

MISIRDA ENDOSPERM PROTEİN ORANI VE PROTEİN FRAKSİYONLARININ DEĞİŞİMİNDE EBEVEYN VE GENERASYONLARIN ETKİSİ

Cem Ömer EGESEL* Fatih KAHRIMAN Nur ÇORBACIOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 17020, Çanakkale

*cegesel@comu.edu.tr

Geliş Tarihi : 16.10.2012 Kabul Tarihi : 24.01.2013

ÖZET: Mısırdaki tane kalitesinin belirleyici unsurları arasında, protein oranı ve protein kalitesi önemli yer tutmaktadır. Bu çalışmanın amacı, yüksek lizin içeriğine sahip *opaque-2* (*o2*) mutant hattı ile oluşturulan farklı melez kombinasyonların endosperm protein oranının ve protein fraksiyonlarının farklı generasyonlarda değişiminin incelenmesidir. Çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dardanos Araştırma ve Uygulama Birimi'nde 2010 ve 2011 yetiştirme sezonlarında oluşturulan tohumluk setleri kullanılarak yürütülmüştür. Araştırmada bir *o2* hattı iki farklı baba hat ile melezlenmiş ve bu melezlerin $F_{0:1}$ ve $F_{1:2}$ tohumlukları ile ebeveyn hatların kendilenmiş örneklerinde protein oranı ve protein fraksiyonlarını belirlemek için analizler yapılmıştır. Araştırma bulgularına göre endosperm protein oranı bakımından ebeveyn hatlar ve hibrit kombinasyonların $F_{1:2}$ generasyonundaki tohumlukları arasında önemli ölçüde farklılık olduğu görülmüştür. Genotiplerin endosperm protein oranı % 5.54-8.93 arasında değişim göstermiştir. Baba hatların etkisinin albümin+globülin ve zein proteinlerinin içeriği kadar, toplam protein içeriğine de etkili olduğu görülmüştür. Albümin+globülin fraksiyonları 3.46-8.71 mg/g arasında değişim göstermiştir. Ayrıca zein ve toplam protein içeriğinin, $F_{1:2}$ generasyonunda $F_{0:1}$ generasyonuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiş, zein proteinleri ise 16.9-61.0 mg/g arasında değişmiştir.

Anahtar Kelimeler: Albümin, Globülin, Protein, *Zea mays*

THE EFFECT OF GENERATION AND PARENTS ON ENDOSPERM PROTEIN RATIO AND CHANGE OF PROTEIN FRACTIONS IN MAIZE

ABSTRACT: Among the quality traits of maize grain, protein ratio and protein quality are two main components. The objective of the study was to investigate changes of endosperm protein ratio and protein fractions in successive generations of different hybrid combinations having a high lysine mutant parent, *opaque2* (*o2*). The study was carried out using seed samples generated at 2010 and 2011 growing seasons in Dardanos Research and Experiment Center of Çanakkale Onsekiz Mart University. To produce the plant material, an *o2* line was pollinated with two different inbreds. The seeds of $F_{0:1}$ and $F_{1:2}$ generations from these hybrids, as well as selfed seeds from the parents, were used to detect protein ratio and protein fractions. The results showed that there were significant differences between parent lines and $F_{1:2}$ seeds of hybrid combinations for endosperm protein ratios. Endosperm protein ratios ranged between 5.54% and 8.93%. There was a significant male parent effect on albumin + globulin and zein fractions as well as total protein ratio. Albumin + globulin fractions ranged between 3.46-8.71 mg/g. Lower values were detected for zein and total protein ratios in $F_{1:2}$ seeds as compared to the seeds of $F_{0:1}$ generation. In terms of zein fractions the range was between 16.9 and 61.0 mg/g.

Key Words: Albumin, Globulin, Protein, *Zea mays*

1. GİRİŞ

Mısırdaki ıslah amaçları içerisinde en önemli olan şüphesiz verim artışıdır. Buna karşın birçok ıslah programında verim ile birlikte veya bağımsız olarak kalite özelliklerinin geliştirilmesi konusunda yüksek çaba sarf edilmektedir. Tane kalitesini önemli ölçüde etkileyen protein oranı, normal mısır tanesinde % 8-11 arasında değişim göstermektedir (Gorinstein ve ark., 1991). Tane kalitesinde protein oranı kadar belirleyici olan protein kalitesi toplam proteini oluşturan protein fraksiyonları ile ilişkilidir. Mısırdaki protein fraksiyonları albümin, globülin, glutelin ve zein olmak üzere dört

farklı gruba ayrılmaktadır (Osborne, 1987). Mısır tanesinde baskın tip protein grubu olan zein tip proteinler, mutlak gerekli aminoasitlerden lizin ve triptofan aminoasitleri bakımından oldukça fakirdir (Vasal, 2002). Bu nedenle protein kalitesi bakımından normal mısır tipleri oldukça düşük değerlere sahiptir. Dünyada yetersiz protein alımı ve kaliteli protein eksikliği sorunlarıyla karşı karşıya olan çocuk sayısı 200 milyonun üzerinde olup, her yıl en az 5 milyon çocuk bu nedenle hayatını kaybetmektedir (FAO, 2008). Bu noktada protein kalitesi yüksek mısır (Quality Protein Maize-QPM) tipleri bu sorunun çözümünde önemli avantajlar sağlamaktadır. Proteini Kaliteli Mısır çeşitleri

