

Mısırdaki Tam Kardeş Popülasyonların Oluşturulması ve Polen Etkisinin Değerlendirilmesi için Yeni Bir Tozlaşma Aparatı ve Yöntemin Geliştirilmesi

Fatih KAHRIMAN^{1*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Çanakkale

*Sorumlu Yazar: fkahriman@hotmail.com

Geliş Tarihi: 23.11.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 12.06.2022 Kabul Tarihi: 10.07.2022

Öz

Bu çalışmada mısırdaki polen etkisinin (xenia) incelenmesine yönelik yeni bir tozlaşma yönteminin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada materyal olarak tane rengi ve tane içeriği bakımından farklılık gösteren 4 farklı genotip kullanılmıştır. Deneme Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Çiftliği Bitkisel Üretim Uygulama ve Araştırma Birimi seralarında 2020 Eylül ayında tesadüf blokları deneme desenine uygun olarak kurulmuştur. Her genotip 30 saksıya ekilmiştir. Bitkiler çiçeklenme zamanına geldiğinde geleneksel kontrollü tozlaşma yöntemi (kontrol) ve geliştirilen yeni yöntemle de 4x4 yarım diallel melez seti (test) oluşturulmuştur. Tek tohum ağırlığı, protein oranı ve yağ oranı için kombinasyon yeteneği ve polen etkisi hesaplamaları yapılmış ve tozlaşma yöntemlerinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Oluşturulan setlerin tohumlarında protein bant analizlerine dayalı olarak genotip setlerinin benzerlik ve farklılıkları incelenmiştir. Yapılan varyans analizine göre genotip, tozlaşma ve genotip x tozlaşma etkileşiminin incelenen özelliklerdeki değişimde etkili olduğu saptanmıştır. Kombinasyon yeteneği hesaplamalarına göre ebeveyn genotiplere ait genel kombinasyon yeteneğinin farklı tozlaşma yöntemlerinde önemli bir değişim göstermediği, buna karşın özel kombinasyon hesaplamalarına dayalı sonuçların önemli farklılıklar gösterdiği anlaşılmıştır. Polen etkisi hesaplamalarında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Hibritler için özel kombinasyon yeteneği ve polen etkisi hesaplamalarının yeni geliştirilen yöntemde daha sağlıklı sonuç verdiği değerlendirilmiştir. Protein bant analizlerinde ebeveynler dışında hibrit genotiplerin farklı tozlaşma yöntemlerine ait örneklerin kümeleme analizine dayalı sınıflamalarında değişiklikler görülmüştür. Bu durum tozlaşma yöntemine bağlı olarak protein bant dizilerinin değişebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: *Zea mays*, polen etkisi, mısır, ıslah popülasyonu

Development of New Apparatus and Method for Generation Full-Sib Populations and Evaluation Pollen Effect in Maize

Abstract

This study was aimed to develop a new pollination method to examine the pollen effect (xenia) in maize. Four different genotypes differing in kernel color and kernel content were used as plant material. The experiment was established in the greenhouse of Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Plant Production Application and Research Unit in September 2020, by the randomized block design. Each genotype was planted in 30 pots. When the plants were at the time of flowering, the traditional controlled pollination method (control) and newly developed methods were applied to develop a 4x4 half diallel set (test). Combining ability and pollen effect calculations were made for single seed weight, protein content and oil content to compare of the results obtained from pollination methods. The similarities and differences of the genotype sets were examined based on protein band analysis in the seeds of the generated sets. According to the analysis of variance, it was determined that genotype, pollination and genotype x pollination interaction were important on the change in the investigated trait. According to the combining ability calculations, it was understood that the general combining abilities of the parent genotypes did not show a significant change in different pollination methods, whereas the results based on the specific combining abilities showed significant differences according to

pollination method used. Similar results were obtained in the pollen effect calculations. It has been evaluated that specific combining ability and pollen effect calculations for hybrids give more robust results in the newly developed method. In protein band analyzes, changes were observed in the classification of hybrid genotypes based on cluster analysis of samples belonging to different pollination methods, except for the parents. This revealed that the protein bands could vary depending on the pollination method in maize.

Key words: *Zea mays*, polen efect, maize, breeding population.

