

## ***C.chacoense*, *C. pubescens* ve BU İKİ TÜRÜN FARKLI FORMLARININ İZOENZİM MARKÖRLERİ İLE TANILANMASI**

Yrd. Doç. Dr. A. Naci ONUS<sup>(1)</sup>

### **GİRİŞ**

İzoenzimler ko-dominant kalıtma sahip olmaları, epistatik özellik göstermemeleri ve çevresel koşullardan etkilenmeme gibi sahip oldukları bazı avantajlardan dolayı; bitki popülasyonları arasında genetik farklılaşmanın tespit edilmesinde, sistematik ile ilgili problemlerin çözümünde ve çeşit tanılanmasında oldukça uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

İzoenzimler *Capsicum* cinsi içerisinde beyaz ve mor çiçekli guruplar içerisinde yer alan türler arasında benzerlik ve farklılıkları ortaya koymak amacı ile de kullanılmışlardır (McLEOD ve ark., 1979, 1982, 1983).İzoenzim çalışmalarının sonunda morfolojik olarak farklı olan bu iki gurubun izoenzimik olarak da farklı oldukları ortaya konmuştur.

İzoenzimlerin katılımı ve izoenzimler ile bazı morfolojik markörler arasında linkage araştırmaları; *Capsicum* cinsi içersinde gen haritalarının ortaya çıkarılmasına önemli katkılar sağlamıştır (TANKSLEY, 1984; GONZALEZ de LEON, 1986; HAJITAM, 1988).

Akrabalık düzeyi uzak olan türler arasında yapılan melezlemeler çeşitli nedenlerden dolayı zor gerçekleşir. Bu tür melezlemelerde karşılaşılabilecek problemler döllenme öncesi veya sonrasında veya çimlenme sonrasında açığa çıkabilir. Türler arası melezlemelerde bazen kendilenme sonucu oluşmuş tohum ve hibrit tohum aynı meyve içersinde meydana gelebilir. Ayrıca emaskulasyon zorluklarından dolayı yine kendine tozlanmaya ilave olarak türler arası tozlanmada gerçekleşebilir(BERMAWIE, 1990; HAJI ITAM, 1988).

---

<sup>(1)</sup> Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü- ANTALYA

Ayrıca bazı hibrit bitkilerde hiçbir zaman çiçeklenme olayı gerçekleşmeyebilir. Karşılaşılabilecek tüm bu durumlarda türler arasında melezlemeden sonra elde edilen bitkilerin gerçek hibrit olup olmadıklarının belirlenmesi gerçekten zor bir durum olarak ortaya çıkabilir. İşte burada da izoenzimler hibritlerin teşhis edilmesinde son derece yararlı bir araç olabilir.

Birden fazla örneğin aynı anda analiz edilebilmesi ve analiz için yaprak, kök, polen, embiyo, endosperm ve tohum gibi farklı bitki dokularının kullanılabilmesi enzim elektroforezinin diğer önemli karakteristik özellikleridir.

Önceki yıllarda *Capsicum* üzerinde yapılan izoenzim çalışmaları, enzimleri kontrol eden genler arasında allelik kompozisyon farklılıklarını ortaya koymaya yardımcı olmuştur.

Bu yönde yapılan bir çalışmada HAJI ITAM (1988); üzerinde çalıştığı 17 enzim sistemi içersinde 10 farklı lokusta *C. baccatum* SA219 ve *C. cardenasii* SA268 türlerinin aynı allelik yapıya sahip olduklarını bildirmiştir.

BERMAWIE (1990) ve ONUS (1995) ise, *C. baccatum* SA219, *C. eximium* Hawkes 3860 ve *C. cardenasii* SA268 türlerenen 11 lokusta farklı allellere sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

GONZALEZ deLEON (1986) ise *C. baccatum* Hawkes 6489 ve *C. chinense* C 343 çeşitleri arasında 10 lokusta allelik farklılık bulmuştur.

