

TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI SOFRALIK VE ŞARAPLIK ÜZÜM ÇEŞİTLERİNİN İZOENZİMLERDEN YARARLANILARAK TEŞHİSLERİ

DETERMINATION OF SOME TABLE AND WINE GRAPE VARIETIES GROWN IN TURKEY BY ISOENZYME IDENTIFICATION

Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, - Ankara

ÖZET: Asma tür ve çeşitlerinin teşhisinde kullanılan morfolojik özellikler çok büyük oranda çevre faktörleri ve incelenen dokunun yaşı gibi faktörler tarafından etkilendiğinden, fenotipte oldukça büyük bir varyasyona sebep olmaktadır. İşte bu nedenle, bu çalışmada üzüm çeşitlerinin olgun tanelerinden elde edilen enzimlerin elektroforetik olarak ayrımları amaçlanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan üzüm çeşitleri, ticari önem durumu ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama bağındaki uygunluk durumlarına göre seçilmiştir.

Türkiye'de yetiştirilen sofralık ve şaraplık 14 üzüm çeşidinin 2 farklı enzim sisteminde izoenzim bantları poliakrilamid jel elektroforez tekniği ile belirlenmiştir. Enzim kaynağı olarak olgun taneler kullanılmıştır. Enzim bantları her enzim sistemi için kullanılan boya ilaveli buffer çözeltisi içerisinde jel'in enzim aktivitesi bulunan kısmının boyanması sonucu belirlenmiştir. Çeşitlerin ayrımı amacıyla Catechol Oksidase (CO) ve Esterase (EST) enzim sistemleri kullanılmıştır.

Araştırma sonucunda bu enzim sistemlerinin herikisinin de çeşitlerin teşhisinde oldukça etkili oldukları tespit edilmiştir.

ABSTRACT: For both grape species and varieties, the morphological characters used for description are often strongly influenced by environmental factors and tissue age, resulting in large variations in phenotype. For these reason, it was decided to use electrophoretic separation of isozymes from ripe berries of grape varieties.

In this research, varieties were chosen because of their commercial importance and their availability at the Ankara University, Agricultural Faculty, Research and Experimental vineyard.

Enzyme banding patterns for 14 varieties of wine and table grapes were determined by polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymes were extracted from ripe berries of each variety. Enzyme bands were detected by developing the gels in a buffered solution that produced an insoluble dye at the site of enzyme activity.

The varieties were assayed for Catechol Oksidase (CO) and Esterase (EST). Both enzymes were found quite useful for distinguishing varieties.

GİRİŞ

Bir çok araştırmacıya göre kültür asmasının (*Vitis vinifera L.*) ana vatanı Karadeniz'in doğusu ile Hazar denizi arasında kalan bölgedir. Kültür asma Vitaceae familyasının Vitis cinsi içerisinde yer alan 32 türün en önemlisidir. Dünyada halen yetiştiriciliği yapılan üzüm çeşitlerinin % 90'ını *V. vinifera L.* türüne ait çeşitler veya bunlar arasındaki melezler ile az sayıda olmak üzere bu tür ile bazı Amerikan tür ve çeşitleri arasındaki melezler oluşturmaktadır (WEAVER, 1976).

Yunanca'da ampelos (asma) ve graphe (tanımlama) sözcüklerinin birleşiminden meydana gelen ampelografi, asma tür ve çeşitlerinin tanımlanması, sınıflandırılmasını konu olan bilim dalıdır (ORAMAN, 1959). Dünyada ampelografinin terim olarak ortaya çıkışı ve bağıcılığın yapıldığı ülkelerde ampelografik çalışmaların başlangıcı XVII. yüzyıla kadar uzanmaktadır. Bundan sonra, dünya üzerinde bağıcılık yapılan ülkelerde, bir yandan asma gen potansiyelinin ortaya çıkarılması ve korunması, diğer yandan mevcut populasyon içinden farklı değerlendirme amaçlarına en uygun standart üzüm çeşitlerinin seçilmesi amaçlarına yönelik olarak, birbiri ardına yapılan çok değerli araştırmalar ile ampelografik çalışmalar günümüzde de sürdürülmektedir.

Asmanın ve bağcılık kültürünün anavatanı olarak kabul edilen ve bağcılık için son derece elverişli iklim koşullarına sahip olan ülkemiz, çok geniş bir çeşit ve tip zenginliğine, dolayısıyla büyük bir asma gen potansiyeline sahiptir.