ile ilgili çalışmalara temel oluşturan olay, 1920'li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde bir mısır tarlasında tesadüf eseri fark edilen, yumuşak opak tipteki (o2) bir mutant mısırın, Connecticut Tarımsal Araştırmalar İstasyonu'nda mercek altına alınması ve bu konu üzerinde çalışılmaya başlanmasıdır (Vietmeyer, 2000). Bu konu ile ilgili ilk bilimsel raporlar 1960'lı yıllarda Theodor Mertz ve Oliver Nelson tarafından sunulan o2 mısır tipini oluşturan mutasyonu konu edinmiştir (Crow ve Kermicle, 2002). Bu mutasyon nedeniyle o2 tip mısırdaki, normal mısırlara göre lizin ve triptofan aminoasitleri 2-3 kat daha fazla sentezlenmektedir (Sofi ve ark., 2009).

Mertz ve Nelson tarafından başlatılan çalışmalar daha sonra farklı araştırmacılar tarafından yeni yaklaşımlara konu olmuştur. Geliştirilen mutantların protein kaliteleri yüksek olmasına karşın yumuşak tane yapısına sahip olmaları nedeniyle, sert taneli ve protein kalitesi yüksek olan mısır tipleri (QPM) üzerinde çalışılmaya başlanmıştır (Motto ve ark., 2011). Özellikle Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmaları Merkezi'nde (CIMMYT) önemli çalışmalar yapılmış ve yeni mutant tipler geliştirilmiştir (Vasal, 1999). Protein kalitesi yüksek mısır tiplerinin beslenme konusunda normal mısır tiplerine olan üşünlükleri bilimsel araştırmalar ile kanıtlanmıştır. QPM hatları kullanılarak yapılan hayvan beslemenin; yumurtacı ve broiler tavuklarda beslenme ve ekonomik açıdan önemli katkılar sağladığı rapor edilmiştir (Panda ve ark., 2011). Benzer şekilde farelerde yapılan bir çalışmanın sonuçları QPM mısır ile beslenmiş farelerin canlı ağırlık artışının hibrit mısırla beslenen farelere göre 2-3 kat fazla olduğunu göstermiştir (Crow ve Kermicle, 2002). Yine QPM mısır tipleri ile ek protein kullanılmadan beslenen domuzların canlı ağırlık artışının normal mısır ile beslenen domuzlara göre iki kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Burgoon ve ark., 1992). QPM mısırın insan beslenmesi üzerine olan etkileri de araştırma konusu olmuştur. Çocuk beslenmesinde özellikle yaygın olarak mısır kullanılan ölkelerden birisi olan Gana'da yürütölen bir çalışmada yüksek lizin/triptofan içeriğine sahip mısırla beslenen çocukların normal mısırla beslenenlere göre daha hızlı gelişim gösterdiği ve hastalıklara yakalanma oranının azaldığı rapor edilmiştir (Akuoma-Boateng, 2002). Zira QPM mısırın biyolojik değeri % 80, sütöün % 90 iken normal mısırın biyolojik değeri yalnızca % 45 civarındadır (FAO, 1992). Bu durumlar dikkate alındığında ölkemizde yalnızca verimi amaçlayan mısır ışlah çalışmalarına ek olarak tane kalitesini de konu edinen araştırmaların artırılması gerektiği anlaşılmaktadır. Protein kalitesinin mısırdaki değişimini inceleyen farklı araştırma bulguları, farklı hatlarla oluşturulmuş melez kombinasyonların (Paulis ve ark., 1993; Yau ve ark., 1999) ve farklı jenerasyonlarda alınan örneklerde (Ignjatovic-Micic ve ark., 2010) protein fraksiyonları ve aminoasit

kompozisyonlarının önemli derecede farklı olduğunu göstermiştir. Ancak polen etkisi nedeniyle ortaya çıkabilecek değişimler ve jenerasyon tohumluklarındaki farklılıklar bu konuda yürütölen çalışmalarda ele alınmamıştır. Ulusal bazda yürütölen çalışmalarda ise QPM veya *opaque-2* hatlarının kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tarımsal ve hayvansal üretim potansiyeli yüksek olan ölkemizde, mısır kalitesine yönelik çalışmaların sınırlı olması çok önemli bir eksikliktir.

