

RAZAKI ÜZÜM ÇEŞİDİ EKOTİPLERİNİN YAPRAK İZOENZİMLERİNDEN TANISI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR*

H. İbrahim UZUN

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya, TÜRKİYE

İlknur POLAT

Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya, TÜRKİYE

Özet

Türkiye'de değişik lokasyonlardan toplanan Razakı üzüm çeşidinin sinonimleri, yaprak izoenzimlerinden teşhis edilmiştir. Enzim kaynağı olarak genç yapraklar kullanılmış ve catechol oksidase (CO), glutamate oksaloasetate trasaminase (GOT), malate dehydrogenase (MDH), acide phosphatase (HP), peroxidase (PER), glucose-6-phosphat isomerase (GPI) ve indophenol oksidase (IPO) izoenzim bant desenleri saptanmıştır. İncelenen üzüm çeşitlerinde HP ve MDH izoenzimlerinin tüm çeşitlerde aynı sayıda ve seviyede bant vermesi nedeniyle, çeşitlerin ayırımında sonuç veremeyecekleri görülmüştür. Bütün çeşitlerde ve farklı seviyelerde bulunan; CO izoenziminde 2-4, IPO'da 6-8, PER'de 1-2, GPI'da 2-4, GOT izoenziminde ise 2-4 arasında değişen bant saptanmıştır. Bu nedenle çeşitler arasındaki farklılığı tespit etmek amacıyla esas olarak CO, PER, GPI, GOT ve IPO izoenzimlerinden yararlanılabileceği sonucuna varılmıştır. Her bir enzim sistemi için zimogramlar oluşturulduktan sonra, benzerlik indeksi hesaplanarak matriks oluşturulmuş ve bu değerlere göre UPGMA metodu kullanılarak dendogram yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda, Antep Razakısı ile Dülek köy Razakısı arasında incelenen enzimlere göre %100'lük bir benzerlik olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte Zonguldak Razakısı ile Deliemin Razakısı %61 oranındaki bir benzerlik ile birbirine en uzak çeşitler olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Üzüm, Ekotip, İzoenzim, PAGE

Studies on the Identification of the Ecotypes of Razakı Grape Cultivars by Leaf Isoenzymes

Abstract

Synonymes of Razakı grape cultivar collected from different locations in Turkey were identified by leaf isozymes. Catechol oksidase (CO), glutamate oksaloasetate trasaminase (GOT), malate dehydrogenase (MDH), acide phosphatase (HP), peroxidase (PER), glucose-6-phosphat isomerase (GPI) ve indophenol oksidase (IPO) isoenzymes banding patterns were obtained by using leaves for enzyme extraction. Since HP and MDH enzymes had similar band and positions in all of cultivars, therefore, they could not be used to detect genetic variations among different cultivars. While 2-4 bands, whose position varied in every cultivars used in this study, were obtained for CO, GPI and GOT enzymes, 6-8 and 1-2 bands were present for IPO and PER enzymes, respectively. Thus it was concluded that CO, IPO, PER, GPI and GOT enzyme systems could be used to detect genetic variation. After forming zymograms for each of all enzyme systems, matrix was constructed by using similarity index and from these data, dendograms were obtained by the UPGMA method. The analyses showed that while there was 100% similarity in terms of isoenzymes investigated between Razakı of Antep and Dülek köy, it was observed that similarities between Razakı of Zonguldak and Deliemin were the farthest being 61% similar.

Keywords: Grape, ecotype, isozyme, PAGE

1. Giriş

Anadolu, asmanın anavatanı olarak bilinen bölgeler içerisinde yer aldığı için, hem çeşit zenginliğine hem de geniş bağ alanlarına ve üzüm üretimine sahip bir yerdir (Çetiner, 1981). Belirtilen çeşit zenginliği içinde Razakı çeşitlerinin önemli bir yeri vardır.

Geniş adaptasyon kabiliyetinin yanında verimi ve sofralık özellikleri nedeniyle de, Razakı çeşidi bir çok ülkede yetiştirilmektedir. Anadolu'nun bir çok yöresinde Razakı, değişik isimlerle anılmaktadır. Bunların çeşit, ekotip veya

* Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi, Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

sinonim olma durumlarından söz edilmektedir (Samancı ve Uslu, 1993).

Galet (1971), Beyrut Hurması adı altında incelediği çeşidin değişik ülkelerde; Rosaki, Razaki, Bolgar ve Afuz Aii ismi ile bilindiğini belirtmektedir. Manzo ve Tamponi (1987), İtalya'da Regina çeşidinin orijinin Anadolu olduğunu belirtmekte ve sinonim olarak ta pek çok isim bildirmektedir.

Ülkemizdeki Razakı ve sinonimlerini üzerinde ampelografik çalışmalar yapılarak morfolojik açıdan çeşit özellikleri saptanmaya çalışılmıştır (Samancı ve Uslu, 1993).

Üzüm çeşitlerinin tanımlanmasında yaygın bir şekilde kullanılan ampelografik yöntemlerde daha çok yaprak, salkım, tane, sürgün ucu, çekirdek gibi organlardan yararlanılmaktadır. Bununla beraber son yıllarda şıradaki antosiyaninler ve aromatik bileşiklerden yararlanmak suretiyle araştırmacılar spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle üzüm çeşitlerini teşhis etmeye çalışmışlardır. Özellikle incelenen bu organ ve bileşiklerin ekolojik koşullar ve kültürel uygulamaların etkisiyle farklılık göstermesi, araştırmacıları son yıllarda çeşitlerin fenotipik özelliklerinden çok, doğrudan genetik yapısını yansıtabilecek çalışmalara yöneltmiştir (Ağaoğlu ve ark., 1995; Weeden ve Wendel, 1989). Bu metodlardan biri hiç şüphesiz enzimlerin kullanılmasıdır.

Enzimler çoklu moleküler formları bulunan proteinlerden meydana gelirler. Protein olarak enzimler, elektrik şarjı ile ayrılabilirler belirli bazı özelliklere sahiptir. İzoenzimlerin morfolojik karakterlere göre en büyük avantajı çevre şartlarından etkilenmemesi veya çok az etkilenmesidir (Weeden ve Wendel, 1989).