Ülkemiz bağcılığının geliştirilmesi ve milli ekonomiye olan katkısının daha yüksek düzeye ulaştırılması, herşeyden önce sahip olduğumuz asma gen potansiyelinin belirlenmesi, korunması ve değerlendirilmesine yönelik olarak yapılan çalışmalara, gereken önemin verilmesiyle mümkündür.

Ülkemizin asma gen potansiyelinin belirlenmesi amacı ile değişik bölgelerimizde yetiştiriciliği yapılan üzüm çeşitlerinin tanımlanmasına yönelik bilimsel çalışmalar, 1933-1937 yılları arasında başlanmış ve sonraki yıllarda önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmaların sonucunda, ülkemizin tüm yöreleri taranarak saptanan 1253 üzüm çeşidinden 1200 tanesi Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsünde oluşturulan "Milli Koleksiyon Bağı"na aktarılmış ve bu çeşitlerin ampelografik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara başlanmıştır. Diğer taraftan, üzüm çeşitlerimizin kendi ekolojilerinde korunması ve bunlar arasından üstün nitelikli yeni standart üzüm çeşitlerinin seçilmesi amacıyla "Bölgesel Koleksiyon Bağları"nın oluşturulması yönündeki çalışmalar da sürdürülmektedir (ANONYMOUS, 1985).

Dünya üzerinde bağcılık yapan bütün ülkelerde, mevcut çeşitlerin ya da ıslah edilen yeni çeşitlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında günümüze kadar değişik araştırmacılarca farklı yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir.

Ampelografik çalışmalarda yöntem birliği sağlamak amacıyla "Uluslararası Bitki Gen Merkezi" (International Board For Plant Genetic Reseources-IBPGR) adına oluşturulan ve dünyanın bağcılık alanında tanınmış bilim adamlarının görev aldığı bir çalışma grubu tarafından, "Uluslararası Bağcılık ve Şarapçılık Ofisi" (Office International de la vigne et du Vin-OIV) ve "Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerinin Korunması Birliği" (International Union For the Protection of New Varieties of Plants-UPOV) ile işbirliği yapılarak gerçekleştirilen çalışmaların sonucunda hazırlanan ve geliştirilen normlar, 1983 yılında "Üzüm Tanımlayıcılar" (Descriptors for Grape) adı altında yayınlanmış ve 2000 yılında daha ayrıntılı hale getirilmiştir. (ANONYMOUS, 2000).

Bununla birlikte, bu tür çalışmalarda üzüm çeşitlerinin teşhisinde genellikle morfolojik özelliklerden yararlanılmaktadır. Bitkilerin morfolojik özellikleri ise çevre şartlarının etkisiyle değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca çeşitlerin teşhisi, çevre şartlarının bu modifikasyon etkisi yanında, karar veren kişilere göre de değişebildiğinden, tür ve çeşitlerin kesin teşhisine yardımcı olacak bir nev'i parmak izi gibi kesin sonuç verecek çalışmalara büyük önem verilmiştir. Bunun bir sonucu olarak 2000 yılında yenilenen "Descriptors for Grape" moleküler markörler ayrı bir chapter olarak ilave edilmiştir.

Üzüm çeşitlerinin teşhisinde RICE (1964), üzüm suyundaki antosiyaninleri spektrofotometrik ve kromatografik olarak incelemiş, RAPP ve ark. (1978), üzüm suyu ve şaraplarda mevcut 400 çeşit aromatik bileşikten faydalanmıştır. Fakat bu çalışmalarda incelenen maddeler de çevre koşullarının etkisiyle farklılık gösterebileceğinden, kesin teşhis sağlamada çeşitlerin doğrudan genotipini yansıtacak çalışmalar daha büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan metod jel elektroforez ve izoelektrik fokuslama yöntemleridir. Bu metodlarda enzim ve proteinler, nükleotid zincirlerinin net elektostatik yüklerindeki farklılıklara bağlı olarak incelenir. Poliakrilamid ve nişasta jel elektroforezinde elde edilen protein ve izoenzim bant desenlerinden genetik farklılıklar belirlenebilmektedir. Böylelikle bir organizmanın fenotipine bakılmaksızın, genotipi hakkında bilgi edinilebilir (WOLFE, 1977).