Bu alışma protein kalitesi yüksek olan bir hat ile iki farklı saf hattın melezlenmesi sonucu elde edilen kombinasyonların farklı jenerasyonlarındaki tohum örneklerinde protein oranı ve protein kalitesinin değişiminin incelenmesi amacıyla yürütölmüştür.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

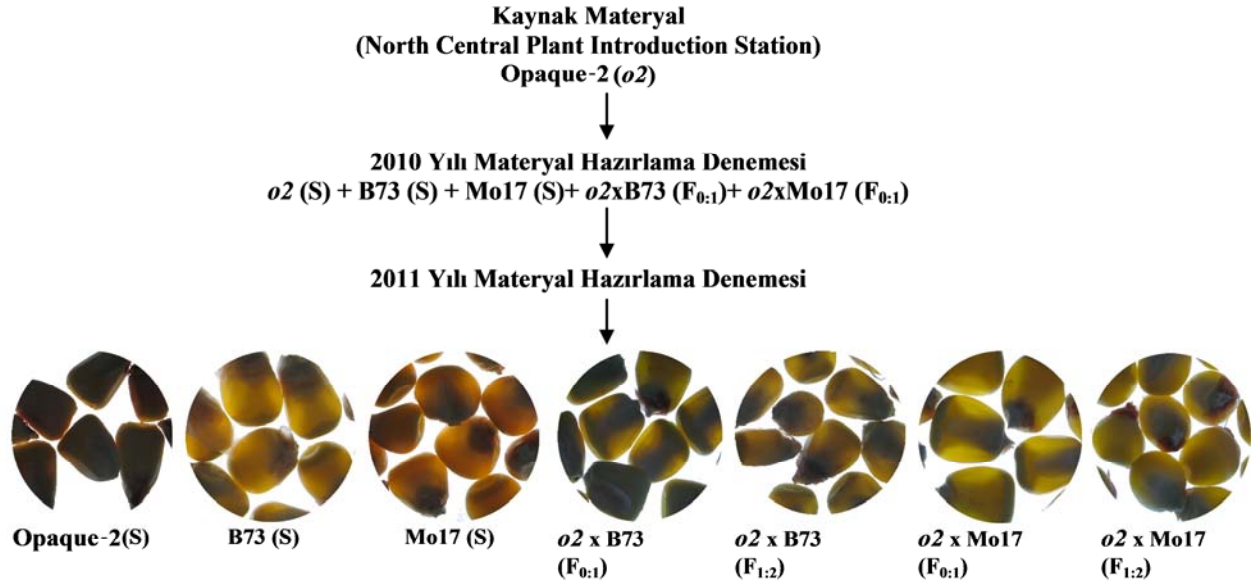
2.1 Deneme Materyali ve Deneme Alanı

Bu araştırma 2010 ve 2011 yıllarında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Faköltesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nde yürütölen mısır ışlah çalışmalarında oluşturulan genetik materyal kullanılarak yürütölmüştür. Denemeler her iki yılda da Mayıs ayının ikinci haftasında kurulmuştur. Çalışmada *opaque-2* tipi bir mısır hattı ana ebeveyn olarak ve iki farklı baba hattı (B73 ve Mo17) kullanılarak iki adet hibrit kombinasyon 2010 yılında oluşturulmuştur. Oluşturulan melez kombinasyonlar ve tohumluk setleri ile ilgili bilgiler şekil 1'de sunulmuştur. Analizlerde 2011 yılında yürütölen materyal hazırlama denemesinden elde edilen koanlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tane örneklerin tamamı kendilenmiş koanlardan elde edilmiştir. Bu amaçla bitkiler çiçeklenme zamanında iken her sabah sıra kontrolleri yapılmış ve dışarıdan toz almaması için koanlar püsköl çıkarmadan önce izole edilmişlerdir. İzole edilen koanlar aynı bitkiden alınan polenler ile kontrollü şekilde tozlanmıştır. Sulama, damla sulama yöntemi ile bitkilerin fenolojik durumlarına göre haftalık olarak gerçekleştirilmiştir. Hasat işlemi, Ekim ayının ilk haftasında yapılmıştır.

2.2 Laboratuvar Analizleri

2.2.1 Örneklere hazırlanması

Kullanılan her bir genotipin kendilenmiş koanlarından 50'şer adet tane alınmış ve opak olma durumunu görmek amacıyla ışıklı tablada, alttan ışık verilerek fotoğrafları çekilmiştir (şekil 1). Alınan tane örnekleri embriyo ve endospermin ayrılması amacıyla bir gece +4 °C'de saf su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra tanelerin kabukları pens ile soyularak ayrılmış ve embriyoları bistüri yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Kalan endosperm örnekleri açık havada kurutulmuş ve 0,5 mm örnek çapında eleğe sahip laboratuvar değirmeninde (Fritsch pulverisette 14) öğütölmüştür. Öğütölen örneklerin nem içeriğleri 70 °C sıcaklıkta etövde 24 saat



Şekil 1. Çalışmada kullanılan genotiplerin materyal oluşturma aşamaları ve örneklerin ışık geçirimlerini gösteren resimler. S: Kendileme

süreye bekletilerek, AACC (2009) standart yöntemindeki formüle göre hesaplanmıştır. Bu değerler protein oranının kuru madde üzerinden hesaplanmasında kullanılmıştır.

2.2.2 Endosperm protein oranı

Örneklerin toplam protein içeriğini belirlemek amacıyla Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (CRA, 1980). Elde edilen toplam azot değeri 6.25 katsayısı ile çarpılarak toplam protein içeriği tespit edilmiştir.