Giriş

Mısır ıslah çalışmalarında uygun genetik kaynakların geliştirilmesi ve muhafazası için kontrollü tozlama yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Mısır ıslah bahçelerinde yaygın olarak kullanılan kontrollü tozlama yöntemleri; kendileme, kardeşleme, toplu tozlama ve melezlemedir (Kahrıman, 2016). Bu yöntemler içerisinde kendileme geleneksel yöntemlerle saf hatların ıslahı aşamasında, toplu tozlama popülasyon niteliği taşıyan materyallerin tohumluk çoğaltımında, kardeşleme belirli genetik durulmuşluğa sahip materyallerin çoğaltımında, melezleme ise istenen hibrit kombinasyonların oluşturulması amacıyla kullanılmaktadır. Kontrollü tozlama yöntemlerinin bitkisel gelişimi etkilediği ve özellikle tohum bağlama, hastalık yayılımı, koçan gelişimi gibi konularda açık tozlamaya bırakılan örneklerden farklılık gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kahrıman ve ark., 2015). Bu farklılıkların yanı sıra kontrollü tozlamasının kullanım gerekçesi farklı bitkilerden ana bitkiye polen bulaşımının engellenmesidir. Bilimsel literatürde polen bulaşımı nedeniyle ortaya çıkan bu etkiye polen etkisi (Xenia) adı verilmektedir (Focke, 1881; Kiesselbach, 1999).

Polen etkisi yabancı döllenmiş bitkilerde önemli bir çalışma konusudur. Bu etkiden yararlanarak hem ıslah hem de yetiştiricilik açısından faydalı yöntemler geliştirilmiştir. Mısırdaki polen etkisi ile tane biyokimyasal içeriğinin değiştiği ve özellikle yağ oranının bu etki ile artırılabilirliği ortaya konulmuştur (Letchwort ve Lambert, 1998). Bu bulgulara dayanarak mısırdaki Top-Cross-High Oil sistemi uygulanmış ve yüksek yağlı bir genotip ile normal mısır hibritinin tohumlarının karıştırılarak ekilmesi sayesinde tane verimi ve yağ veriminin birlikte artırılabilirliği vurgulanmıştır (Weingartner ve ark., 2002). Yine polen etkisi ile ana ebeveynin yağ oranındaki değişimden mısırdaki in vivo katlanmış haploid tekniğinde de yararlanılmıştır. Bu yaklaşımda yüksek yağlı bir indirgeyiciden alınan polenlerle tozlanmış donör materyalin yağ oranındaki değişimden yararlanılarak haploid ve diploid tohum örneklerinin daha güvenilir şekilde ayrılabilirliği gösterilmiştir (Melchinger ve ark., 2014). Polen etkisinin tane biyokimyasal içeriğinde değişikliğe neden olması bu etkiden ıslah çalışmalarında yararlanılabilen olanaklarını da

gündeme getirmiştir. Bu amaçla dilallel deneme desenlerine uygun olarak hazırlanan materyal setlerinde polen etkisinden yararlanılarak protein ve yağ oranı gibi tane kalite özellikleri için ebeveyn ve hibritlerin kombinasyon yetenekleri hakkında değerlendirmeler yapılabileceği belirlenmiştir (Kahrıman ve ark., 2017). Kombinasyon yeteneği hesaplamalarında ebeveynlere ait genel kombinasyon yetenekleri (GCA) ve hibritler için özel kombinasyon yetenekleri (SCA) tespit edilmeye çalışılmaktadır (Yıldırım ve ark., 1979). Bu hesaplamalar farklı hesaplama tekniklerine dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Murray ve ark., 2003). Bu hesaplamalardan mısır ıslah çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerden birisi olan Griffing Diallel yöntemi dört ayrı alt metottan oluşmaktadır (Lorençetti ve ark., 2005). Bu metotlarda kullanılan materyallerin ebeveynler, hibritler ve hibritlerin resiproklular melezlerin kullanılıp kullanılmadığına göre dört ayrı yaklaşım mevcuttur (Nduwumuremyi ve ark., 2013).

Islah çalışmalarında kullanılan genotipler arasındaki moleküler düzeyde farklılıkları belirlemek amacıyla biyokimyasal markörlerden yararlanılmaktadır. Depo proteinlerine yönelik bant analizleri bu amaçla kullanılan belirteçlerdendir. Depo proteinlerinin bu amaçla kullanımını konu edinen çok sayıda araştırma yürütülmüş olup bu çalışmalarda farklı ülkelere ait yerel mısır popülasyonları (İlarslan ve ark. 2001; Iqbal ve ark. 2014; Khan ve ark., 2014; Vivodík ve ark., 2017; Spalekova ve Galova; 2018; Ünlü ve ark., 2018), kendilenmiş hatlarla oluşturulan ıslah setleri (Egesel ve ark., 2013) materyal olarak kullanılmıştır. Ancak, polen etkisiyle depo proteinlerinde farklılık olup olmadığı veya tozlama yönteminin protein bantlarına etkilerini konu edinen herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Akralılık ilişkileri bilinen materyaller üzerinde protein bant analizlerine dayalı çalışmalar ile tozlama yönteminin etkisinin net şekilde ortaya konabileceği düşünülmüştür.