Tür ve çeşitlerin ayırt edilmesi amacıyla turuncgiller (PROTOPAPADAKIS, 1987), Muz (BONNER ve ark. 1974), Pekan cevizi (MIELKE ve WOLFE 1982), Üzüm (SCHWENNESEN ve ark. 1982, WEEDEN ve ark. 1988, WOLFE 1976, 1977), Armut (SANTAMOUR ve DEMUTH 1980), Domates (BUTTON ve ark. 1976), Çilek (BRINGHURST ve ark. 1981), Gül (KUHNS ve FRETZ 1978), Bezelye (SIEGEL ve GALSTON 1967), Tütün

(SMITH ve ark. 1970) ve Mısırdaki (HAMILL ve BREWBAKER 1969) izoenzimlerden, Buğday (BUSHUK ve ZILLMAN 1978) ve Şeftalide (CARTER ve BROCK 1980) proteinlerden yararlanılmıştır.

Bitki dokularından yüksek aktiviteye sahip olan enzimlerin ekstrakte edilebilmesi için, ortamların çok dikkatli bir şekilde ve doğru olarak hazırlanması gerekmektedir. Özellikle fizyolojik olayların enzim aktivitesine dayanarak incelenmesinde bu daha büyük bir önem taşımaktadır (ANDERSON 1968). Bu gibi çalışmalarda örnek alınan dokuların da benzer olması gerekir. Aksi takdirde çeşitli dokular ve hatta tek bir organ bile gelişme süresi boyunca farklı enzim aktivitesi veya değişik izoenzim bant desenleri gösterebildiğinden yanıltıcı sonuçlar ortaya çıkar (HAWKER 1969; PERUFFO ve PALLAVICINI, 1975).

MUKINEN ve MACDONALD (1968), tek yıllık bitkilerin çoğunda ve polen gibi tanen içermeyen bitki organlarından enzim ve protein ekstraksiyonlarının oldukça iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Buna karışın asma gibi çok yıllık odunsu bitkilerin yüksek düzeyde fenol ve oksidatif enzimler içermelerinden dolayı enzim ekstraksiyonu için koruyucu işlemlere gerek olduğunu da bildirmişlerdir. RHODES (1977) ise, bitkilerin enzimleri izole etmekte karşılaşılan problemleri ve bu konuda kullanılan teknikleri ayrıntılı bir şekilde incelemiştir. Enzim ekstraksiyonunda ana sorun fenollerdir. Fenollerin enzimatik oksidasyonu sonucu bitki doku ekstraktlarının kararmasını katalize eden enzim Kateşol oksidazdır (HAREL ve ark. 1964).

Fenol oksidasyonunun ilk ürünü O-kinonlardır (POUX, 1966). Kinonlar, stabil olmayıp polimerize olarak yüksek moleküllü kahverengi pigmentleri oluşturmaktadır ve hemen amino asitler, peptidler ve proteinlerle reaksiyona girmektedirler. Kinonlar, enzim proteinleriyle de reaksiyona girmek suretiyle enzimi inaktif hale getirirler. Bu olumsuz etkiyi ortadan kaldırmak üç şekilde mümkündür. Bunlardan birincisi fenollerin uzaklaştırılmasıdır. İkinci yol kateşol oksidaz aktivitesinin engellenmesidir. Üçüncü yol ise kinonun tekrar o-difenol haline indirgenerek uzaklaştırılmasıdır (ANDERSON, 1968).

LOOMIS (1964), fenollerin düzeyinin tür ve çeşitlere bağlı olması yanında, yetiştirme şartlarının da bir sonucu olduğundan enzim ekstraksiyonunda kullanılan herhangi bir işlemin tüm bitkilerde aynı etkin sonucu vermeyebileceğini bildirmiştir. Bu nedenle izolasyon teknikleri bitki türlerine, fizyolojik durumuna ve (ekstraksiyon) izole edilen enzim sisteminin değişkenliğine bağlı olduğunu söylemek mümkündür.

Asmanın birçok organlarından enzim elde etmek için değişik metodlar kullanılmaktadır. MEYNHART (1965), PEG, Cystein ve Potasyum klorür içeren Tris-HCl tampon çözeltisinde olgun üzüm tanelerini parçalayarak dekarboksilik asit sentezinde etkili enzimleri ekstrakte etmiştir. HAWKER (1969), pH'sı 8.5 olan borat tampon çözeltisinde karbovaks 4000 kullanarak suda çözünmeyen invertazı ekstrakte etmiştir. SCHAEFER (1971) ise, asma yapraklarından enzimleri ekstrakte etmede bir çok polimer ve indirgen maddeyi denemiş ve bunlar arasından PEG ve asorbik asidin Tris (pH: 7-8), de oksikolat, tetraborat, sodyum klorür ve EDTA ile kombinasyonunun en iyi sonuç verdiğini bildirmiştir.

