

## **BAZI TÜRK TÜTÜN ÇEŞİTLERİNİN İSOENZİM BANTLARINA GÖRE TANIMLANMASI**

**Ali PEKSÜSLÜ**

**Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü  
P.K.9, 35661 Menemen-TURKEY**

**Seval SEKİN**

**Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi  
Tarla Bitkileri Bölümü  
35100 Bornova, İzmir-TURKEY**

**ÖZ:** Bu çalışmada, bazı Türk Tütün çeşitlerinde poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak Esterase ve Peroksidase isoenzimlerinin bant desenleri araştırılmıştır. *N. tabacum* L. türüne ait tütün çeşitleri esterase isoenzimine göre farklı bant desenleri oluşturmuştur. Peroksidase isoenzimine göre ise çeşitler arasında benzer bant desenleri görülmüştür. Birden fazla isoenzim ile çalışıldığında, isoenzimlere göre tütün çeşitlerinin tanımlanabileceği saptanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Türk tütünü, *N. tabacum* L., isoenzim, poliakrilamid jel elektroforezi.

## **IDENTIFICATION OF SOME TURKISH TOBACCO VARIETIES BY ISOZYME BANDING PATTERNS**

**ABSTRACT:** In this study, band designs of Esterase and Peroxidase isoenzymes were investigated in some selected Turkish tobacco varieties by using polyacrilamid gel electrophoresis. Varieties belonging to *N. tabacum* L. generated different band designs by esterase isoenzyme. Whereas, according to peroxidase isoenzyme, similar band designs were observed. When more than one isoenzyme were studied, tobacco varieties could be identified.

**Keywords:** Turkish tobacco, *N. tabacum* L., isoenzymes, polyacrylamide gel electrophoresis.

### **GİRİŞ**

Günümüzde bilim ve teknolojinin hızla ilerlemesi sonucu, çeşit tanımlanmasında morfolojik ve fizyolojik özelliklerin yanı sıra yeni teknikler geliştirilmiştir. Türk tütün çeşitlerinin protein, isoenzim ve DNA gibi biyokimyasal özelliklerine göre de sınıflandırılması mümkündür. Çok az bir bölümü *N. rustica*, büyük bir bölümü ise *N. tabacum* türü içerisinde yer alan tütünlerimizin çeşit özelliklerinin yer aldığı biyokimyasal bir sınıflandırma mevcut değildir.

İsoenzimler, poliakrilamid ve nişasta gibi taşıyıcı ortamlara yerleştirilerek, elektrik alan içerisinde, taşıdıkları elektriksel yük, karşılaştıkları direnç, molekül biçimi ve ağırlıklarına bağlı olarak ilk yerleştirildikleri noktadan belirli uzaklıklara taşınırlar ve spesifik enzim boyaları ile boyanarak gözle görülebilir bantlar oluştururlar (Simpson and Withers, 1986). Jel elektroforezi; çeşitlerin test edilmesi, ıslahı, üretimi vb. alanlarda çeşitler arasındaki farklılıkları göstermede hızlı ve güvenilir olması nedeniyle yaygın biçimde kullanılmaktadır (Cooke, 1986).

Elektroforez, bazı bahçe bitkileri ile yonca, buğday, arpa ve tütün gibi tarla bitkilerinde çeşit tanımlanmasında kullanılmaktadır (Quiros, 1980; Anderson, 1982; Gebre ve ark. 1986; Sekin ve ark. 1991; Bilgen ve ark. 1995).

Tütün ile ilgili çalışmaların çoğu tür içindeki çeşit kıyaslamasından çok türlerin tanımlanması üzerinde yoğunlaşmıştır (Bredemejier, 1982; Chien ve ark. 1982). Tütünde ilk yapılan çalışmalarda elektroforetik yöntemlerle türler arasında farklılıkların tespit edilebileceği, aynı tür içindeki çeşitlerin tanımlanamayacağı görülmüştür (Sheen, 1970; Trinh ve ark. 1981). Daha sonra yeni teknik ve yöntemlerin geliştirilmesi sonucu aynı tür içindeki çeşitlerin elektroforetik yöntemlerle tanımlanabileceği saptanmıştır (Abet ve ark. 1983; Wilkinson ve ark. 1985; Peksüslü ve Sekin, 1998).