Buna karşın araştırmacıların bulguları arasında bazı farklılıklarda mevcuttur. Örneğin HAJI ITAM (1988) *Acon-1* ve *Pgi-1* için *C. cardenasii* Sa268 türünün homozigot olduğunu bildirirken, BERMAWIE (1990) heterozigot olduğunu bildirmiştir.

Ayrıca Shikimate dehydrogenases enzimi için GONZALEZ deLEON (1986) ve HAJI ITAM (1988) 3 farklı bölgede enzim aktivitesi bildirirken BERMAWIE (1990) bunlara ilave olarak iki farklı bölgede daha enzim aktivitesi olduğunu bildirmiştir.

Diğer taraftan Phosphoglucose isomerase için HAJI ITAM (1988) *C. baccatum* SA219 ve *C. cardenasii* SA268 türleri için jel üstünde 3 bölgede enzim aktivitesi bildirdiği halde BERMAWIE (1990) ve ONUS (1995) sadece iki farklı bölgede enzim aktivitesi bildirmişlerdir.

Bu çalışma *Capsicum* cinsi içerisinde tür içi ve türleri arası varyasyonu

ortaya koymada enzim poliformizminin kullanılabilme olanaklarını ortaya koyabilmek için yapılmış olup elde edilen bulguların bitki sistematığı ve *Capsicum* ıslah üzerinde çalışan araştırmacılara faydalı olacağı düşünülmüştür.

## **MATERYAL VE YÖNTEM**

Araştırmada *C. chacoense* SA184, 185 ve BP 281 ile *C. pubescens* BP 43. 537 ve 541 bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Çalışmada nişasta yapay jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. 15-30 mg yeni çıkmış, taze yaprak materyali GONZALEZ deLEON (1985, 1986)'ya ekstraksiyon çözeltisi içerisinde kremi bir yapı almaya kadar iyice ezilmiştir. Ekstraktın içerisinde Whatman kromatografi kağıda ekstraktı tamamı ile absorbe edinceye kadar konmuş ve ekstraktın üzeri bir lamelle kapatılmıştır.

Araştırmada nişasta jelleri GONZALEZ deLEON (1985, 1986)'ya göre ekstraksiyondan bir gün önce hazırlanmış ve üzerine streç film kapatılarak oda sıcaklığında bekletildikten sonra ertesi gün ekstraksiyondan bir saat önce 4°C buzdolabına konmuştur.

Ekstraktı absorbe etmiş kromatografi jel üzerine yerleştirildikten sonra, elektroforez işlemi 4°C buzdolabında gerçekleştirilmiş ve kullanılan elektroforez tampon çözeltisine göre GONZALEZ deLEON (1985, 1986) tarafından belirlenen sürelerde sona erdirilmiştir.

Elektroforez işlemi sona erdikten sonra jel dilimlere ayrılmış ve Aconitases, Alanin aminopeptidase, Glycerate-2-dehydrogenases, Isocitrate dehydrogenases Phosphoglucomutase, Phosphoglucose isomerases, Shikimate dehydrogenases enzim sistemleri için boyanmıştır. 37°C ve karanlıkta gerçekleştirilen boyama işleminden sonra, jel dilimleri saf su ile 1-2 kez durulanmış ve %50'lik glycerol içerisinde fikse edildikten sonra band sayıları ve pozisyonları her bir türe göre kaydedilmiştir. Allel numaralandırmaları BERMAWIE (1990)'a göre yapılmıştır.

## **BULGULAR**

Üzerinde çalışılan enzim sistemlerinde türlere göre bant pozisyonları

Şekil 1'de verilmiştir.

**Aconitases (ACON)** için, jel üstünde iki farklı bölgede enzim aktivitesi tespit edilmiştir. **Acon-1** için **C. chacoense** SA184, 185, BP 281 formları arasında herhangi bir allelik varyasyon tespit edilmemiş ve her 3 formda *Acon-1*<sup>2</sup> allelini taşımışlardır. Bu bölgede *C. pubescens* BP43 ve 537, *C. chacoense*'nin farklı formları ile aynı allele sahip olurlarken, *C. pubescens* 541 farklılık göstermiş ve *Acon-1*<sup>3</sup> alleleline sahip olmuştur.