Günümüze dek üzüm çeşitlerinin elektroforez tekniği ile teşhisi üzerinde yurt dışında bir çok araştırma yapılmıştır. Yapılan bu araştırmaların büyük çoğunluğunda nişasta-jel, poliakrilamid jel elektroforez teknikleri kullanılarak farklı enzim sistemleri incelenmiş ve izoenzim bant desenleri belirlenmiştir.

WOLFE (1976), 60 sofralık ve şaraplık üzüm çeşidinde nişasta jel elektroforez tekniği ile Leucine aminopeptidase (LAP), Indophenol oxidase (IPO), Acid phosphatase (AcPh), Catechol oxidase (CO) Alcohol dehydrogenase, (ADH), Esterase (EST) ve Peroxidase (PER) enzim sistemlerini incelemiş ve bu 60 çeşide ait izoenzim bant desenlerini belirlemiştir. Yapmış olduğu bu çalışmada ayrıca LAP, IPO, CO ve AcPH enzim sistemlerinin çeşitlerinin ayırımında en uygun sistemler olduğunu belirtmiştir. SCHWENNESEN ve ark. (1982) ise, çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin kateşol oksidaz, peroksidaz, esteraz, asit fosfataz, alkol dehidrogenaz, indophenol oxidase leucine aminopeptidaz, glutamate oxalacetate transaminase ve malik enzim sistemlerini kullanarak yapmış oldukları çalışmada AcPH, EST, ADH, IPO ve LAP dışındaki enzim sistemlerinin aynı bant desenini verdiklerini tespit etmişlerdir.

STAVRAKAKIS ve LOUKAS (1983), tür içi ve türler arası genetik varyasyonu belirleyebilmek amacıyla 37 üzüm çeşidinde 11 farklı enzim sistemini PEP (Peptidase), PGM (Phosphoglucomutase), EST (Esterase), TO (Tetrazolium oxidase), a-GPD (a-glycerophosphate dehydrogenase), ICD (Isocitrate dehydrogenase), FH (fumarase), LAP (Leucine aminopeptidase), ALD (Aldolase), GPI (Glucose phosphate isomerase) ve ME (malik enzim)'i incelemişler ve bu enzim sistemleriyle çeşitler arasındaki farklılığı ortaya koymuşlardır. Weeden ve ark (1988) ise, Cayuga White ve Aurore melezleri arasındaki genotipik farklılığı 8 farklı enzim sistemi kullanarak belirleyebilmiştir.

PARFITT ve ARULSEKAR (1989) ise, üzüm çeşitleri arasındaki farklılıkları GPI ve PGM enzim sistemlerinde nişasta-jel elektroforez yöntemiyle belirlemeye çalışmışlardır. Bunlardan 24 çeşit bu iki enzim sistemi yönünden aynı bant desenini vermişlerdir.

ERIAS-DIAS ve ark.'da (1989) Portuguese çeşidinin 5 tipini GOT, α ve β -esteraz ve AcPH enzimleriyle belirlemeye çalışmışlar, araştırma sonucunda α ve β -esterase enzim sisteminin bu amaca uygun enzim sistemi olduğunu tespit etmişlerdir.

ÇALIŞKAN ve AĞAOĞLU (1998) ülkemizde Çavuş üzüm çeşidi adı altında yetiştiriciliği yapılan 21 Çavuş üzüm tipi veya sinonimleri arasındaki genetik farklılıkları, 5 farklı enzim sistemi aracılığıyla izoenzim bant desenlerinin çıkarılmasıyla belirlemeye çalışmışlardır. Araştırma sonucunda, 5 enzim sistemi yardımıyla Pembe Çavuş (16) ve Pembe Çavuş (48) tipleri hariç, 19 tipin kullanılan enzimler bakımından farklı bant desenlerine sahip oldukları ve tipler arasındaki farklılıkların teşhisi amacıyla özellikle CO, PER ve EST enzim sistemlerinden yararlanılabileceği belirlenmiştir.

