. 1994. "Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels". CRC Press, Boca Raton.
- McReynolds, M.S. and G.B. Kitto 1970. Purification and properties of *Drosophila* malate dehydrogenases. Biochim. Biophys. Acta, 198, 165-175.
- Mertens, R., 1952. Amphibien und Reptilien aus der Turkei. Rev. Fac. Sci. Univ. S. B. XVII. Fasc.I
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. Am. Natur. 106:283-292
- Nei, M., 1976. Mathematical models of speciation and genetic distance. Pages 723-768 In. S. Karlin and E. Nevo (eds) "Population genetics and ecology." Ed., Academic Press, New York.
- Nevo, E. and M.G. Filippucci 1988 Genetic differentiation between Israeli and Greek populations of the marsh frog, *Rana ridibunda*. Zool. Anz., 221, 5/6: 418-424.
- Nevo, E. and S. Y. Yang 1982. Genetic diversity and ecological relationships of marsh frog populations in Israel. Theor. Appl. Genet., 63 : 317-330.
- Nishioka, M. and M. Sumida 1992. Biochemical differentiation of pond frogs distributed in the Palearctic Region. Sci. Rep. Lab. Amph. Biol. Hiroshima Univ., 9: 53-96.
- Nishioka, M., H. Ohtani, and M. Sumida 1980. Detection of chromosomes bearing the loci for seven kinds of proteins in Japanese pond frogs. Sci. Rep. Lab. Amph Biol. Hiroshima Univ., 4: 127-184
- Rafinsky, J. and J.W. Arntzen 1987. Biochemical systematics of the Old World Newst, Genus *Triturus*: Allozyme data. Herpetologica, 43 (4) : 446-457.
- Schmid, M., I.C. Nanda, J.T. Epplen., K.K. Steinlein and T. Haaf 1991. Sex-determining mechanism and sex chromosomes in Amphibia. In D.M Green. and S.K. Sessions (eds) Amphibian Cytogenetics and Evolution Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Schneider, H., and U. Sinsch 1999. Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: Bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. J. Zool. Syst. Evol. Res. 37:57-65
- Schneider, H. 1997. Calls and reproductive behaviour of the water frogs of Damascus, Syria (Amphibia:Anura:*Rana bedriagae* Camerano, 1882). Zool in the Middle East, 15:51-66
- Schneider, H. 1999. Calls of the Levantine Frog, *Rana bedriagae*, at Birket Ata, Israel (Amphibia:Anura). Zoology in the Middle East, 19:101-116
- Schneider, H., U. Sinsch and E. Nevo 1992. The lake frogs in Israel represent a new species. Zool. Anz., 228, ½: 97-106
- Schneider, H., U. Sinsch and T.S. Sofianidou 1993. The water frogs of Greece. Bioacoustic evidence for a new species. Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch. 31:47-63.
- Schultz, R.J. 1969. Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. Amer. Nat. 103 : 605-619
- Schultz, R.J. 1977. Evolution and ecology of unisexual fishes. Evol. Biol. 10:277-331
- Sinsch, U. and H. Schneider 1999. Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: Morphological variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina*. J. Zool. Syst. Evol. Res. 37:67-73

- Sinsch, U. and Eblenkamp, B. 1994 Allozyme variation among *Rana balcanica*, *R. levantina*, *R. ridibunda* (Amphibia: Anura): Genetic differentiation corroborates the bioacoustically detected species status. *Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch.* 32:35-43
- Sofianidou, T.S., H. Schneider and U. Sinsch 1994 Comparative electrophoretic investigation on *Rana balcanica* and *Rana ridibunda* from Northern Greece. *Alytes*, 12(3):93-108
- Subtelny, S. 1974. Nucleocytoplasmic interactions in development of amphibian hybrids. *Int. Rev. Cytol.*, 39 : 35-88.
- Sumida, M. and M. Nishioka, 1994a. A pronounced sex difference when two linked loci of the Japanese brown frog *Rana japonica* are recombined. *Biochem Genet.*, 32 (9-10):361-369.
- Sumida, M. and M. Nishioka, 1994b. Genetic differentiation of the Japanese Brown Frog, *Rana japonica*, elucidated by electrophoretic analyses of enzymes and blood proteins. *Sci. Rep. Lab. Amph Biol. Hiroshima Univ.*, 13:174-195.
- Sumida, M. and M. Nishioka, 1996 Genetic variation and population divergence in the Mountain Brown Frog *Rana ornativentris*. *Zoological Sciences* ,13:537-549
- Swafford, D.L. and R.B. Selander, 1981. BIOSIS-1: A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72:281-283.
- Tok, C.V., M.K. Atatür and D. Ayaz 2000. Morphological characterisation of a population of *Rana ridibunda* Pallas, 1771 in the Dalaman area, Turkey. *Zool in the Middle East*. 20: 47-54.
- Uzzell T. and L. Berger 1975. Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *R. lessonae*, and their hybridogenetic associate, *R. esculenta*. *Proceed. Acad. Natl. Sci. Philad.* Vol.127, No.2, 13-24
- Uzzell, T., R. Günther and L. Berger 1977. *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*: A leaky hybridogenetic system (Amphibia Salientia). *Proceed. Acad. Natl. Sci. Philad.* Vol.128, No.9, 147-171
- Wilkinson, J.H. 1975. "Isoenzymes" (Second Edition). Chapman and Hall, London.
- Wright, D.A. and F.H., Moyer 1966. Parental influences on lactate dehydrogenase in early development of hybrid frogs in the genus *Rana*. *J. Exp. Zool.*, 163 : 215-230.
- Wright, D.A. and F.H. Moyer 1968. Inheritance of frog lactate dehydrogenase patterns and the persistence of material isoenzymes during development. *J. Exp. Zool.* 167: 197-206.
- Wright, D.A. and S. Subtelny 1971. Nuclear and cytoplasmic contributions to dehydrogenase phenotyp in hybrid frog embryos. *Develop. Biol.*, 24 : 119-140.
- Wright, D.A. and S. Subtelny 1973. Effects of haploidy and hybridization on the activities of four dehydrogenases in frog embryos. *Develop. Biol.*, 32: 297-308.
- Wright, D.A. 1975. Expression of enzyme phenotypes in hybrid embryos, In: C. Markert (eds) "Isoenzymes Genetics and Evolution." 4. Edition, Academic Press, New York, 649-664.
- Wright, D.A. 1976. Synthesis of stage-specific proteins in early frog embryos. *Am. Zool.* 16: 231.
- Wright, D.A. 1978. Synthesis of stage-specific proteins in early embryogenesis In: "Cell. Differentiation and Neoplasia" Ed. G. F. Saunders, Raven Press, New York, 391-402.
- Wright, D.A., C.P. Huang, and B.C. Chuoke 1976. Meiotic origin of triploidy in frog detected by genetic analysis of enzyme polymorphisms. *Genetics*, 84: 319-382.
- Wright, D.A. and D.M. Richards 1983. Two sex-linked loci in the leopard frog *Rana pipiens*. *Genetics*, 103:249-261.
- Wright D.A., C.M., Richards, J.S. Frost, A.M. Camozzi and B. J. Kunz 1983. Genetic mapping in amphibians. In: "Isoenzymes: Current Topics in Biological and Medical Research," Vol. 10, 278-311. Alan R. Liss, New York.