*Acon-2* için ise *C. chacoense*'nin farklı formları arasında herhangi bir varyasyon tespit edilememiş ve her üç formda *Acon-2*<sup>3</sup> allelini taşımışlardır. *C. pubescens*'in farklı formlarında yine kendi içlerinde herhangi bir varyasyon göstermezken, *C. chacoense*'nin formları ile farklı allele (*Acon-2*<sup>1</sup>) sahip olarak polimorfizm göstermiştir.

**Alanin Aminopeptidases (AAP)** enzimi için jel üzerinde tek bir bölgede enzim aktivitesi (tek gen lokusu) tespit edilmiştir. *C. chacoense*'nin farklı formları arasında herhangi bir varyasyon tespit edilmemiş ve her üç formda *Aap-1* alleleline sahip olmuştur. Diğer taraftan her üç *C. pubescens* formu ise *Aap-1*<sup>1</sup> alleleline sahip olarak *C. chacoense*'nin farklı formları ile varyasyon göstermiştir.

**Glycerate-2-dehydrogenases (G-2-DH)** enzim sistemi içinde yine tek gen lokusu tespit edilmiştir. *C. chacoense* ve *C. pubescens*'in değişik formları arasında herhangi bir varyasyon tespit edilmemiş olup her iki türün formları *G-2-dh1*<sup>3</sup> allelini taşımışlardır.

**Isocitrate dehydrogenases (IDH)** enzim sistemi için jel üzerinde tek bölgede aktivite tespit edilmiştir. Bu enzim sistemi içinde yine *C. chacoense* ve *C. pubescens*'in değişik formları herhangi bir polimorfizm göstermemiş ve her iki türün farklı formları *Idh-1*<sup>3</sup> alleleline sahip olmuşlardır.

**Phosphoglucosemutases (PGM)** enzim sisteminde jel üzerinde iki farklı bölgede enzim aktivitesi tespit edilmiştir. *Pgm-1*<sup>3</sup> için *C. chacoense* ve *C. pubescens*'in değişik formları arasında herhangi bir varyasyon gözlenmemiş olup, tüm formlar *Pgm-1* allelini taşımışlardır.

*Pgm-2* için ise *C. chacoense*'nin farklı formları arasında herhangi bir varyasyon tespit edilememiş ve her üç formda *Pgm-2*<sup>3</sup> alleleline sahip olmuşlardır.

Buna karşın *C. pubescens*'in farklı formları arasında ise polimorfizm tespit edilmiştir. *C. pubescens* BP43 ve 537 *Pgm-2*<sup>2</sup> alleline sahip olurken *C. pubescens* 541 *Pgm-2* alleline sahip olarak polimorfizm göstermiştir.

**Phosphoglucose isomerases (PGI)** enzim sistemi içinde jel üzerinde iki farklı bölgede enzim aktivitesi tespit edilmiştir. *Pgi-1* için *C. chacoense*'nin formları arasında herhangi bir varyasyon tespit edilmemiş ve her üç formunda *Pgi-1* alleline sahip olmuşlardır. *C. pubescens*'in farklı formları da kendi aralarında bir polimorfizm göstermemiş ve her üç formunda *Pgi-1* alleline taşınmışlardır.

*Pgi-2* için de yine *C. chacoense*'nin her üç formu arasında herhangi bir varyasyon tespit edilmemiş ve her üç formunda *Pgi-2* alleline taşınmışlardır. *C. pubescens*'in farklı formları arasında da herhangi bir varyasyon tespit edilmemiş ve her üç formunda *Pgi-2* alleline sahip olmuşlardır.