Abet ve ark. (1982), tütünde enzim polimorfizmi üzerinde çalışmışlar, Esterase ve Peroksidase isoenzimlerinin polimorfizm gösterdiklerini ve çeşit tanımlanmasında kullanılabileceğini saptamışlardır. Araştırmacıların bu konuda yürüttükleri bazı çalışmalar şöyle özetlenebilir:

On iki *N. tabacum* çeşidi polylacrylamid gel electrophoresis (PAGE)' de Esterase ve Peroksidase isoenzim bantları bakımından karşılaştırılmış, her bir çeşit 5-11 arasında değişen Esterase, 6-13 arasında değişen Peroksidase isoenzim bandı vermiş ve 11 değişik bant deseni bulunmuştur. Sonuçlar, genotip tanımlanmasında enzim polimorfizminin potansiyelini doğrulamıştır (Abet ve ark. 1982).

On sekiz Burley tütün çeşidinin, PAGE' de Peroksidase ve Malate Dehidrogenase isoenzimlerine göre karşılaştırmasında; Peroksidase bantları 12 pozisyon üzerinden 3-11, MDH bantları 19 pozisyon üzerinden 9-18 arasında dizilim göstermiştir (Abet ve ark. 1983). Xanti, Perustitsa ve Estigovina oriental tütün çeşitleriyle yürüttükleri bir başka çalışmada ise, PAGE'de Peroksidase, MDH ve Esterase isoenzimlerine göre karşılaştırma yapılmış ve çeşitler arasında farklılıklar saptanmıştır. (Abet ve ark. 1984).

Maryland, burley, air-cured, cigar ve flue-cured tütünlerini temsilen alınan 10 tütün çeşidinde, üç yaprak olgunluğu aşamasında PAGE kullanılarak Esterase, Catalase, MDH ve Peroksidase isoenzim boyamaları yapılmıştır. Her enzim için bulunan bant sayısı sırasıyla 3, 7, 9 ve 11 olmuştur. En erken olgunluk dönemindeki yaprak materyali en fazla sayıda bant vermiştir. Esterase isoenzimine göre çeşitler arasında fark yoktur. Bununla birlikte araştırılan diğer üç isoenzime göre ise çeşitleri tanımlamak mümkün olmuştur (Wilkinson ve ark. 1985).

Bu çalışmada, PAGE tekniği kullanılarak bazı Türk tütün çeşitlerinin Esterase ve Peroksidase isoenzimlerine göre tanımlanması amaçlanmıştır. Çeşitlere ait Esterase ve Peroksidase isoenzim bant desenleri çıkarılmış olup, elde edilen bu bant desenlerinin, tohumluk tescili ve ıslah çalışmalarında kullanılması mümkündür.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Araştırmada, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Bitki Gen Kaynakları Bölümünden sağlanan 15 Türk tütün çeşidi kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan Türk tütün çeşitleri.  
Table 1. Turkish tobacco varieties used in this research.

Çeşidin adı Name of the variety	Yetiştirildiği bölge Growing region
Karabağlar 6265	Ege
Ege 64	Ege
Akhisar 97	Ege
Basma 192/23	Karadeniz
Bafra 6391	Karadeniz
Samsun Maden 2421	Karadeniz
Samsun Canik 190/5	Karadeniz
Trabzon 18362	Karadeniz
Taşova 10670	Karadeniz
Agonya	Marmara
Bursa 18000	Marmara
Düzce-Özbaş 190/5	Marmara
Silvan – Garzan	Doğu ve Güneydoğu Anadolu
Yayladağ 18205	Doğu ve Güneydoğu Anadolu
Bitlis İç Geçit Tohumu	Doğu ve Güneydoğu Anadolu

## **Metot**

### **Yaprak örneklerinin alınması**

Tarlada çiçeklenme dönemine gelen bitkilerin orta el yeşil yaprakları kullanılmıştır.

### **Ekstraksiyon**

Her yaprak örneğinin ana damarı atılarak, aya kısmı parçalara ayrılmış ve tartılmıştır. 10 gram tütün yaprağı, 20 ml. homojenize tampon ile ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon tamponu: 0,05 M Tris-HCl (pH 8) tamponu içine %1 polivinylprolidone, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,25 M NaCl, 0,05 M NaHSO<sub>3</sub>, 0,025 M Mercaptaethanol'dür (Moore ve ark. 1982).

Ekstraksiyon, tülbent ile süzülerek 10 dakika 4000 rp'de santrifüje edilmiştir. Üst kısım (süpernatant)'dan 80 mikrolitre alınarak 20 mikrolitre bromfenol blue (tracing dye) içeren loading çözeltisi ile karıştırılmış ve %7,5 poliakrilamid soğutmalı dikey jel elektroforezine tabi tutulmuştur (Davis, 1970). Bütün işlemler +4 C° de gerçekleştirilmiştir.