2.2.3 Protein fraksiyonlarının belirlenmesi

Endosperm örneklerinde albumin+globülin ve zein fraksiyonlarının ekstrakte edilmesi amacıyla her örnekte 100 mg cam tüpler içerisine tartılmıştır. Protein fraksiyonlarının ekstraksiyonunda aynı örnekte izole işlemlerine dayalı olan sekansiyel bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre mısırdaki endosperm proteinleri; albumin+globülin ve zein olmak üzere iki alt fraksiyona ayrılmıştır (Yau ve ark., 1999). Albumin+globülin ekstraksiyonunda 0.5 N NaCl, zeinlerin ekstraksiyonunda %70'lik C₂H₅OH ve %2'lik β-merkaptotanol kullanılmıştır. Her örneğe ilgili çözücüler eklendikten sonra 15 dakika arayla çalkalamak suretiyle bir saat boyunca proteinlerin çözünmesi sağlanmıştır. Albumin+globülinlerin ekstraksiyonu 4°C'de, zeinlerin ekstraksiyonu 22°C'de yapılmıştır. Örnekler 10000×g devirli santrifüjde 10'ar dakika süreyle santrifüje edilmiştir. Ekstraktlarda kantitatif tayin amacıyla Bradford yönteminden faydalanılmıştır. Bu amaçla 50 ml ekstrakt üzerine 1,5

ml Bradford solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 45 dakika bekletildikten sonra, UV-VIS spektrofotometrede (PG Instruments, UK) 595 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Aynı şekilde ölçülen ve BSA standardı kullanılarak oluşturulan kurve yardımıyla örneklerin protein içerikleri tespit edilmiştir (Bradford, 1976).

2.2.3 Protein fraksiyonlarının kalitatif ayrımı

Örneklerden ekstrakte edilen protein fraksiyonlarının genotiplere göre kalitatif ayrımını gerçekleştirmek amacıyla SDS-PAGE elektroforez yöntemi uygulanmıştır. Her örnekte 100 mikrolitre örnek üzerine 100 mikrolitre 2X yükleme tamponu eklenmiş ve SDS-PAGE jeline yüklenerek 250 V akımda tampon boyası jelden çıkıncaya kadar yürütülmüştür. Jeller albumin+globülin fraksiyonları için % 12 ayırma ve % 14 ayırma, zein fraksiyonları için ise % 12 ayırma % 16 ayırma jellerinde yürütülmüştür (Yau ve ark., 1999). Elde edilen jeller Commasie Brilliant Blue R 250 ile bir gece boyunca boyanmış ve tarayıcıda taranarak jel resimleri çıkarılmıştır. Bu resimlerde tespit edilen bantların oransal taşınım değerleri hesaplanmış ve bu hesaplamaya göre bantlara 1/0 (var/yok) puanlaması yapılmıştır.

2.3 İstatistik Analizler

Çalışmada elde edilen veriler SAS V8 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir (SAS Inst., 1999). Varyans analizi tesadüf blokları deneme desenine uygun model kullanılarak yapılmış ve istatistikî açıdan

önemli bulunan özellikler bakımından genotipleri karşılaştırmak amacıyla Asgari Önemli Fark (LSD) testi uygulanmıştır. Kalitatif değerlendirmelerde protein fraksiyonlarından elde edilen jel resimlerinde bantlar varlıkları ve yokluklarına göre (1/0) skorlanmış ve aynı istatistik programında PROC CLUSTER prosedürü kullanılarak Ward yöntemine göre kümeleme diagramları oluşturulmuştur.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Varyans Analizi

Endosperm protein oranı ve protein fraksiyonlarının kantitatif verilerine dayalı yapılan varyans analizi sonuçları kullanılan genotiplerin bu özellikler bakımından önemli farklılıklara sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 1). Genotip etkisinin toplam varyans içerisindeki payı protein, albümin+globülin ve zein değişkenleri bakımından sırasıyla % 57.3, % 79.5 ve % 87.3 olarak tespit edilmiştir.

3.2. Protein Oranı

Çalışmada kullanılan genotiplerin endospermilerinde ortalama ham protein oranları % 5.54 ile 8.93 arasında değişim göstermiştir. Ana hat olarak kullanılan *opaque-2* tip mısırın endosperm protein oranı, baba hattı olarak kullanılan B73 ve Mo17 hatlarından bir miktar düşük olsa da bu fark istatistikî açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 2). Diğer taraftan oluşturulan generasyonların tohumluklarında endosperm protein içerikleri kıyaslandığında, oluşturulan her iki melezin $F_{0:1}$ generasyonunda protein içeriğinin $F_{1:2}$ generasyonundaki tohumluklardan yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Ayrıca erkek ebeveyn hatlar (B73, Mo17) ile $F_{1:2}$ generasyonunda yer alan tohumlukların protein oranları arasında önemli derecede fark bulunmuştur (Çizelge 2). En yüksek protein içeriği, baba hattı olarak kullanılan B73 hattında tespit edilmiş (% 8.93) ve elde edilen melez kombinasyonlarda yine en yüksek protein yüzdesinin $o2 \times B73$ melezine ait $F_{0:1}$ tohumluklarında olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşılık $o2 \times B73$ melezinin $F_{1:2}$ generasyonunda protein içeriği oldukça düşük göstermiştir (Çizelge 2). Çalışmada ana olarak kullanılan *o2* hattı düşük protein oranına sahip olmasına rağmen, yüksek protein içeriğine sahip B73 hattının baba olarak kullanılmasıyla elde edilen melezin protein içeriğinin fark edilir derecede yükseldiği görülmüştür. Bu durum farklı protein içeriğine sahip heterotik grupların baba ebeveyn olarak kullanılmak suretiyle oluşturulacak genotiplerin protein içeriğini yükseltmenin mümkün olabileceğini göstermiştir. Protein oranı ile ilgili yapılan çalışmalarda da QPM niteliği taşıyan genotiplerin ana ebeveyn olarak kullanıldığı melezlerde normal genotiplerin ana ebeveyn olarak kullanıldığı kombinasyonlara göre protein oranının düşük olduğu tespit edilmiştir (Paulis ve ark., 1993). Bu durum lizin bakımından fakir olan zein protein fraksiyonlarının