Bağcılıkta izoenzim çalışmaları; çeşitleri, asma anaçlarını, melezleme sonucunda bireylerin ebeveynlerine olan yakınlığını, yabani asma formlarını, populasyonlar arasındaki farklılıkları, klonları teşhis etmek amacıyla, enzim kaynağı olarak olgun üzüm taneleri (Ağaoğlu ve ark., 1995a; Weeden ve Wendel, 1989; Uzun, 1986; Sarıkaya ve ark., 1996; Uzun ve Sarıkaya, 1996; Ağaoğlu ve ark., 1995b; Ağaoğlu ve ark., 1998); yaprak (Söylemezoğlu ve ark., 1998; Çalışkan ve Ağaoğlu, 1998; Ağaoğlu

ve ark., 1999; Parfitt ve Arulsekhar, 1989); odun dokusu (Altube ve ark., 1991; Boursiquot ve Parra, 1992); kökler (Boursiquot ve Parra, 1992), sürgün, kallus, şıra ve şarap örnekleri (Kozma ve ark., 1990) ve polen (Samaman ve Wallace, 1981) kullanılabilir.

Bu çalışmada ise, enzim kaynağı olarak yaprak kullanılmış ve CO, GOT, MDH, HP, GPI, PER ve IPO izoenzim bant desenleri elde edilmiştir. Bantların ortak olma durumlarına göre, benzerlik indeksi hesaplanmıştır. Bu değerler sonucunda, incelenen enzimler açısından çeşitler arasındaki yakınlık ve uzaklık dereceleri tespit edilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Deneme, 1995-1996 yıllarında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesinde yürütülmüştür. Enzim kaynağı olarak kullanılan yapraklar, daha önce Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsünden getirilerek uygulama bahçesine dikilmiş olan asmalardan temin edilmiştir.

Razakı ismi ile bilinen veya benzerliği düşünülen 20 çeşit çalışma kapsamına alınmıştır.

Çeşitlerin ampelografik özellikleri daha önceden belirlenmiştir (Samancı ve Uslu, 1993). Çeşit özelliklerinin bir kısmı Çizelge 1'de gösterilmiştir.

2.2. Yöntem

Dikey Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) tekniği ile CO, GOT, MDH, HP, GPI, PER ve IPO izoenzim bant desenlerinden çeşitlerin teşhisleri yapılmıştır. Enzimlerin ekstraksiyonu, elektroforeze ilişkin yöntemler ve enzimlerin boyanması Wolfe (1976), Soltis ve Soltis (1989) ve Arulsekhar ve Parfitt (1986)'e göre aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

Ayrıca benzerlik indeksi elde edilmiş ve bu değerlere göre zimogram oluşturulmuştur.

Çizelge 1. Bazı Razakı Sinonimi Üzüm Çeşitlerinin Ampelografik Özellikleri.

| Çeşitler | 4-6 yaprak üst rengi | Sap cebi Açık-kapalı | Sap cebi özelliği | Üst cep taban şekli |
|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------|
| Hafızali | Yeşil | Geniş açık | Düz | U |
| Burdur Razakısı | Yeşil | Kapalı | Sınırlı | V |
| Pembe Razakı | Kahve lekeli | Açık | Düz | Y U |
| Konya Razakısı | Kahve lekeli | Kapalı | Sınırlı | V U |
| Buca Razakısı | Yeşil | Geniş açık | Düz | U |
| Siyah Razakı | Yeşil | Açık | Düz | U Y |
| Razakı Klon 73 | Yeşil | Geniş açık | Düz | U Y |
| Besni | Kırçılı | Açık | Düz | U V |
| Antep Razakısı | Yeşil | Açık | Sınırlı | V |
| Çivril Razakısı | Yeşil | Açık | Düz | Y U |
| Işıklı Razakısı | Yeşil | Açık | Düz | Y |
| Dumanlı Razakısı | Kahve lekeli | Geniş açık | Düz | U |
| Deliemin Razakısı | Yeşil | Açık | Düz | Y |
| Zonguldak Razakısı | Kahve lekeli | Açık | Düz | U |
| Dülekköy Razakısı | Kahve lekeli | Geniş açık | Düz | U |
| Ufak Razakı | Kahve lekeli | Açık | Düz | U |
| Yuvarlak Razakısı | Yeşil | Açık | Düz | U V Y |
| Dimişki Razakısı | Kahve lekeli | Açık | Düz | Y |
| İstanbul Razakısı | Kırçılı | Kapalı | Sınırlı | U Y |
| Aydın Razakısı | Yeşil | Geniş açık | Düz | U |

2.2.1. Enzimlerin Ekstraksiyonu

Enzim kaynağı olarak yapraklar kullanılmış ve özellikle sürgün ucundan itibaren 3-6. boğumlar arasından alınmıştır. Yapraklar her bir çeşitten 1'er gr olacak şekilde ve parçalanmayı kolaylaştırmak amacıyla, küçük bir kap içerisinde bir makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Bu örnekler 25 ml'lik beherler içerisine koyularak üzerine 1 gr PVPP ve 10 cc Parfitt'in ekstraksiyon tampon çözeltisi ilave edilip, buz parçaları bulunan kap içerisinde, 13500 devirde ultra-turrax homogenizatörde parçalanmıştır. Parçalanma işleminden sonra tülbentten geçirilip, elde edilen çözelti 4 °C'de, 20000 x g devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı kısım alınarak, enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.2.2. Elektroforezin Hazırlanması ve Uygulanması