AĞAOĞLU ve ark.(1999)' da Türkiye'de yetiştirilen Razakı üzüm çeşidine ait 14 tipin yada sinonimin arasındaki genetik farklılıkların CO, PER, AcPH, ve EST enzim sistemleri aracılığıyla belirlenmesi amacıyla yapmış oldukları çalışmada, EST enzim sisteminin tüm Razakı tiplerinin ayırımını sağladığını ve sözkonusu olan bu tiplerin birer çeşit olarak tanımlanabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, ülkemizde yetiştirilen bazı sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinin PAGE yöntemi ile iki enzim sistemi kullanılarak izoenzim bant desenlerinden yararlanılarak tanımlanmaları amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada Alphonse Lavallée, Razakı, Hamburg, Misketi, Sultani Çekirdeksiz, Hasandede, Hafzali, Emir, Pinot noir, Cardinal, Semillon, Çavuş, Riesling, Papazkarası ve Gülüzümü üzüm çeşitleri kullanılmıştır.

Metod

Çalışmada kullanılan üzüm çeşitlerinin tanelerinden enzim ekstraksiyonu için WOLFE (1977) ile ARULSEKAR ve PARFITT (1986)'in yöntemleri karşılaştırılarak denenmiş ve nispeten daha iyi sonuç veren ARULSEKAR ve PARFITT (1986)'in ekstraksiyon metodu bu çalışmada kullanılmıştır.

Optimum olgunluk döneminde hasat edilen üzümler 0°C ve % 90-95 nispi nem koşullarında denemeye alınacakları zamana dek soğuk hava deposunda muhafaza edilmişlerdir.

Enzim ekstraksiyonu: Her çeşitten 2 gr üzüm tanesi alınıp, jiletle ufak parçalara ayrıldıktan sonra üzerine 1 gr PVPP ile 12 ml soğuk ekstraksiyon buffer'i (0.05 M Tris base 0.007 M Citric acid (monohydrate), % 0.1 Cysteine-HCl, % 0.1 Ascorbik asit (Na tuzu ya da serbest asit olarak), PEG (4000 MW) ve 1 μ M mercaptoethanol, pH: 8.0), ilave edildikten sonra ultra-turrax homojenizatörde 15-20 sn 18000 rpm'de parçalanmıştır. Homojenize edilen örnekler süzildükten sonra (0)-(+4)°C arasında olan buzlu bir kap içerisinde santrifüj işlemine dek bekletilmişlerdir. Süzülen örnekler 2 ml'lik ephendorf tüplerine konularak 14000 rpm'de

15 dakika süreyle 2°C'de santrifüj edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda tüp içerisindeki berrak sıvı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Elektroforez aşamasına dek ekstrakte edilen örnekler -20°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.

Poliakrilamid Jel Elektroforez Tekniğinin Uygulanışı:

PAGE yöntemi DAVIS (1964)'ten modifiye edilmiştir. Buna göre resolving jel, staking jel ve elektrot buffer çözeltisinin konsantrasyonları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada Kullanılan PAGE Yönteminde Hazırlanan Resolving jel, Stacking jel ve Elektrot Buffer Çözeltisinin İçerikleri

Resolving Jel	Stacking Jel	Elektrot Buffer'i
Acylamide/bisacrylamide (30:1.5) : 24 ml	Acylamide/bisacrylamide (30:1.5) : 3.37 ml	0.05 M Tris
0.25 M Tris-glycine pH: 8.8 : 16 ml	0.75 M Tris-HCl pH: 6.8 : 1.25 ml	0.038 M Glycine
Amonium persulfate % 1.5 : 4.4 ml	Amonium persulfate % 1.5 : 1.37 ml	pH: 8.3
Trion X-100 %10 : 0.24 ml	Saf su : 25 ml	
Saf su : 80 ml	TEMED : 12.5 µl	
TEMED : 40 µl		

Elektroforez koşulları: Elektroforez işlemi amacıyla BIO-RAD Protean Xi-II tip dikey elektroforez aleti kullanılmıştır. Elektroforez işlemi +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Örneklerin jele yüklenmesinden sonra (yaklaşık 30 dakika) bromofenol-glycine karışımı yüklenen enzim örnekleri yüklendikleri cepten stacking jelin alt kısmına geçene kadar 100 volt, bu aşamadan sonra resolving jele geçene dek 150 volt ve resolving jele geçtikten sonra ise 350 voltta elektroforez işlemine devam edilmiştir.