protein oranı ile olan negatif ilişkisinden (Bhatnagar ve ark., 2003) kaynaklanabilir. Bu konuda yürütülen diğer çalışmalarda işaret edilen ebeveyn, yetiştirme koşulları, işleme ve öğütme aşamaları (Paulis ve ark., 1993; Landry ve ark., 2002) kadar generasyonun da endosperm protein içeriği üzerine etkili olduğu görülmüştür.

3.3. Albümin+Globülin ve Zein Fraksiyonlarının Miktarı

Çalışmada kullanılan her genotipte, protein alt fraksiyonlarından olan albümin+globülinlerin miktarı mg/g olarak tespit edilmiştir. Genotiplerin albümin+globülin oranları 3.46 ile 8.71 mg/g arasında değişim göstermiştir. Ana olarak kullanılan *o2* tip mısır hattı rakamsal olarak en yüksek orana sahip olduğu ve $o2 \times B73$ ($F_{1:2}$) melez kombinasyonu dışında diğer genotiplerle arasında istatistikî açıdan önemli bir fark olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Baba ebeveynlerden Mo17 hattının ise rakamsal olarak en düşük içeriğe sahip olduğu anlaşılmış ve bu genotipin yer aldığı melezlerin de albümin+globülin içerikleri diğer mezelere göre düşük bulunmuştur. Generasyon bazında düşünüldüğünde $F_{1:2}$ generasyonundaki tohumlukların $F_{0:1}$ generasyonuna göre bir miktar yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmüştür.

Diğer önemli bir protein grubu normal mısır tiplerinde baskın olan zein tipi proteinlerdir. Zein fraksiyonları daha önce de belirtildiği gibi lizin ve triptofan aminoasitlerince fakir olduğundan bu fraksiyonun düşük seviyelerde olması istenmektedir. Çalışmamızda zein fraksiyonlarının kantitatif analizleri sonucunda genotiplere ait değerlerin 16.9-61.0 mg/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Söz konusu bileşenler bakımından en düşük ortalama değere *o2* hattı (16.9 mg/g), en yüksek değere ise Mo17 hattı sahip olmuş (61.0 mg/g) ve bu genotip diğer tüm genotiplerden istatistikî açıdan da farklı bulunmuştur (Çizelge 2). Generasyonlar dikkate alındığında $F_{0:1}$ generasyonuna göre $F_{1:2}$ generasyonuna ait tohumluklarda zein miktarının her iki melez kombinasyon için de düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). Her iki generasyondaki tohumluklarda da B73 baba hattı kullanılarak oluşturulan $o2 \times B73$ melezinin zein içeriği Mo17 ile oluşturulan hibrite göre düşük bulunmuştur. Bu bulgular B73 ve Mo17 genotiplerinin ebeveyn olarak kullanılan benzer bir çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir. Yau ve ark (1999) tarafından yürütülen bu çalışmada B73 ile oluşturulan melez kombinasyonların zein içeriğinin (23.8-35.6 mg/g), Mo17 hattı ile oluşturulanlardan (48.9-49.5 mg/g) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum gerek zein gerekse diğer protein fraksiyonları üzerine polen etkisinin önemli olduğuna işaret etmektedir.

Protein fraksiyonlarının toplam protein oranı ile ve birbirleri ile olan etkileşimleri dikkate alındığında

Çizelge 1. İncelenen özelliklere ait kareler ortalamaları ve önem düzeyleri

Varyans Kaynağı	S.D.	Protein	Albümin+globülin	Zein
Tekerrür	2	1.7838	0.7365	20.6764
Genotip	6	4.3797*	11.34537**	729.8691**
Hata	12	1.3325	1.3357	49.6285

İstatistikî olarak * $P < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ düzeyinde önemli fark vardır. S.D.: Serbestlik derecesi

Çizelge 2. İncelenen özelliklere ait kareler ortalamaları ve önem düzeyleri.