Elektroforez için kullanılacak jel, ayırma jeli (%12'lik) ve taşıyıcı jel (%4'lük) olmak üzere ikiye ayrılır. Öncelikle enzimlerin elektroforez sırasında ilerleyebileceği ayırma jeli hazırlanarak 1.5 mm aralığa sahip olan iki cam plaka arasına dökülür, üzerine bir miktar saf su ilave edilir

ve yaklaşık bir saat süreyle polimerize olması beklenir. Polimerize olduktan sonra jelin üstündeki saf su atılır, taşıyıcı jel hazırlanır ve taraklar yerleştirildikten sonra ayırıcı jel üzerine dökülür. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılır ve saf su ile yıkanır, kurutma kağıdı ile kurutulur. Bu işlemlerden sonra daha önce ekstrakte ettiğimiz enzim örnekleri, kuyucuklar içerisine bir mikropipet yardımıyla her bir örnek 100 µl olacak şekilde yüklenir. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilir ve elektrik akımının iletileceği bölgeler elektrot tampon çözeltisi ile doldurulur. Bu işlemlerden sonra elektroforez süresince, jel sıcaklığını sabit tutmak için (4 °C), soğuk su akımı sağlayan hortumlar tankın her iki tarafına takılır. Güç kaynağında, akım şiddeti 25mA, voltajı 350 V olacak şekilde ayarlama yapılır. Örnekler taşıyıcı jeli geçinceye kadar akım şiddeti 25 mA'de tutulur. Jeli geçtikten sonra 35 mA'e çıkarılır. Elektroforez 4-6 saat kadar sürer.

2.2.3. Enzim Bantlarının Boyanması ve Değerlendirilmesi

Elektroforez bittikten sonra elde edilen catechol oxidase (CO), glutamate oksaloasetate trasaminase (GOT), malate dehydrogenase (MDH), acide phosphatase

(HP), peroxidase (PER), glucose-6-phosphat isomerase (GPI) ve indophenol oksidase (IPO) izoenzim bantlarının görülebilmesi için boyanması gerekir. IPO izoenzim bantlarının görülebilmesi için GPI ve ADH (alcohol dehydrogenase) boyama reçeteleri kullanılmıştır. CO, HP, PER ve ADH enzimleri Wolfe (1976) 'e göre, GOT ve GPI enzimleri Soltis ve Soltis (1989) ve MDH enzimi Arulsekar ve Parfitt (1986) 'e göre hazırlanmıştır.

Boyama çözeltisi içine konulan jeller, enzim çeşidine göre 1-6 saat içinde görünür hale gelmektedir. Ayrıca jeller boyama esnasında oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bulundurulmuştur. Bantlar açığa çıktıktan sonra çözelti içerisinde çıkarılarak bir cam levha üzerine alınır. Daha sonra bantların fotoğrafları çekilir, zimogramları çizilir ve orijinden uzaklığı hesaplanır.

Her bant için Rf değerleri aşağıdaki formüle göre hesap edilmiştir.

$$Rf = \frac{\text{Bantın orijinden uzaklığı}}{\text{Çözeltinin orijinden uzaklığı}}$$

Çözelti uzaklığını bulmak amacıyla bromphenol blue kullanılmıştır. Ölçümler kompasla milimetre düzeyinde yapılmıştır.

Her bir enzim için zimogram çizilip, Rf değerleri bulunduktan sonra, çeşitlerin birbirine olan yakınlığını ve uzaklığını tespit etmek amacıyla benzerlik indeksi % olarak hesaplanmıştır. Benzerlik indeksi (similarity index=S.I.) Sugiura ve ark. (1988) 'na göre hesaplanmıştır:

$$S.I. = \frac{\text{Benzer bant sayısı}}{\text{Benzer bant + Benzer olmayan sayısı} + \text{Benzer olmayan bant sayısı}} \times 100$$

Sonuçların görsel olarak bir grafik üzerinde görülebilmesi için SI değerleri UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) kullanılarak bir dendogram oluşturulmuştur. Bu dendogram incelenen enzimler açısından çeşitler arasındaki benzerlik durumunu % olarak ifade etmektedir. İstatistiki hesaplamalarda NTSYS-pc bilgisayar programı kullanılmıştır (Rohlf, 1987).

3. Bulgular

3.1. Catechol oksidase (CO) E.C. 1.10.3.1

Bu enzim sisteminde, genel olarak iki bölge halinde bantlar saptanmıştır. Orijine yakın bölgede sayıları 4 ile 5 arasında değişen bantlar mevcuttur. Fakat bunlar net olarak belirlenemediği için dikkate alınmamıştır. Bu nedenle sadece ikinci bölgedeki bantlar çeşitlerin ayırt edilmesinde dikkate alınmıştır. İkinci bölgede, CO enzim sisteminde çeşitlerin her biri 2-4 arasında değişen izoenzim bantları içermiştir. 2 ve 3 nolu bantlar bütün çeşitlerde mevcuttur. 1 nolu bant ise sadece Besni, Deliemin ve İstanbul Razakısı'nda görülmektedir. 5 ve 6 nolu bantlar ise sadece Konya ve Dumanlı Razakı çeşitlerinde görülmüştür. Elde edilen izoenzim bantlarının zimogramları ile herbir bantın sağ yanında Rf değerleri Şekil 1'de, tüm çeşitlerde görünümü ise Çizelge 2'de verilmiştir.

3.2. Malate dehydrogenase (MDH) E.C. 3.1.3.2

Bütün çeşitlerde aynı koyulukta ve seviyede olan 2 bant görülmüştür. Bantların zimogramı ve Rf değerleri Şekil 1'de verilmiştir. Tüm çeşitlerdeki görünümü ise Çizelge 2'dedir. Bu durumda yapraklardaki MDH izoenzimlerinden çeşitleri ayırt etmek mümkün olamamıştır.

3.3. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) E.C. 2.6.1.1

Bu enzim sisteminde çeşitler arasında 2-4 arasında değişen izoenzim bantları saptanmıştır. Şekil 1 ve Çizelge 2'den görüldüğü gibi 2 ve 3 nolu bantlar bütün çeşitlerde mevcuttur. 4 nolu bant desen tipi ise sadece Konya, Siyah ve Dımışkı Razakısında görülmektedir.