Enzim Bantlarının Boyanması, Değerlendirilmesi ve Teşhis Amacıyla Kullanılan İzoenzimler:

CATECHOL OXIDASE (CO):

300 mg Catechol

50 mg P-phenylenediamine

100 ml 0.1 M Acetate buffer (pH: 4.2)

60 dakika süre ile elektroforezden sonra jeller 37°C'lik etüvde bu çözeltide tutularak boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama işleminden sonra Rf değerleri;

$$R_f = \frac{\text{Bandın orijinden uzaklığı}}{\text{Çözeltinin orijinden uzaklığı}}$$

formülüne göre hesaplanmıştır.

ESTERASE (EST):

100 mg a-napthyl acetate

2 ml acetone

100 mg Fast Blue RR salt

100 ml Phosphate buffer (pH: 6.5)

30-60 dakika 37°C'deki etüvde boyama gerçekleştirilmiştir.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmada incelenen sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerine ait kateşol oksidaz (CO) izoenzim bantları ve bunların Rf değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelge 2'nin de incelenmesinden de anlaşılacağı üzere bir çeşitten en fazla 6, en az 4 CO izoenzim bandı saptanmıştır. En az izoenzim bandı saptanan çeşitler Hamburg Misketi, Hasandede ve Gülüzümüdür. En fazla izoenzim bandı belirlenen çeşitler ise Sultani Çekirdeksiz ve Emir'dir. Toplam bant sayısı hiçbir çeşitte 4'ten az ya da 6'dan fazla değildir. Bununla birlikte aynı bant sayısına sahip olan çeşitlerde Rf değerleri arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Bu durum ise bize araştırmaya alınan çeşitlerin birbirlerinden ayırımında oldukça önemli bir avantaj sağlamaktadır.

WOLFE (1976)'de yapmış olduğu çalışmada 0.18 ile 0.43 Rf değerleri arasında incelemiş olduğu çeşitlerde 3 ila 5 kateşol oksidaz bandı tespit edebilmiştir. SCHWENNESEN ve ark (1982) de, çekirdeksiz üzüm çeşitlerinde 3 ila 6 kateşol oksidaz izoenzim bandı tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada incelenen ikinci enzim sistemi Esterase'dir. Bu sistemde üzüm çeşitlerinin tanelerinde EST'in anot yönünde hareket eden en az 5, en fazla 9 izoenzim bandına rastlanmıştır. Aynı bant sayısına sahip olan Riesling, Gülüzümü, Semillon, Cardinal ve Sultani Çekirdeksiz gibi üzüm çeşitleri bantların Rf değerlerinin farklı olmalarından dolayı rahatlıkla birbirlerinden ayrılabilmişlerdir (Çizelge 3). Esterase bantlarının skorlanması enzimatik aktivitenin zayıf olması nedeniyle oldukça güç yapılabilmektedir.

WOLFE (1976)'da, üzüm çeşitlerinin ayırımında EST enziminde Rf değerinin çeşitlere göre 0.10 ila 0.78 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bizim çalışmada da, Rf değerleri 0.05 ila 0.74 arasında bir değişim göstermiştir. STAVRAKAKIS ve LOUKAS (1983), 38 üzüm çeşidinde esteraz enzim sistemini kullandıklarında 23 farklı bant grubunun (pattern) olduğunu belirlemişlerdir. Yapmış olduğumuz bu çalışmaya bakıldığında 13 farklı bant grubunun olduğu görülmektedir (Çizelge 3). Bu da bize esteraz enzimi ile çeşitleri rahatlıkla ayırabilmemizi sağlamaktadır.

Çizelge 2. Araştırmada Kullanılan Üzüm Çeşitlerinde Kateşol Oksidaz (CO) İzoenzim Bantları ve Bunların Değerleri

ÇEŞİTLER	0.16	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.22	0.23	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.31	0.32	0.34
Alphonse Lavallée	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Razakı	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Hamburg Misketi	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Sultani Çekirdeksiz	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Hasandede	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Hafızali	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Emir	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Pinor noir	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Cardinal	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Semillon	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Çavuş	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Riesling	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Papaz karası	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Gülüzümü	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

+: İzoenzim bandı var.

-: İzoenzim bandı yok.