Tane kalitesi üzerine yürütülen ıslah çalışmalarında polen etkisinin kontrol altında tutulması ve uygun tozlama yöntemi ile materyallerin çoğaltılması yüksek öneme sahiptir. Yapılan literatür taramasında kontrollü tozlama yöntemlerinden kendileme yöntemine alternatif

olabilecek farklı yaklaşımların geliştirildiği gözlenmiştir. Bu konuda patente konu olan yaklaşımların hepsi aynı bitkinin tepe püskülünden koçan püskülüne polen aktarımını hedeflemektedir. Polen etkisini konu edinen araştırmalarda kullanılan ana ve baba bitkilerinin farklı farklı bireyler olması polen etkisine yönelik hesaplama sonuçlarını azami derecede etkileyebilecek bir durumdur. Ana ve baba bitkilerin ortak kullanıldığı setler üzerinden hesaplanması polen etkisi hesaplamalarında daha sağlıklı sonuç verebilir. Ancak kontrollü tozlama yöntemlerine yönelik araştırmalarda bu konuyu ele alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yürütülen bu çalışmanın amaçları i) Yeni yöntem ile klasik metot arasında tek tohum ağırlığı, protein içeriği ve yağ içeriği bakımından farklılıkların değerlendirilmesi ve genotipik etkilerin incelenmesi, ii) kombinasyon yeteneği ve polen etkisi hesaplamaları bakımından klasik metot ile yeni yöntem arasındaki farkların irdelenmesi iii) farklı tozlama yöntemlerinden elde edilen örneklerde protein bant dizilerindeki farkların incelenmesidir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada yüksek yağ ve protein içeren iki atdışi-sert genotip, bir at dişi genotip ve bir yüksek antosiyaninli genotip kullanılmıştır. Çalışmada polen etkisinin incelenebilmesi için çiçeklenme tarihleri birbirlerine yakın (60 ile 70 gün arası) olan, tane rengi ve biyokimyasal içeriği bakımından farklılık gösteren genotipler tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan materyaller ile ilgili

bilgiler Çizelge 1’de sunulmuştur. Bu materyaller içerisinde IHO kodlu genotip North Central Regional Plant Introduction Center’dan 2009 yılında Doç. Dr. Fatih Kahrıman’ın doktora tezi için temin edilen araştırma amaçlı kullanım serbesti bulunan hattır. Hya ve B73 hatları Tarla Bitkileri Bölümü’nde yürütülen ıslah çalışmalarında uzun süredir kullanılan ve kullanım serbestliği bulunan hatlardır. CIMGTAIL-P2 hattı ise Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırmalar Merkezi’nden (CIMMYT) araştırma amaçlı olarak temin edilen genotiptir.

Arazi çalışmaları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Çiftliği Bitkisel Üretim Araştırma ve Uygulama Birimi’ndeki kontrollü seralarda yürütülmüştür. Ekim işleminden önce her materyalin çıkışını garanti altına almak için her genotipten 100’er adet tohum ön çimlendirmeye tabi tutulmuştur. Çimlenen tohumlar önce torf bulunduran viyollere alınmış ve 2-3 yapraklı evreye geldiklerinde serada 18’litrelik saksılara şaşırtılmıştır. Gübreleme işlemi ekim öncesi 8 kg/da hesabıyla saksılara fosfor gübresi verilmiştir. Saksılara uygulanan azot miktarı da toprak analizi sonuçlarına göre 18 kg/da hesabı ile iki defada (ekimin ardından ilk 30 günlük periyotta ve çiçeklenmenin 15 gün öncesinde damla sulama sistemi ile) verilmiştir. Sulama işlemi bitkilerin gelişme durumuna göre gerçekleştirilmiştir. Yabancı ot mücadelesi el ile yapılmıştır. Yabancı ot mücadelesi zamanı sera kontrollörlerinde yabancı ot yoğunluğuna göre belirlenmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan ebeveyn genotiplere ait bilgiler

| Genotip Kodu | Özelliği | Temin Edildiği Yer |
|--------------|---|--------------------|
| IHO | Yüksek yağlı beyaz taneli hat | NCRPIC |
| Hya | Yüksek yağlı ve proteinli sarı taneli hat | ÇOMÜ |
| B73 | Normal yağlı ve proteinli elit hat | ÇOMÜ |
| CIMGTAIL-P2 | Yüksek antosiyaninli hat | CIMMYT |

NCRPIC: North Central Regional Plant Introduction Center. CIMMYT: Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırma Merkezi