### **Jellerin boyanması ve yıkanması**

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller boyama kabına alınmıştır.

### **Enzim boyaması**

1. Esterase isoenzimiyle: Jel, boyama çözeltisine konularak yaklaşık 30-40 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra bantlar görülmeye başlar. Enzim boyama çözeltisi Abet ve ark. (1982)'e göre hazırlanmıştır.

2. Peroksidase isoenzimiyle: Boyama çözeltisine konulan jelde, karanlık odada 5-6 dakika bekletildikten sonra bantlar görülmeye başlar. Enzim boyama çözeltisi De Jong (1991)'a göre hazırlanmıştır.

### **Jellerin değerlendirilmesi**

Jeller bir cam plaka üzerine yerleştirildikten sonra plakanın altından verilen bir ışık yardımı ile incelenerek, örneklere ait bant desenleri ve bantların rölatif mobiliteleri hesaplanmıştır.

### **Bantların yorumlanmasında ele alınan kriterler;**

- a. Örneklerle ait bant sayıları,
- b. Bantların rölatif mobiliteleri (Rf değerleri),

Rf=Bandın orijinden uzaklığı/İndikatör boyanın orijinden uzaklığı.

### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

Bu araştırmada *N. tabacum* türü içerisinde yer alan 16 Türk tütün çeşidi, soğutmalı dikey poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak Esterase ve Peroksidase isoenzimlerine ait zymogramları elde edilmiştir (Şekil 1, 2 ve 3).

Çeşitlerin karşılaştırılmasında kullanılan Esterase ve Peroksidase isoenzimlerinin bant paternleri polimorfizm göstermiştir.

Esterase isoenzimi bakımından çeşitler arasında farklı bant desenleri gözlenmiştir (Şekil 1 ve 2). Bant sayıları genel olarak değerlendirildiğinde; materyali oluşturan çeşitler 11-21 arasında değişen sayıda bant vermiş olup, bazı çeşitler kendilerine özgü bant desenleri oluşturmuşlardır. En az sayıda bant veren çeşitler Bitlis İç Geçit Tohumu (11) ve Bafra 6391 (13) olmuştur. En fazla sayıda bant Karabağlar 6265 (21) ve Taşova 10670 (20) çeşidi vermiştir. Esterase isoenzimine göre Rf değerleri 0,02 – 0,99 arasında değişmektedir. Ege tütünlerinden orijin bakımından benzer olan Karabağlar 6265 çeşidinde, Ege 64 ve Akhisar 97'den farklı olarak, kendine özgü ve Rf değeri 0,5 olan bant görülmüştür (Şekil 1 ve 2).

Peroksidase isoenzimine göre çeşitlerin çoğunda benzer bant desenleri görülmüş, ancak bazı çeşitler farklı bant desenleri vermiştir. Bant sayıları 6-13 arasında değişmektedir. En fazla sayıda bantı Samsun-Maden 2421, Trabzon 18362, Yayladağ 18205 ve Silvan - Garzan çeşitleri vermiştir. Peroksidase isoenzimine göre Rf değerleri 0,33-0,66 arasında değişmektedir. Orijin ve yaprak formu bakımından benzer olan Karabağlar 6265, Ege 64, Akhisar 97 ve Basma 192/23 çeşitleri benzer bant desenleri oluşturmuşlardır (Şekil 3). Çeşitlerin tamamında belirgin ortak bantlar bulunmaktadır. Samsun-Maden 2421, Trabzon 18362, Yayladağ 18205 ve Bitlis İç Geçit Tohumu çeşitlerinde bazı kalın (yoğun) bantlar görülmektedir (Şekil 3).

İsoenzimlerin genetik markör olarak kullanılabilmesi için polimorfizmin varlığı, temel koşuldur. Esterase ve Peroksidase isoenzimleri; gerek bu açıdan, gerekse farklı hızlara sahip molekülleri kodlayabilmeleri açısından, genotipik farklılıkları belirlemek için uygundur (Mc Donald ve Brewbaker, 1972; Abet ve ark. 1982).