3.4. Indephenol oksidase (IPO) E.C. 1.9.3.1

Çeşitler arasında, Rf değerleri 0.45-0.70 arasında değişen toplam 8 izoenzim bantları saptanmıştır. IPO izoenzim bantlarının saptanması amacıyla ADH ve GPI enzimlerinin boyama çözeltilerinden

yararlanılmış ve sadece beyaz renkli bantlar dikkate alınmıştır. 3 farklı bant deseni tipi elde edilmiştir (Şekil 2).

3.5. Acide phosphatase (HP) E.C. 3.1.3.2

Tüm çeşitlerde 4 izoenzim bandı saptanmıştır. Fakat, tek tip monomorfik bant deseni elde edilmiştir. Elde edilen bantların zimogramı ve Rf değerleri Şekil 1'de ve tüm çeşitlerde görünümü Çizelge 2'de verilmiştir.

3.6. Peroxidase (PER) E.C. 1.11.1.7

İncelenen üzüm çeşitlerinde bantlar iki grupta görülmüştür. Fakat jelin üst tarafında, birinci grupta bulunan bantlar net görülemediği için dikkate alınmamış, sadece ikinci gruptaki bantlar değerlendirilmiştir. Bu grupta toplam 3 izoenzim bandı saptanmıştır. Elde edilen bantlar ve Rf değerleri Şekil 2'de

verilmiştir. Çeşitler arasındaki farklılığı belirlemede bant sayısı kadar, bantların Rf değerleri de önemlidir. Toplam bant sayısı aynı olmasına rağmen, Rf değerlerinde farklılık gösteren, örneğin Razakı Klon 73 ve Besni çeşitlerinin, aynı olmadığı açık bir şekilde görülmektedir.

3.7. Glucose phosphate isomerase (GPI) E.C. 5.3.1.9

GPI enzim sisteminde 2-4 arasında değişen bant tespit edilmiştir. Bantların Rf değerleri ve zimogramlar Şekil 2'de verilmiştir. Ayrıca Çizelge 2'de her bir çeşit için zimogramların değerlendirilmesi görülmektedir. Şekil ve Çizelge'de de görüldüğü gibi 1 nolu bant sadece Konya ve Deliemin Razakısında saptanmıştır. 2 nolu bant ise Pembe ve İstanbul Razakısı dışındaki tüm çeşitlerde mevcuttur.

| Bant No | CO | | | | Bant No | MDH | | Bant No | HP | | Bant No | GOT | | | |
|------------------|----|---|---|------|---------|-----|------|---------|----|------|---------|-----|---|---|------|
| 1 | | | — | 0.56 | 1 | — | 0.44 | 1 | — | 0.36 | 1 | — | — | | 0.37 |
| 2 | — | — | — | 0.58 | 2 | — | 0.60 | 2 | — | 0.61 | 2 | — | — | — | 0.40 |
| 3 | — | — | — | 0.61 | | | | 3 | — | 0.66 | 3 | — | — | — | 0.43 |
| 4 | — | | | 0.63 | | | | 4 | — | 0.70 | 4 | — | | — | 0.45 |
| 5 | | | — | 0.68 | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | — | 0.70 | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | 1 | | | 1 | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Bant Deseni Tipi | | | | | | | | | | | | | | | |

Şekil 1. Razakı Çeşidi Ekotiplerinin CO, MDH, HP ve GOT Bant Desenlerinin Zimogramı ve Rf Değerleri.

| Bant No | IPO | | | Bant No | PER | | | Bant No | GPI | | | | |
|------------------|-----|---|---|---------|-----|---|---|---------|-----|---|---|---|------|
| 1 | — | — | — | 0.45 | 1 | | — | 0.58 | 1 | | — | | 0.28 |
| 2 | — | | — | 0.52 | 2 | — | — | 0.60 | 2 | — | — | — | 0.32 |
| 3 | — | | — | 0.54 | 3 | — | | 0.63 | 3 | — | — | — | 0.37 |
| 4 | — | | — | 0.56 | | | | | 4 | — | — | — | 0.43 |
| 5 | | | — | 0.60 | | | | | | | | | |
| 6 | | | — | 0.62 | | | | | | | | | |
| 7 | | | — | 0.64 | | | | | | | | | |
| 8 | — | — | — | 0.70 | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Bant Deseni Tipi | | | | | | | | | | | | | |

Şekil 2. Razakı Çeşidi Ekotiplerinin IPO, PER ve GPI Bant Desenlerinin Zimogramı ve Rf Değerleri.

Çizelge 2. Razakı Çeşidi Ekotiplerinde Herbir Enzime İlişkin Bant Deseni Tipi.

| Çeşitler | CO | MDH | GOT | IPO | HP | PER | GPI |
|-----------------------|----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| 1.Aydın Razakısı | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2.Hafızali | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 3.Burdur Razakısı | 1 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 4.Pembe Razakı | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 4 |
| 5.Konya Razakısı | 3 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 2 |
| 6.Buca Razakısı | 2 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 7.Siyah Razakı | 2 | 1 | 4 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 8.Razakı Klon 73 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9.Besni | 4 | 1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 3 |
| 10.Antep Razakısı | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 11.Çivril Razakısı | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 12.Işıklı Razakı | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 13.Dumanlı Razakısı | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 14.Deliemin Razakısı | 4 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 2 |
| 15.Zonguldak Razakısı | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| 16.Dülekköy Razakısı | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 17.Ufak Razakı | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 |
| 18.Yuvarlak Razakı | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 19.Dımışkı Razakısı | 2 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 20.İstanbul Razakısı | 4 | 1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 4 |

3.8. Benzerlik İndeksi

İncelenen enzimler açısından, Razakı sinonimlerinin hangilerinin birbirine ne kadar benzer, hangilerinin birbirinden ne kadar farklı olduğunu açıklamak için, benzerlik indeksi % olarak belirlenip, matrix oluşturulmuştur. Çizelge 3'ten de görüldüğü gibi çeşitler arasındaki benzerlik, incelenen enzimler açısından %61-100 arasında değişmektedir. Ayrıca UPGMA kullanılarak benzerlik indeksi (SI) değerleri sınıflandırılmış ve sinonimler arasındaki ilişkiler Şekil 3'de dendogram oluşturularak gösterilmiştir. Buradan da görüldüğü üzere dendogram üç ana gruba ayrılmıştır.