Çizelge 3. Araştırmada Kullanılan Üzüm Çeşitlerinde EST İzoenzim Bantları ve Bunların Rf Değerleri

ÇEŞİTLER	0.05	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.15	0.17	0.19	0.20	0.26	0.32	0.34	0.35	0.36	0.37	0.38	0.39	0.40	0.41
Alphonse Lavallée	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Razakı	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamburg Misketi	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sultani Çekirdeksiz	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hasandede	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hafızali	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Emir	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pinor noir	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardinal	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Semillon	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Çavuş	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riesling	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Papaz karası	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gülüzümü	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ÇEŞİTLER	0.43	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.51	0.53	0.54	0.55	0.56	0.57	0.58	0.61	0.62	0.63	0.67	0.70	0.74
Alphonse Lavallée	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Razakı	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hamburg Misketi	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sultani Çekirdeksiz	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hasandede	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hafızali	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Emir	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pinor noir	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardinal	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Semillon	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Çavuş	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riesling	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Papaz karası	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gülüzümü	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sonuç olarak bağcılık kültürünün ana vatanı olan ülkemizde gen kaynaklarının korunması ve ülkemizin asma gen potansiyelinin ortaya çıkarılması yönünde bu kapsamda ve bu yöntemle ülkemizde yapılan ilk araştırmalardan biri olma özelliğini taşıyan ve TÜBİTAK tarafından desteklenen (TOGTAG-1321) bu çalışmanın farklı enzim sistemleri kullanılarak ve ülkemizde yetiştirilen tüm standart üzüm çeşitlerimiz dahil edilerek geliştirilmesi gerekmektedir. Bundan sonraki çalışmalarımız bu yönde olacaktır. Ayrıca bu projede elde edilen sonuçlar, asma'da iki farklı enzim sisteminde (CO, EST) ve PAGE tekniği ile çalışacak olan araştırmacılara oldukça önemli bir temel kaynak oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

- AĞAOĞLU, Y.S., SÖYLEMEZOĞLU, G. ÇALIŞKAN, M. ve ERGÜL, A. 1999. Türkiye'de Yetiştirilen Razakı Üzüm Çeşidi Ekotiplerinin Elektroforetik Tanımlamaları Üzerinde Araştırmalar. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 14-17 Eylül. 389-394. Ankara.
- ANDERSON, J.W., 1968. Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles From Plant Tissues. *Phytochemistry*, 7, 1973-1988.
- ANONYMOUS, 1985. Bağcılık Araştırma Projesi, Uygulama Projelerinin 1985 Yılı Gelişme Raporları. Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Tekirdağ.
- ANONYMOUS, 2000. Descriptors for Grape. International Board for Plant Genetic Resources Sekretariat, Rome.
- BONNER, J.W., WARNER, R.M. and BREWBAKER, J.L. 1974. Achemosystematic Study of Musa Cultivars. *Hortscience*, 9(4), 325-327.
- BRINGHURST, R.S., ARULSEKAR, S., HANCOCK, J.F., and VOTH, V. 1981. Electrophoretic Characterization of Strawberry Cultivars. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106(5), 684-687.
- BUSHUK, W. and ZILLMANN, R.R. 1978. Wheat Cultivar Identification by Gliadin Electrophoregrams. 1. Apparatus, Method and Nomenclature. *Can. J. Plant Sci.*, 58, 505-515.
- BUTTON, J., VARDI, A. and SPIEGEL-ROY, P. 1976. Root Peroxidase Isoenzymes as an Aid in Citrus Breeding and Taxonomy. *Theor. Appl Genet.*, 47, 119-123.
- CARTER, G.E. and BROCK, M.M. 1980. Identification of Peach Cultivars Through Protein Analysis. *Hortscience*, 15(3), 292-293.
- ÇALIŞKAN, M. ve AĞAOĞLU, Y.S. 1998. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Çavuş Üzümü Tiplerinin Elektroforez Yöntemi ile Tanımlanmaları Üzerinde Bir araştırma. 4. Bağcılık Sempozyumu. 20-23 Ekim. 152-158. Yalova
- DAVIS, B.J., 1964. Disc Electrophoresis-II. *Annals of the New York Academy of Science*. Vol. 121, p. 404-427.
- ERIAS-DIAS, J.E.J., SOUSA, B., CABRAL, F. and CARVALHO, I. 1989. Isozymatic characterization of portuguese vine varieties of *Vitis vinifera* L. *Riv. Vitic. Enol.*, N. 1, 23-26.
- HAMILL, D.E., and BREWBAKER, J.L. 1969. Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plants IV. The Peroxidase Isoenzymes of Maize (*Zea mays*). *Physiol. Plant.* 22, 945-958.
- HAREL, E., MAYER, A.M. and SHAIN, Y. 1964. Catechol Oxidases From Apples. Their Properties, Subcellular Location and Inhibition. *Physiol. Plant.* 17, 921-930.
- HAWKER, J.S., 1969. Changes in the Activities of Enzymes Concerned with Sugar Metabolism During the development of Grape Berries. *Phytochem.*, 8, 9-17.
- KUHNS, L.J. and FRETZ, T.A., 1978. Distinguishing Rose Cultivars by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. II. Isoenzyme Variation Among Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 103 (4), 509-516.
- LOOMIS, W.D., 1969. Removal of Phenolic Compounds During the Isolation of Plant Enzymes. *Methods Enzymology*, 13, 555-563.
- MEYNHARDT, J.T., 1965. Biosynthesis of Dicarboxylic Acids Through Carbon Dioxide Tixation by an Enzyme Extracts of Barlinka Grape Berries. *S. Afr. J. Agr. Sci.* 8, 381-382.
- MIELKE, A.E. and WOLFE, W.H. 1982. Identification of Pecan Cultivars with Pollen Isozymes. *Hortscience*, 17 (3), 382-383.
- MUKINEN, Y. and MACDONALD, T. 1968. Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plants II. Pollen Enzymes and Isoenzymes. *Physiol. Plant.*, 21, 477-486.
- ORAMAN, N., 1959. Ampelografi. A.Ü. Zir.Fak. Yayınları. No: 154.
- PARFITT, D.E. and ARULSEKAR, S., 1989. Inheritance and Isozyme Diversity for GPI and PGM among Grape Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114 (3), 486-491.
- PEROFFO, A.B.D. and PALLAVICINI, C. 1975. Enzymatic Changes Associated with Ripening of Grape Berries. *J. Sci. Fd. Agric.*, 26, 559-566.
- PROTOPADAKIS, E.E., 1987. Identification by isozymes of live cultivars of *Citrus medica* grafted on four rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, 62(3): 413-419.
- POUX, C., 1966. Polyphenoloxydase dans le Raisin. *Ann. Technol. Agric.* 15(2), 149-158.
- RAPP, A., HASTRICH, H. et ENGEL, L. 1978. Analyse Par Chromatographie Capillaire des Constituants Aromatiques de Vins et de Raisins; Possibilités d'identification des Varieties. *Géné.*
- RHODES, M.J.C., 1977. The Extraction and Purification of Enzymes from Plant Tissues. Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants. Academic Press. London, 245-267.
- RICE, A.C., 1964. Identification of Grape Varieties. *Jour Ass. Off. Agr. Chemists.*, 47(4), 671-676.