**Shikimate dehydrogenase (SKDH)** enzim sisteminin *C. chacoense* ve *C. pubescens*'in farklı formları üzerinde tek gen lokusu tarafından kontrol edildiği tespit edilmiş olup jel üzerinde tek bir bölgede enzim aktivitesi gözlenmiştir. Bu bölgede *C. chacoense* SA185 ve Bp281 *Skdh-1* alleline sahip olurken SA184 *Skdh-1*<sup>2</sup> alleline sahip olarak polimorfizm göstermiştir. *C. pubescens*'in her üç formu ise kendi aralarında herhangi bir varyasyon göstermemiş ve *Skdh-1*<sup>3</sup> alleline sahip olmuşlardır.

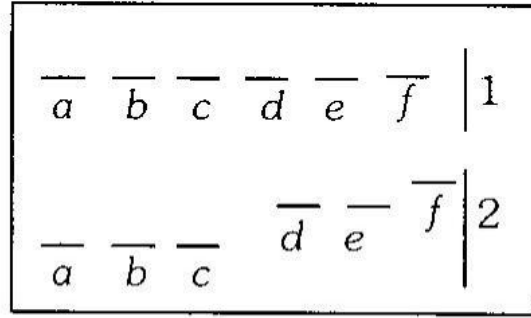
## TARTIŞMA

Üzerinde çalışılan toplam yedi enzim sisteminde on adet lokus tespit edilmiştir. *C. chacoense*'nin SA184, 185 ve BP 281 formları arasında dokuz lokusda herhangi bir polimorfizm tespit edilmemiş, sadece SKDH enzimi için SA184 diğer formlardan farklı bir allelik yapıya sahip olarak varyasyon göstermiştir.

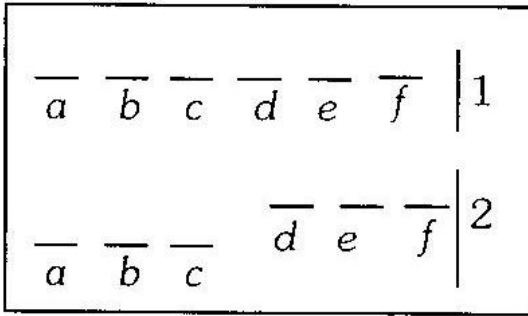
*C. pubescens*'in Bp43, 537 ve 541 formları 8 farklı lokusda hiçbir varyasyon göstermemişlerdir. Buna karşın 541 formu Acon-1 ve *Pgm-2* için diğer formlardan farklı bir allelik yapıya sahip olmuştur.

Bunlara karşın, *C. chacoense* ve *C. pubescens*'in her üç formu üç farklı lokusda hiçbir polimorfizm göstermeyip aynı allelik yapıya sahip olurken, yedi farklı lokusda polimorfizm göstermişlerdir.