Genel olarak SI tablosu ve dendograma bakıldığında, incelediğimiz enzimler açısından birbirine en uzak olan çeşitleri, %61 gibi bir benzerlik oranıyla Zonguldak ile Deliemin Razakısı oluşturmaktadır. Bu çeşitleri takiben %65 oranıyla Konya ile Pembe Razakı, Besni ile Dumanlı Razakısı birbirine en uzak çeşitlerdir. Bunun yanında Dülekköy Razakısı ile Antep Razakısı, %100'lük bir benzerlik oranıyla birbirine en yakın çeşitleri oluşturmaktadır. Yine bu çeşitleri takiben %96 benzerlik oranıyla, Çivril ile Antep Razakısı, Dımışkı ile Dülekköy Razakısı, Dülekköy ile Çivril Razakısı ve Razakı Klon

73 ile Aydın Razakısı birbirine en yakın çeşitlerdir.

4.Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, CO enzimi için 4 değişik bant deseni saptanmıştır. Net olarak elde ettiğimiz bantların Rf değerleri ise 0.56-0.70 arasında değişmiştir. Çeşitler arasındaki farklılığı 1, 4 ve 5 nolu bantlar oluşturmuştur.

Sarıkaya ve ark. (1996), yine Razakı sinonimlerini ayırt etmek amacıyla izoenzimleri kullanmışlardır. Olgun üzüm tanelerini enzim kaynağı olarak kullanmışlar, PAGE yöntemiyle CO enziminde 7-10 arasında değişen bant belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda Kırmızı, Konya, Siyah, Akhisar ve Ufak Razakıyı diğer çeşitlerden farklı bulmuşlardır. Aydın ve Buca Razakısı ile Hafızalide Rf değerleri 0.41-0.77 arasında değişen 7 bant, Siyah Razakıda 9 bant elde etmişlerdir. Bu çalışmada ise, enzim kaynağı olarak yaprak kullanılmış ve Aydın Razakısında Rf değerleri 0.58-0.63 arasında değişen 3 izoenzim bandı, Buca ve Siyah Razakıda 0.58-0.61 arasında değişen 2 izoenzim bandı tespit edilmiştir.

Uzun ve İter (1993), nişasta jel elektroforezinde ve enzim kaynağı olarak yaprakları kullandıkları çalışmada; Aydın,

Çizelge 3. Razakı Çeşidi Ekotiplerinde Benzerlik İndeksi (%).

| Çeşitler | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1. Aydın R. | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Hafızali | 89 | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. Burdur R. | 83 | 78 | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 Pembe R. | 76 | 88 | 78 | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. Konya R. | 77 | 67 | 76 | 65 | - | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. Buca R. | 81 | 76 | 88 | 76 | 84 | - | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. Siyah R. | 85 | 74 | 83 | 74 | 89 | 95 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 8.Razakı Klon 73 | 96 | 92 | 85 | 73 | 74 | 85 | 81 | - | | | | | | | | | | | | |
| 9. Besni | 68 | 74 | 67 | 72 | 67 | 75 | 73 | 72 | - | | | | | | | | | | | |
| 10. Antep R. | 95 | 84 | 78 | 74 | 79 | 86 | 90 | 91 | 70 | - | | | | | | | | | | |
| 11. Çivril R. | 90 | 88 | 80 | 78 | 75 | 88 | 86 | 95 | 74 | 96 | - | | | | | | | | | |
| 12. Işıklı R. | 78 | 73 | 95 | 83 | 78 | 86 | 88 | 80 | 69 | 86 | 85 | - | | | | | | | | |
| 13. Dumanlı R. | 77 | 73 | 85 | 69 | 91 | 92 | 88 | 80 | 65 | 82 | 81 | 86 | - | | | | | | | |
| 14. Deliemin R. | 72 | 77 | 70 | 66 | 70 | 75 | 70 | 74 | 81 | 78 | 77 | 72 | 71 | - | | | | | | |
| 15. Zonguldak R. | 80 | 70 | 83 | 79 | 75 | 81 | 85 | 77 | 75 | 85 | 82 | 88 | 73 | 61 | - | | | | | |
| 16. Dülekköy R. | 80 | 84 | 78 | 74 | 79 | 86 | 90 | 91 | 70 | 100 | 96 | 92 | 77 | 74 | 85 | - | | | | |
| 17. Ufak R. | 83 | 73 | 76 | 73 | 82 | 82 | 91 | 80 | 82 | 95 | 85 | 81 | 79 | 65 | 93 | 88 | - | | | |
| 18. Yuvarlak R. | 90 | 79 | 73 | 70 | 75 | 95 | 85 | 86 | 75 | 95 | 91 | 78 | 73 | 91 | 90 | 95 | 93 | - | | |
| 19. Dımışkı R. | 91 | 80 | 80 | 71 | 82 | 88 | 93 | 88 | 67 | 96 | 92 | 85 | 80 | 77 | 82 | 96 | 85 | 91 | - | |
| 20. İstanbul R. | 68 | 74 | 67 | 81 | 67 | 75 | 73 | 72 | 90 | 70 | 74 | 69 | 72 | 81 | 66 | 70 | 72 | 66 | 67 | - |

Buca, Siyah Razakı ve Hafızali çeşitlerini CO enzimine göre incelemişlerdir. Söz konusu çalışmada, Aydın Razakısı için Rf değerleri 0.34-0.44 arasında değişen 3 izoenzim bantı, Buca Razakısı için 0.29-0.48 arasında değişen 5 bant, Siyah Razakıda 0.34-0.39 arasında değişen 3 bant saptamışlardır.

Söylemezoğlu ve ark. (1998), yapraklarda incelemiş oldukları CO izoenziminde, Besni için Rf değeri 0.23-0.38 arasında değişen 4 bant, Hafızalide 0.21-0.40 arasında değişen 6 bant tespit etmişlerdir. Ağaoğlu ve ark. (1995a), bazı sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerini izoenzim bantlarından yararlanarak tanımlamak amacıyla CO enzimini kullanmışlardır. Enzim kaynağı olarak olgun üzüm tanelerini kullanmışlar ve 6-10 arasında değişen bant elde etmişlerdir.