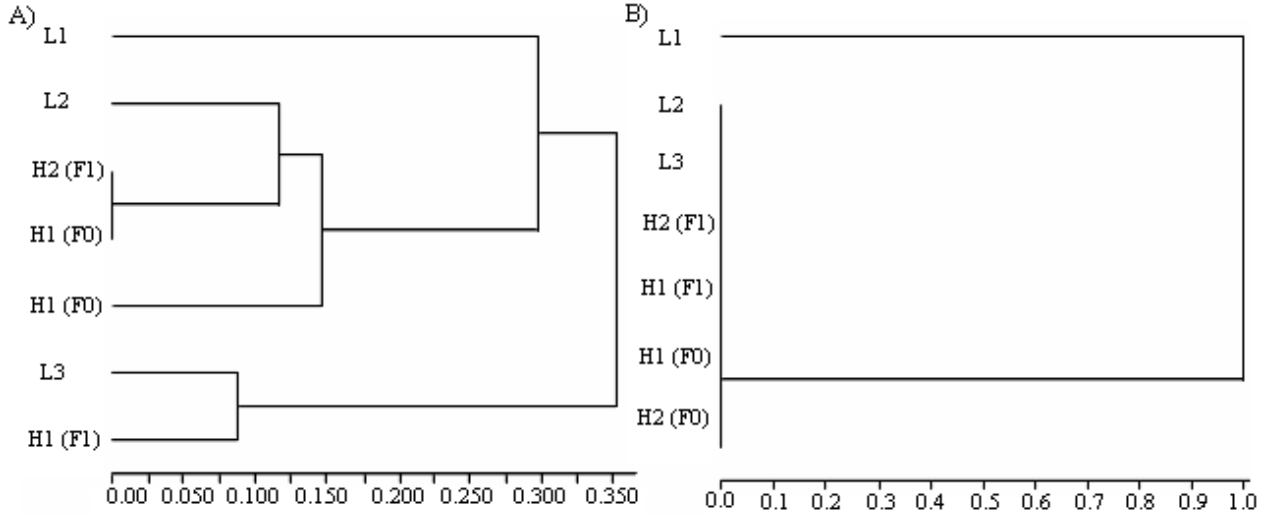
Genotip	Protein (%)	Albümin+globülin (mg/g)	Zein (mg/g)
<i>o2</i> (S)	7.41 abc	8.71 a	16.9 d
Mo17 (S)	8.35 a	3.46 d	61.0 a
B73 (S)	8.93 a	4.88 cd	30.8 c
<i>o2</i> x B73 ($F_{0.1}$)	8.08 ab	4.13 cd	25.3 cd
<i>o2</i> x Mo17 ($F_{0.1}$)	7.91 ab	4.48 cd	43.5 b
<i>o2</i> x B73 ($F_{1.2}$)	5.54 c	7.72 ab	17.8 d
<i>o2</i> x Mo17 ($F_{1.2}$)	6.23 bc	5.70 bc	28.6 cd
Ortalama	7.49	5.58	32.0
LSD (0.05)	2.05	2.06	12.5

Not: Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasında fark istatistikî olarak 0.05 düzeyinde önemlidir

beklenen sonuçların alındığı söylenebilir. Zira baskın tip protein grubu olan zein miktarı yüksek olan hatların protein içeriklerinin de zein içeriği düşük olan genotiplere göre nispeten yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Yalnızca B73 hattında zein miktarı düşük bulunmasına karşın protein oranı en üst istatistikî grupta yer almış ve bu durum bir önceki cümlede atfedilen konunun bütün genotipler için geçerli olmadığına işaret etmiştir. Bu tip bir değişimin açıklanabilmesi için bütün fraksiyonların kantitatif olarak tayin edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla protein oranı ve protein fraksiyonlarının birbirleri ile olan ilişkilerini daha detaylı şekilde açıklayabilmek için glutelin fraksiyonlarının da bu tip çalışmalarda ele alınması gerektiği anlaşılmaktadır. Bunun yanı sıra lizin ve triptofan aminoasitleri albümin+globülin ve glutelin fraksiyonlarında zengin, zein fraksiyonlarında fakir durumda bulunduğundan, zein ile diğer fraksiyonlar arasında negatif yönlü bir ilişki olduğu bilinmektedir (Yau ve ark., 1999). Bu durumun bir sonucu olarak çalışmamızda albümin+globülin içeriği yüksek bulunan *o2* hattı ile $F_{1.2}$ generasyonu melez tohumlukların zein içeriğinde gözlemlenen düşüş, beklenen bir sonuç olarak gösterilebilir. Bu konuda yürütülen benzer çalışmalardan birisinde BC_1F_1 ve F_3 generasyonlarının triptofan içeriği incelenmiş ve QPMx02 melezlerine göre normal bir hattın dışı olarak kullanılıp oluşturulduğu kombinasyonda diğerlerinin tersine F_3 generasyonunda triptofan içeriğinin arttığı görülmüştür (Ignjatovic-Micic ve ark., 2010). Çalışmamızda, açılan generasyonlarda F_3 seviyesine kadar gelinmemesine karşın, ilerleyen generasyonların tohumluklarında ($F_{1.2}$) benzer bir durum ortaya çıktığı söylenebilir.