A. PEKSÜSLÜ ve S. SEKİN: BAZI TÜRK TÜTÜN ÇEŞİTLERİNİN İSOENZİM  
BANTLARINA GÖRE TANIMLANMASI



A. PEKSÜSLÜ ve S. SEKİN: BAZI TÜRK TÜTÜN ÇEŞİTLERİNİN İSOENZİM  
BANTLARINA GÖRE TANIMLANMASI



Bu çalışmada da iki biyokimyasal markör kullanılarak, çeşitlerin tanımlanması yapılmaya çalışılmıştır. Esterase isoenzimine göre çeşitler arasında bazı farklı bant desenlerinin olduğu görülmüştür. Peroksidase isoenzimine göre ise bazı çeşitlerde farklılıklar tespit edilmesine rağmen, bazı çeşitlerde benzer bant desenleri gözlenmiştir. Bu da elektroforetik yolla genotip teşhisinde, elverdiğince fazla sayıda isoenzimle çalışmak gerekliliğini vurgulamaktadır. Böylece bir isoenzimle saptanamayan farklılıklar, diğer bir izoenzimle saptanabilmektedir.

### LİTERATÜR LİSTESİ

- Abet, M., F. Piro, and A. Tonini. 1982. Enzyme polymorphism as a mean of tobacco cultivars identification. esterase and peroxidase. Ann. Ist. Exp. Tob. Scafati, IX, 45-51.
- Abet, M., F. Piro, and A. Tonini. 1983. Enzyme polymorphism in tobacco. Ann. Ist. Exp. Tob. Scafati, X, 55-60.
- Abet, M., F. Piro, and A. Tonini 1984. Enzyme polymorphism in sun-cured tobacco. Ann. Ist. Exp. Tob. Scafati XI.
- Anderson, H. J. 1982. Isoenzyme characters of 47 barley cultivars and their application in cultivar identification. Seed Sci. Technol. 10: 405-413.
- Bilgen G., İ. Demir ve R. Marquard. 1995. İsoenzimin elektroforezle mısırın (*Zea mays* l.) genetik yapısının tanımlanması üzerine bir araştırma, Tr. J. of Agriculture And Forestry, 19: 95-102
- Bredemeijer, G. M. M. 1982. Mechanism of peroxidase isoenzyme induction in pollinated *Nicotiana glauca* styles. Theor. Appl. Genet. 62: 305-309,
- Chien, Y. C., K. N. Kao, and L. R. Wetter. 1982. Chromosomal and isozyme studies of *Nicotiana glauca*-*Glycine max* hybrid cell lines. Theor. Appl. Genet. 62: 301-304.
- Cooke, R. J. 1986. Gel electrophoresis, a role in agriculture, electrophoresis' 86. Proceeding of the fifth meeting of the international electrophoresis society. Ed: Dunn M. J., UCH Publ., Weinheim, 203-217.
- Davis, B. J. 1970. An Introduction to Isozyme Techniques. Academic Press, New York.

- De Jong, D. W., and M. Çakır. 1991. Tracing the linkages of Turkish Tobaccos by isozyme profiling. Crop Research Laboratory, ARS/USDA, Oxfort, NC, USA (Yayınlanmamış araştırma).
- Gebre, H., K. Kan, and A. E. Foster. 1986. Barley cultivar identification by polyacrylamide gel electrophoresis of hordein proteins: Catalog of Cultivars. Crop Sci., 26, 454-60.
- Mc Donald T., and J. L. Brewbaker. 1972. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. The Journal of Heredity, p: 11-15.
- Moore, G. A., and G. B. Collins. 1982. Identification of aneuploids in *Nicotiana tabacum* by isozyme banding patterns. Biochem. Genet. 20: 555-568.
- Peksüslü, A. ve S. Sekin. 1998. Identification of some Turkish tobacco varieties using gel electrophoresis techniques. Biotechnol. and Biotechnol. Eq. 12, 1998/1, p: 34-38.
- Quiros, C. F. 1980. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. Crop Sci. 23: 1102-1106.
- Sekin, S., G. Bilgen, and İ. Demir. 1991. A research on genetic purity control in commercial maize and sunflower hybrid varieties by isoenzyme electrophoretic technique. Journal of Agricultural Faculty Ege Univ. 28 (1): 187-197.
- Sheen, S. J. 1970. Peroxidases in the genus nicotiana. Theor. Appl. Genet. 40: 18-25.
- Simpson, M. J. A., and L. A. Withers. 1986. Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis: A Guide To The Literature, International Board For Plant Genetic Resources, Rome.
- Trinh, Y. G., Th. Gaspar, K. Tranh Van, and J. L. Mareotte. 1981. Genotype, ploidy and physiological stage in relation to isoperoxidases in nicotiana. Physical. Plant. 53:153-157.
- Wikinson C. A., C. L. Mulchi, and M. K. Jr. Aycock. 1985. Polyacrylamide gel electrophoresis for cultivar identification in tobacco. Crop Sci., 25: 971-974.