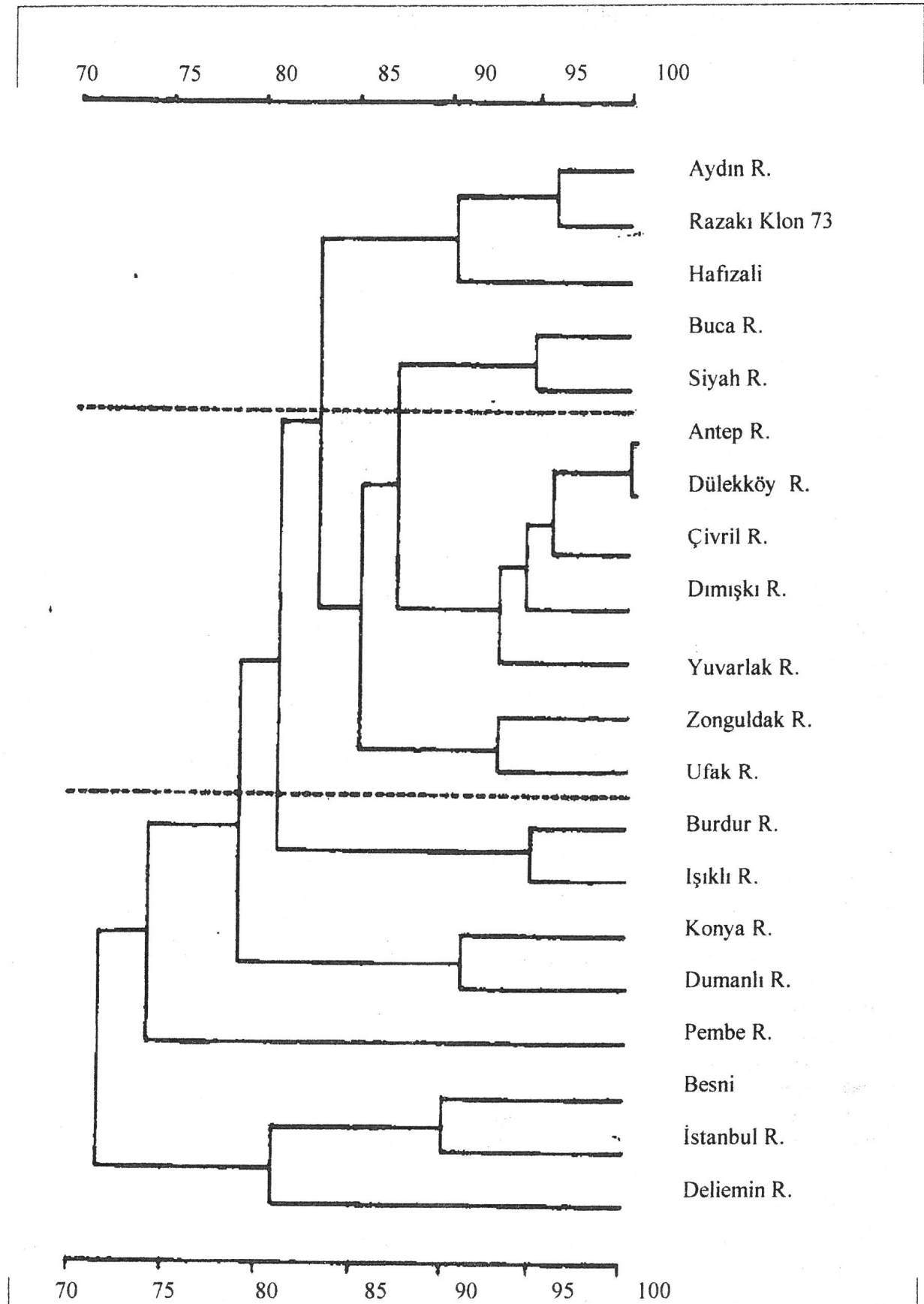
Yine Ağaoğlu ve ark. (1999), 14 Razakı sinonimi ele almışlar ve CO enzimi için RF değerleri 0.11-0.24 arasında değişen bantlar elde etmişleridir. Benzer bir çalışmada, Wolfe 60 sofralık üzüm çeşidini ayırt etmek amacıyla olgun üzüm tanelerini kullanmış ve CO enzimi için Rf değerleri 0.18-0.43 arasında değişen 6 bant elde etmiştir (Wolfe, 1976).

Yapmış olduğumuz çalışmada, tüm çeşitlerde MDH izoenziminde Rf değerleri 0.44 ve 0.60 olan iki bant, HP enziminde

0.36-0.61-0.66-0.70 olan 4 bant saptanmıştır. Monomorfik bantlar veren bu iki enzim, çeşit ayırt etmede uygun bulunmamıştır. Bununla birlikte Sarıkaya ve ark. (1996), olgun üzüm tanelerinde MDH enziminde 3 ile 5 arasında değişen bant tespit etmişlerdir ve Rf değerleri 0.39-0.61 arasında değişmektedir. Polimorfik bant oluşturması nedeniyle çeşit ayrımı için uygun bir enzim kabul etmişlerdir. HP enziminde ise Rf değerleri 0.26-0.52-0.60 olan 3 bant tespit etmişlerdir. Bantların monomorfik olması nedeniyle çeşit ayrımında uygun bulmamışlardır.

Wolfe (1976), çeşit teşhisi için, olgun üzüm tanelerini kullanarak yaptığı çalışmada, HP enziminde polimorfik bantlar elde etmiş ve çeşit ayrımında kullanılabilir enzim olduğuna karar vermiştir. Aynı amaçla olgun üzüm tanelerinden yapmış oldukları çalışmada Ağaoğlu ve ark. (1998), HP enzimi için 1-3 arasında değişen bantlar elde etmişlerdir. Yine Ağaoğlu ve ark. (1999), bir başka çalışmada Razakı sinonimlerini ele almışlar, Rf değerleri 0.07-0.15 arasında değişen bantlar elde etmişlerdir.