3.4. Albümin+Globülin ve Zein Fraksiyonlarının SDS-PAGE Analizleri

Araştırmada yapılan kantitatif analizlerin yanı sıra protein gruplarının kalitatif ayrımı amacıyla yapılan SDS-PAGE analizlerinin sonuçlarına dayalı oluşturulan kümeleme dendogramları Şekil 2'de sunulmuştur. Zein fraksiyonlarına ait bant analizlerinde *o2* hattının kendilenmiş tohumluklarının diğer melez ve ebeveyn hatlardan farklılık gösterdiği kümeleme dendogramından anlaşılmaktadır. Oluşan bantların oransal taşınımaları hesaplanarak elde edilen bulgulara göre *o2* hatlarına ait orijinal ve kendilenmiş tohumluklarda 22 kD büyüklüğündeki bantın var olmadığı anlaşılmıştır. Motto ve ark., (2011) mısırdaki zein akümülyasyonuna etkili olan genetik farklılıklara dayanarak yaptıkları sınıflandırmada 12 farklı mutant tip olduğunu ve *o2* tipi genotiplerde 22 kD protein bantının elemine edildiğini bildirmişlerdir. Bu konu ile ilgili yapılan diğer bir araştırma *opaque-2* geninin 20 ve 22 kD büyüklüğündeki protein bantları ile negatif yönlü bir ilişkisinin olduğunu göstermiştir (Ming-sheng ve Meng-qian, 1994). Çalışmamızda anaç olarak kullanılan genotipte söz konusu bantın bulunmaması bu genotipin *o2* gen etkisine sahip olduğuna işaret etmektedir. Nitekim bu durum genotiplere ait tane örneklerinin ışık geçirime durumlarından da anlaşılmaktadır (Şekil 1). Buna karşın $F_{0.1}$ generasyonuna göre $F_{1.2}$ generasyonunda ait tohumluklarda söz konusu bantın yoğunluğunun arttığı görülmüştür. Bu durum *o2* hattında zein miktarının düşüşüne ve lizin ile triptofan aminoasitlerinin sentezine neden olan resesif gen grubunun etkisinin ileriki generasyonlarda arttığına



Şekil 2. Albümin+Globülin (A) ve Zein (B) ekstraktlarının SDS-PAGE analizlerine dayalı oluşturulan kümeleme dendogramı (L1=*Opaque-2*, L2=*B73*, L3=*Mo17*, H1 (F0)= *o2xB73*(F_{0:1}), H2 (F0)= *o2xMo17*(F_{0:1}), H1 (F1)= *o2xB73* (F_{1:2}), H2 (F1)= *o2xMo17* (F_{1:2}))

işaret etmektedir. Bu bulguyu zein miktarına ait tespit edilen kantitatif değerler de doğrulamaktadır (Çizelge 2)

Albümin+globülin fraksiyonlarına ait kümeleme dendogramı ve bu fraksiyonlara ait jel resimlerinde ise hatlar arasında kalitatif açıdan çok büyük bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Her ne kadar densitometre ile ölçümler yapılmamış olsa da, baba ebeveyn olarak kullanılan B73 ile Mo17 hatlarının bu fraksiyonlar bakımından bant yoğunluklarının düşük olduğu, buna karşın oluşturulan genotiplerin F_{1:2} tohumluklarının yoğunluk açısından daha koyu bantlara sahip olduğu görülmüştür. Albümin ve globülin bantları ile ilgili olarak mevcut bant varyasyonunun büyük kısmının 20-80 kD arasında var olduğu anlaşılmıştır. Protein ağırlığı 20 kD'un altında olan bant dizileri bakımından genotipler arasında kalitatif açıdan önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Gerek albümin+globülin gerekse zein fraksiyonlarının kalitatif ve kantitatif verileri birlikte değerlendirildiğinde oluşan istatistiki gruplar ve kümeleme analizi sonuçlarının birbiri ile örtüşmediği görülmektedir. Özellikle albümin+globülin protein bant fraksiyonlarının kantitatif miktarına bantların varlığı veya yokluğundan çok, bant yoğunluklarının etkili olabileceği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla bu konu ile ilgili ileride yürütülecek çalışmalarda bant yoğunluklarının da analiz edilerek değerlendirmelerin yapılması faydalı olabilir.

4. SONUÇ

Yürütülen bu çalışma neticesinde farklı protein oranlarına ve içeriklerine ait bir ana ve iki baba hat ile bunların melezlerinin protein içerikleri bakımından değişimi gözlemlenmiştir. Farklı heterotik grupların (Mo17 ve B73) baba olarak kullanılmasıyla elde edilen

melezlerde, yukarıda açıkça değindiğimiz değişimler gözlemlenmiştir. Genel olarak çıkarabileceğimiz sonuç, gerek toplam protein bakımından gerekse alt protein fraksiyonları bakımından, elde edilen melezlerde ilk generasyondan bir sonraki generasyona doğru gidildiğinde oransal olarak bir düşme gözlemlendiğidir. Albümin ve globülin ile zein fraksiyonları üzerine ebeveyn ve generasyonun önemli ölçüde etkisi olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanı sıra polen kaynağı olarak yüksek protein kalitesine sahip mısır tipleri ile yüksek verimli mısır çeşitlerinin birlikte yetiştirilerek *xenia* etkisinden faydalanmak suretiyle ürünün kalite düzeyinin artırılacağı belirlenmiştir.