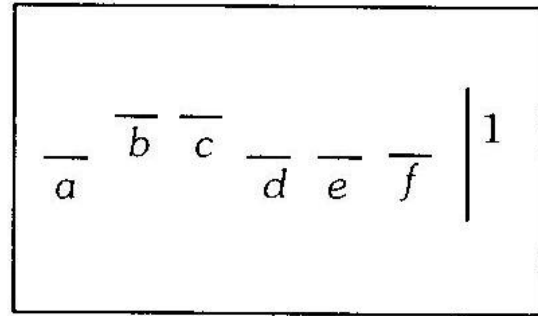
PGM



PGI

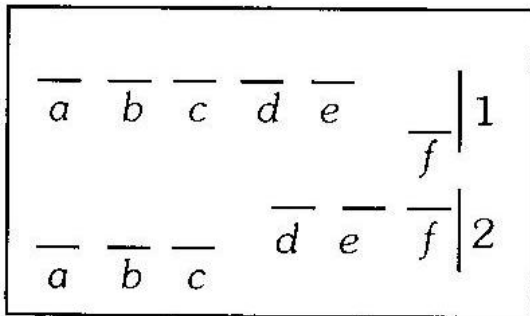


SKDH

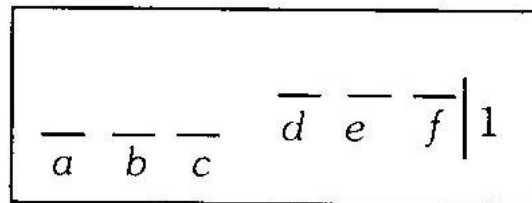


**Şekil 1:** Üzerinde çalışılan enzim sistemlerinin türlere göre şematik diagramları. **a:** *C. chaconese* 184, **b:** *C. chaconese* 185, **c:** *C. chaconese* BP281, **d:** *C. pubescens* BP43, **e:** *C. pubescens* 537, **f:** *C. pubescens* 541.

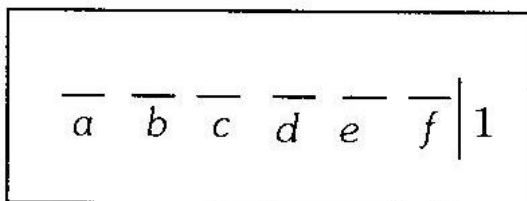
ACON



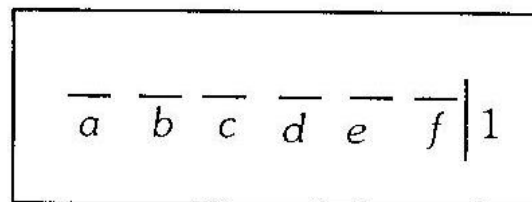
AAP



G-2-DH



IDH





Yakın akraba olan populasyonlar arasında düşük oranda genetik varyasyon gözlenebilir. Bu nedenle yakın akraba olan türler arasında benzerlik gösteren genlerinin oranının, uzak akraba olan türlerin sahip olduğu benzer gen oranlarından daha fazla olması beklenir. *C. chacoense* ve *C. pubescens* türlerinin kendi içlerinde farklı formları arasında yok denecek kadar düşük varyasyon elde edilmesi son derece doğal kabul edilebilir ve bu mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar bu beklenti ile uyum içerisindedir. Benzer şekilde *C. chacoense* ve *C. pubescens* türleri arasında da, tespit edilen on farklı lokusdan yedisinde polimorfizm bulunması uzak akraba oldukları düşünülen bu iki tür arasında beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Üzerinde çalışılan her üç *C. chacoense* ve *C. pubescens* formlarının hepsi homozigot olarak tespit edilmiş olup, lokusların herhangi birinin hiçbir formda heterozigot yapı tespit edilmemiştir. Bunun sonucun nedeni olarak ise, bu çalışmada kullanılan her iki türün formlarının birden fazla generasyon boyunca aynı sera içerisinde yetiştirilen bitkilerden elde edilmiş olmasının bitkilerin yabancı döllenme olasılığını oldukça azalttığı ve bu durumun homozigotluğu artırıp heterozigotluğu ortadan kaldırdığı düşünülmüştür.

Bu araştırmada kullanılan bitkilerin elde edildiği tohumların bir veya birden fazla ana bitkiden elde edildiği ve eğer birden fazla bitkiden fazla elde edildiyse bunun toplam kaç bitki olduğu tam olarak bilinmediğinden dolayı, bu iki tür her iki türün farklı formları arasında tespit edilen varyasyonlar, bu türlerin anavatanı olan Güney Amerika'da orjinal populasyonlarda mevcut olan gerçek varyasyonu yeterince yansıtmıyor olabilir. Bu nedenle, mevcut araştırmada elde edilen sonuçları değerlendirirken bu durumun dikkate alınması gerekir.