GOT enzim sisteminde, yapmış olduğumuz çalışmada 2-4 arasında değişen polimorfik bant elde edilmiştir. Tanelerde (Sarıkaya ve ark., 1996), yapılan çalışmada ise tek bant elde edilmiş, bunun sonucu olarak ta uygun bir enzim sistemi olmadığı



Şekil 3. Razakı Sinonimi Üzüm Çeşitlerinin 7 İzoenziminin Cluster Analizi Sonucunda Oluşan Dendogram.

belirtilmiştir.

IPO için 6-8 arasında değişen polimorfik bant elde edilmiştir. Buna bağlı olarak, çeşit teşhisinde uygun bir enzim sistemi olduğu ortaya çıkmaktadır. Aynı şekilde, Sarıkaya ve ark. (1996) ve Wolfe (1976), yapmış oldukları çalışmalarda polimorfik bantlar elde etmişler ve çeşit ayrımı için uygun bir enzim sistemi olduğunu kabul etmişlerdir.

Çeşit teşhisinde kullanabilecek diğer bir enzim sistemi GPI'dir. Bu enzim sistemi ayrıca Cabernet franc populasyonundaki A ve B olan farklı iki tip ele alınmış ve B tipinin bu populasyona ait olmadığı sonucuna varılmıştır (Calo ve ark., 1989).

Peroxidase, yine çeşit ayrımı için kullanabilecek enzim sistemlerindedir. Çalışmamızda, Rf değerleri 0.58-0.63 arasında değişen bantlar elde edilmiştir. Uzun ve Sarıkaya (1996), bazı melez üzüm çeşitleri ile ebeveynleri arasındaki farklılığı tespit etmek için PER enzim sistemini, enzim kaynağı olarak ta hem yaprak hem de tane kullanmışlar ve melezler ile ebeveynler arasında geniş çapta varyasyonlar olduğunu saptamışlardır.

Razakı grubu üzüm çeşit veya tiplerinin ampelografik özellikleri Samancı ve Uslu (1993) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada Antep Razakısı ile Dımışkı arasında büyük bir benzerlik olduğunu saptamışlar ve tek farkın sap cebi kenarında görüldüğünü bildirmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise bu iki çeşit arasında incelediğimiz enzimler açısından %96 oranında bir yakınlık bulunmuştur. Sarıkaya ve ark. (1996), olgun üzüm tanelerini enzim kaynağı olarak kullandıkları çalışmada, sarı-yeşil renkli meyveye sahip bu iki çeşit arasında yine incelenen enzimler açısından %84 oranında bir yakınlık tespit edilmiştir.

Aynı şekilde morfolojik özellikler esas alındığında, pembe renkli çeşitler olan Zonguldak Razakısı ile Pembe Razakının sinonim olduğu belirtilmiştir. Bu iki çeşitte yalnızca yaprak dip şeklinde fark olduğu belirtilmiştir (Samancı ve Uslu, 1993). Oysa yaptığımız çalışmada, yine incelenen enzimler açısından iki çeşit arasında %79 oranında yakınlık bulunmuştur. Enzim kaynağı olarak olgun üzüm taneleri kullanıldığında ise %90 oranında yakınlık

belirlenmiştir (Sarıkaya ve ark., 1996). Dolayısıyla bunları ayrı bir çeşit olarak kabul etmek mümkündür.

Ampelografik çalışmalarda Konya yöresinde Razakı adı ile yetiştirilen çeşidin ise Razakı grubundan olmadığı, farklı bir çeşit olduğu anlaşılmıştır. Bu çeşitte genç yapraklar kırmızı, olgun yaprakların alt yüzü tüylü ve sap cebi kapalıdır. Oysa, Razakı grubunun yaprakları ve sürgünleri tüysüz ve sap cebi de açıktır (Samancı ve Uslu, 1993). Yapmış olduğumuz çalışmada ise, Konya Razakısına en yakın çeşidin %91 oranıyla Pembe Razakı olduğu saptanmıştır. Bunun yanında Antep Razakısı ile Dülek köy Razakısı arasında görülen %100'lük bir benzerlik nedeniyle, incelenen enzimler açısından bu iki çeşidi sinonim olarak kabul edebiliriz. Fakat diğer enzimler için de bu sonucun onaylanması gerekir. Ayrıca bu durumun, Aydın ile Çivril Razakısı ve Burdur ile Burdur-Kışla Razakısı arasındaki yine %100'lük bir benzerlik dolayısıyla sinonim olma olasılığı fazladır. Nitekim, olgun üzüm taneleriyle yapılmış olan çalışmada (Sarıkaya ve ark., 1996), bu iki çeşit arasında incelenen enzimlere göree %91 oranında bir yakınlık bulunmuştur. Buna karşılık Aydın ile Çivril Razakısı arasında %100 oranında yakınlık tespit edilmiştir. Oysa yapmış olduğumuz çalışmada, enzim kaynağı olarak yapraklar kullanılmış ve ilk iki çeşit arasında %91, diğer iki çeşit arasında %92 oranında yakınlık belirlenmiştir. Dolayısıyla benzerlik oranı yüksek çeşitlerin sinonim olma olasılığı artmaktadır.

Bitkilerin genetik yapısından kaynaklanan farklılıklar, izoenzim bantları yardımıyla çeşit düzeyinde saptanabilir. Razakı grubu üzüm çeşitlerinde de, morfolojik olarak ayırt etmek güç olmasına rağmen, izoenzimlerle farklı ekotipler ayırt edilmiştir. Bunların ayrı çeşit olarak değerlendirilmesinde yarar vardır.

Kaynaklar

- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Ergül, A. ve Çalışkan, M., 1995a. Ülkemizde Yetiştirilen Bazı Sofralık ve Şaraplık Üzüm Çeşitlerinin İzoenzim Bantlarından Yararlanılarak Elektroforez Tekniği ile Tanımlanmaları. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Cilt II: 567-571.

- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Ergül, A. ve Çalışkan, M., 1995b. Kalecik Karası Üzüm Çeşidi Klonlarının Kateşol Oksidaz Enziminden Yararlanılarak SDS-PAGE Tekniği ile Ayrımları. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Cilt II: 564-566.
- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Marasalı, B., Ergül, A. ve Çalışkan, M., Türkben, C., 1998. Bazı Yerli ve Yabancı Kökenli Üzüm Çeşitlerinin Poliakrilamid Jel Elektroferez Tekniği ile Tane Kökenli İzoenzimlerinden Yararlanılarak Ayrımları. 4. Bağcılık Sempozyumu: 145-151.
- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Ergül, A. ve Çalışkan, M., 1999. Türkiye'de Yetiştirilen Razakı Üzüm Çeşidi Ekotiplerinin Elektroforetik Tanımlanmaları Üzerinde Araştırmalar. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi: 389-394.
- Altube, H., Cabello, F. and Ortiz, J. M., 1991. Caracterization de Variedades y Portainjertos de vid Mediante Isoenzimas de los Sarmientos. Vitis, 30: 203-212.
- Arulsekhar, S. and Parfitt, D. E., 1986. Isozymes Analysis Procedures for Stone, Fruits, Almond, Grape, Walnut, Pistachio and ig. HortScience, 21 (4): 928-933.
- Boursiquot, J. M., et Parra, P., 1992. Application d'une Méthode d'électrophorese pour la Caractérisation et la Reconnaissance des Porte-greffe. Vitis, 31: 189-194.
- Calo, A., Costacurta, A., Paludetti, G., Calo, G., Arulsekhar, S. And Parfitt, D., 1989. The Use of Isozyme Markers to Characterize Grape Cultivars. Riv. Vitic. Enol., 1: 5-22.
- Çalışkan, M. ve Ağaoğlu, Y.S. 1998. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Çavuş Üzümü Tiplerinin Elektroferez Yöntemi ile Tanımlanmaları Üzerinde Bir Araştırma. 4. Bağcılık Sempozyumu: 152-158.-
- Çetiner, 1981. Türkiye Bitki Genetik Kaynakları Meyve Bağ Envanteri. Ege Bölge Zir. Araş. Enst. Yayınları. No 19.
- Galet, P., 1971. Precis d'Ampelographie Pratique. Montpellier.
- Kozma, P., Hangy, A. H. and Jhasz, O., 1990. Inheritance of Isoenzymes and Soluble Proteins in Grape Varieties and F₁ Hybrids. Proceedings of the 5 th. International Symposium on Grape Breeding: 134-141.
- Manzo, P. and Tamponi, G., 1987. Monografia di Cultivar di Uve Tavallo 1st. Sper. Per la Frut. Roma.
- Parfitt, D.E. and Arulsekhar, S., 1989. Inheritance and Isozyme Diversity for GPI and PGM Among Grape Cultivars. J. Am. Soc. Hort.Sci., 114 (3): 486-491.
- Samaman, L. G., and Wallace, D. H., 1981. Taxonomic Affinities of 5 Cultivars of *Vitis vinifera* L. As Aided by Serological Analysis of Pollen Proteins. J. Am. Soc. Hort. Sci., 106, (6): 804-809.
- Samancı, H. ve Uslu, İ., 1993. Türkiye'de Yetiştirilen Razakı Grubu Üzüm Çeşit ve Tiplerinin Ampelografik Özellikleri. Bahçe 22, (1-2): 47-55.
- Sarıkaya, İ., Uzun, H.İ. Uslu, İ. ve Samancı, H., 1996. Razakı Sinonimi Üzüm Çeşitlerinin Tane İzoenzimlerinden Tanısı Üzerinde Araştırmalar. Akd. Ün. Zir. Fak. Derg., 9: 21-39.
- Soltis, D.E., and Soltis, P.S., 1989. Polyploidy, Breeding Systems and Genetic Differentiation in Homosporous Pteridophytes. In Isozymes in Plant Biology: 241-259.
- Söylemezoğlu, G., Ağaoğlu, Y.S., Marasalı, B., Ergül, A., Çalışkan, M. ve Türkben, C., 1998. Üzüm Çeşitlerinin Yaprak Kökenli Kateşol Oksidaz (Co), Perksidaz (Per) ve Esteraz (Est) İzoenzimlerinden Yararlanılarak Tanımlanmaları. 4. Bağcılık Sempozyumu: 138-144.
- Sugiura, A., Tao, R. and Tomama, T., 1988. Distinguishing between Japanese Persimmon Cultivars (*Diospyros kaki* L.) by Means of Pollen Isozymes. Scientia Hort. 36: 67-77.
- Rohlf, F. J., 1987. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate System for IBMPC Microcomputures and Compatibles.
- Uzun, H.İ., 1986. Bazı Üzüm Çeşitlerinin Ampelografik Özellikleri, Kateşol Oksidaz İzoenzim Bantlarından Teşhisleri ve Sıcaklık Toplamları Üzerinde Araştırmalar. Ege Ün. Zir. Fakültesi. Doktora Tezi, İzmir.
- Uzun, H.İ. ve İter, E., 1993. Bazı Üzüm Çeşitlerinin Yapraklarındaki Peroksidaz ve Kateşol Oksidaz İzoenzimlerinden Teşhisi Üzerinde Araştırmalar. Ege Ü. Zir. Fak. Derg. 30, 3, 105-111.
- Uzun, H.İ. ve Sarıkaya, İ., 1996. Bazı Melez Üzüm Çeşitlerinde ve Ebeveynlerinde İzoenzim Bant Deseni Varyasyonları Üzerinde Araştırmalar. Akd. Ün. Zir. Fak. Derg., 9: 1-9.
- Weeden, N.F. and Wendel, J.F., 1989. Genetics of Plant Biology. (Edited by Soltis, D. and Soltis, P.S.): 46-72.
- Wolfe, W. H., 1976. Identification of Grape Varieties by Isozyme Banding Patterns. Am. J. Enol. Vitic., 27, (2): 68-73.