- SANTAMOUR, F.S. and DEMUTH, P. 1980. Identification of "Callery" Pear Cultivars by Peroxidase Isozyme Patterns. *J. Hered.*, 71, 447-449.
- SCHAEFER, H., 1969. Untersuchungen zur Methodik der Extraktion und Disk Elektroforese der Blattweise der Gattung *Vitis*. *Weinwiss.*, 24, 205-232.
- SCHWENNESEN, J.C., 1981. Gel Electrophoresis for determining Isozyme Differences in "Superior Seedles" Grapes. (MSc Thesis), 40 pp.
- SCHWENNESEN, J., MIELKE, E.A. and WOLFE, W.H. 1982. Identification of Seedless Table Grape Cultivars and a Bud Sport with Berry Isozymes. *Hortscience*, 17(3), 366-382.
- SIEGEL, B.Z. and GALSTON, A.W. 1967. The Isoperoxidases of *Pisum Sativum*. *Plant Physiol.*, 42, 221-226.
- SMITH, H.H., D.E. HAMILL, E.A. WEAVER and K.H. THOMPSON 1970. Multiple Molecular Forms of Peroxidases and Esterases Among *Nicotiana* Species and Amphiphoids. *J. Hered.*, 61, 203-214.
- STAVRAKAKIS, M. and LOUKAS, M., 1983. The Between and Within-Grape-Cultivars Genetic Variation. *Scientia Horticulturae*, 19: 321-334.
- WEAVER, R.J., 1976. *Grape Growing*. A Wiley Interscience Pub. Newyork.
- WEEDEN, N.F., REISCH, B.I. and MARTENS, M.H., 1988. Genetic Analysis of Isozyme Polymorphism in Grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(5): 765-769.
- WOLFE, W.H., 1976. Identification of Grape Varieties By Isozyme Banding Patterns. *Am. J. Enol. Viticult.* Vol. 27, No: 2, 68-73.