Elde edilen bu bulgulardan çıkarılan sonuç, belirli sayıda enzim sistemi ile çalışıp sınırlı sayıda farklı lokus tespit edilmiş olmasına rağmen, izoenzimler markör olarak tür içi varyasyonu ortaya koymada yetersiz gibi görünürken, türler arası varyasyonun açığa çıkarılmasında daha güçlü markörler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Burada belirtilmesi gereken önemli noktalardan biride çalışılan sınırlı sayıdaki enzim sisteminin toplam 12 kromozomdan oluşan *Capsicum* genomunun ancak sınırlı bir kısmının üzerinde bulunabileceğidir.

Bu nedenle genomun geriye kalan kromozomları üzerinde bulunan varyasyon büyük bir olasılıkla tespit edilmemiştir. Bu nedenle tüm *Capsicum* genomunu kapsayacak şekilde diğer markörlerinde kullanımı gerek tür içi gerekse türler arası varyasyonu ortaya koymada daha gerçekçi sonuçları karşımıza çıkarabilir. Bu anlamda fazla sayıda olan DNA markörleri bu tür çalışmalarda son derece yararlı birer araç olabilir.

## ÖZET

İzoenzimler bitki populasyonları arasında genetik farklılaşmanın tespit edilmesinde, sistematik ile ilgili problemlerin çözümünde ve çeşit tanımlanmasında uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu çalışmada da *Capsicum* cinsi içerisinde tür içi ve türler arası varyasyonu ortaya koymada enzim poliformizminin kullanılabilme olanaklarını ortaya koyabilmek için yapılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre izoenzimler markör olarak tür içi varyasyonu ortaya koymada yetersiz gibi görünürken, türler arası varyasyonu ortaya koymada daha etkili markörler olarak karşımıza çıkmıştır.

## SUMMARY

Isozymes have been used for a long time to reveal the genetic differences between populations, to solve the problems related to taxonomy, and to identify cultivars. This study was conducted to reveal the possibilities of using isozyme polymorphism to show the intra-and interspecific variation between different *Capsicum* species. Experiment results showed that while the isozyme analysis is rather not strong enough to reveal the intraspecific variation, it can be used to reveal the interspecific variation.

## KAYNAKLAR

- BERMAWIE, N., 1990.** Isozymic variability and barriers to hybridisation between *C. chacoense* and two purple flowered species (*C. pubescens* and *C. tovarii*). Ph.D. Thesis, University of Reading
- GONZALEZ DeLEON, D.G., 1985.** A horizontal starch gel electrophoresis (A Laboratory Guide). Dept. of Agric. Bot., University of Reading



- GONZALEZ DeLEON, D.R., 1986.** Interspecific hybridisation and the cytogenetic architecture of two species of chili pepper (*Capsicum -Solanaceae*). Ph.D. Thesis, University of Reading
- Haji ITAM, K., 1988.** Studies on the relationship and barriers to hybridisation between purple flowered *C. cardenasii* and white flowered *C. baccatum*. M.Phil.Thesis, University of Reading
- McLEOD, M.J., W.H., ESHBAUGH, S.I., GUTMAN, 1979.** A preliminary biochemical systematic study of the genus *Capsicum*. In: The biology and taxonomy of the solanaceae (Eds. J.G. Hawkes, R.N. Lester and A.D. Skelding), *Linnean Society Symposium Series No,7*, pp. 701-714. Academic Press, London
- McLEOD, M.J., S.I., GUTMAN, W.H., ESHBAUGH, 1983.** An electrophoretic study of *Capsicum (Solanaceae)*: the purple flowered taxa. *Bull. Torrey Bot. Club*, 106: 326-333
- MCLEOD, M.J., S.I., GUTMAN, W.H., ESHBAUGH, 1983.** Peppers (*Capsicum*). In: *Isozymes in plant genetics and breeding* (Eds. S.D. Tanksley and T.J. Orton) Part A, pp. 3-13. Elsevier, Amsterdam
- ONUS, A.N., 1995.** Unilateral incompatibility in *Capsicum*. Ph.D. Thesis, The University of Reading.
- TANKSLEY, S.D., 1984.** Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma (Berl.)* 89: 352-360