Ülkemizde mısır kalitesi üzerine yeni çalışmalar yapılmalı ve besin değeri açısından oldukça nitelikli olan opak/QPM materyallerinin geliştirilmesi üzerine araştırmalar tasarlanmalıdır. Bu alanda yürütülen ilk çalışma olan bu araştırmanın sonuçları hem materyal geliştirme hem de hat karakterizasyonu konusunda diğer moleküler fraksiyonların kalitatif ve kantitatif tayini gibi farklı yöntemlerin de bu tip çalışmalarda kullanılması gerektiğini göstermiştir.

5. KAYNAKLAR

- AACC, 2009. International. Moisture-Air-Oven Method. In Approved Methods of Analysis, 11th ed.; AACC International: St. Paul, MN, USA.
- Akuamo-Boateng, A. 2002. Quality Protein Maize: Infant Feeding Trials in Ghana. Ghana Health Service, Ashanti, Ghana.
- Bhatnagar, S., Bertan, F.J., Transue, D.K., 2003. Agronomic performance, aflatoxin accumulation and protein quality of subtropical and tropical QPM hybrids in southern U.S., *Maydica*, 48:113-124.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: p. 248-254.
- Burgoon, K.G., J.A. Hansen, D.A. Knabe, and A.J. Bockholt. 1992. Nutritional value of quality protein maize for starter and finisher swine. *Journal of Animal Science* 70:811-817.
- CRA, 1980. Protein. In *Standard Analytical Methods of the Member Companies; Corn Refiners Association*: Washington, DC, Method A-18.
- Crow, J.F., Kermicle, J., 2002. Oliver Nelson and Quality Protein Maize, *Genetics* 160: 819-821.
- FAO, 2008. Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2008. The state of food insecurity in the world 2008: high food prices and food security-threats and opportunities. Available from: <http://www.fao.org/docrep/011/i0291e/i0291e00.htm>. Accessed Oct 2009.
- FAO. 1992. Maize in human nutrition. FAO, Rome.
- Gorinstein S., Nue I. A. D. ve de Arruda P., 1991. Alcohol-Soluble and Total Proteins from Amaranth Seeds and Their Comparison with Other Cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 848-850.
- Ignjatovic-Micic, D., Stankovic, G., Markovic, K., Drinic, S.M., Lazic-Jancic, V., Denic, M., 2010. Kernel Modifications And Tryptophan Content in QPM Segregating Generations ,*Genetika*, Vol. 42, No. 2, 267-278.
- Landry, J., Delheya, S., Damerval, C., 2002. Effect of opaque-2 gene on accumulation of protein fractions in maize endosperm, *Maydica*, 47:59-66.
- Ming-sheng, C., Meng-qian, Z., 1994. Electromicrographic analysis storage protein accumulation in endosperms of maize with qualified protein. *Acta Botanica Sinica*, 36(2):123-129.
- Motto, M., Hartings, H., Fracassetti, M., Consonni, G., 2011. Grain quality-related traits in maize: gene identification and exploitation, *Maydica* 56:291-314.
- Osborne, T.B. 1987. The amount and properties of the proteins of the maize kernel. *J. Am Chem. Soc.* 19: 525-532.
- Panda A. K., Raju M. V. L. N., Rao R. S. V., Lavanya G., Reddy E. P. K. ve de Sunder G. S., 2011. Nutritional Evaluation and Utilisation of Quality Protein Maize, Nityasrhee Hybrid Maize, and Normal Maize in Broiler Chickens. *British Poultry Science.*, 52: 632-638.
- Paulis, J.W., Peplinski, A.J., Bietz, J.A., Nelsen, T.C., Bergquist, R.R., 1993. Relation of Kernel Hardness and Lysine to Alcohol-Soluble Protein Composition in Quality Protein Maize Hybrids, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2249-2253.
- SAS 1999. SAS V8 User Manual. SAS Institute, Cary NC.
- Sofi, P.A., Wani S.A., Rather, A.G., Wani, S.H., 2009. Review article: Quality protein maize (QPM): Genetic manipulation for the nutritional fortification of maize, *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1(6):244-253.
- Vasal S. K., 1999. Quality Protein Maize Story, *CIMMYT.*, 1: 1-16.
- Vasal, S.K., 2002. Quality Protein Maize: Overcoming the Hurdles, *Journal of Crop Production*, 6:1-2, 193-227.
- Vietmeyer, N.D. 2000. A drama in three long acts: the story behind the story of the development of quality-protein maize. *Diversity* 16:29-32.
- Yau J. C., Bockholt A. J., Smith J. D., Rooney L. W. ve de Waniska R. D., 1999. Maize Endosperm Proteins That Contribute to Endosperm Lysine Content. *Cereal Chem.*, 76: 668-672.