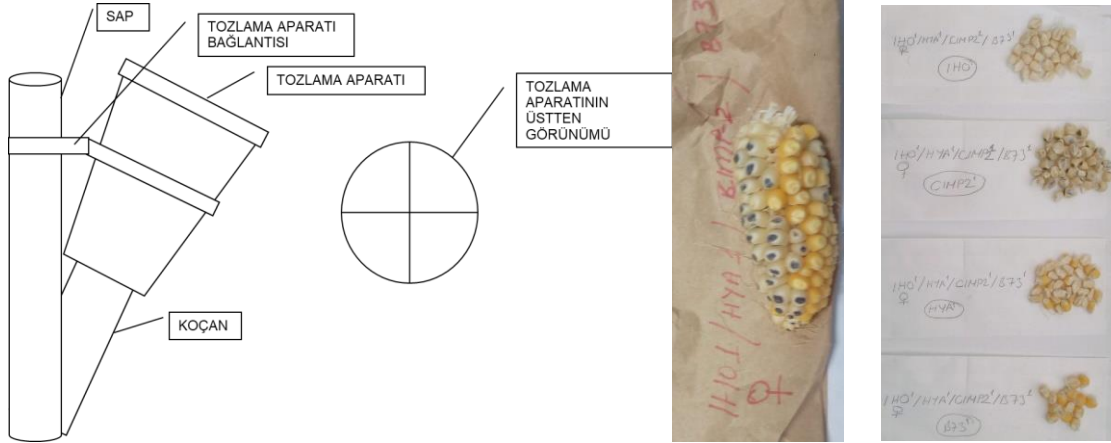
Bu çalışmada geleneksel tozlama yöntemi olarak hatların örneklerinin elde edilmesi amacıyla kendileme, hibrit materyallerin oluşturulması amacıyla ise melezleme tekniğinden yararlanılmıştır. Kontrollü tozlama yöntemleri Kahrıman (2016) tarafından önerilen prensiplere göre gerçekleştirilmiştir. Geleneksel yöntemle 4x4 yarım diallel set oluşturmuş ve bu set kontrol gurubu olarak kullanılmıştır. Geleneksel yöntemde her melezleme iki ebeveyn bitki kullanılarak ve her tekerrürde genotip başına en az 3 adet olacak şekilde yapılmıştır.

Çalışmada geliştirilen tozlama yöntemine uygun aparat plastik malzemeden özel ebatlı bir kabın içerisinde şeffaf dört bölmeli olacak şekilde ayrılmış şekilde üretilmiştir (Şekil 1). Bölmeler

arasında polen bulaşmasını engellemek için aparat dik şekilde asetat malzeme ile ayrılmış ve her bölmenin kenarları ince silikon ile yapıştırılmıştır. Çiçeklenme zamanında kontrollü tozlama yapılacak bitkilerin püskül gelişimin yeterli olması için, bu bitkilerin koçanları koçan püskülü kağıdı ile koruma altına alınmıştır. Püskül çıkışının ardından koçan ucu kesilerek yeknesak püskül gelişimi sağlanmış ve kesim işleminden bir gün sonra bu aparat tozlama yapılan bitkinin koçanına takılmıştır. Bölmeler içerisinde koçan püsküllerinin yeteri kadar gelişmesinin ardından bu bölmelerden birisi tozlama aparatının takıldığı bitkinin kendi çiçek tozu ile, kalan üç bölmenin her biri denemede diğer ebeveyn hatların polenleri ile tozlanmıştır. Bu tozlama işlemi aparat takılan dörderli bitki grupları

ile gerçekleştirilerek, işlem sonrasında her grupta tam kardeş tohumluklar elde edilmiştir. Yani 4'lü gruplardaki her bitki hem baba hem ana olarak kullanılmış ve bu bitkiden toplanan polen diğer üç bitkide tozlama amaçlı kullanılmıştır. Tozlama sırasında bölmelerde kullanılan genotip sırasının karışmaması için tozlama yapılan bitkiler

etiketlenerek, tozlama aparatının bölmelerine aktarılan polen kaynağının ana ebeveyninden başlayarak genotip kodları sırasıyla yazılmıştır. Geliştirilen yöntemle 4x4 yarım diallel set oluşturulmuş ve bu yöntemle elde edilen örnekler test grubu olarak kullanılmıştır.



Şekil 1. Çalışmada geliştirilen tozlama aparatının şematik görünümü ve bu aparatla elde edilen bir koçan örneği ile genotiplere göre ayrılmış taneleri

Çalışmada hem polen etkisinin neden olduğunu değişimlerin yanı sıra tozlama yöntemlerinden elde edilen sonuçların irdelenmesi amacıyla aşağıdaki özellikler incelenmiştir.

Ortalama Tek Tohum Ağırlığı (mg): Çalışmada örneklenen koçanlardaki tohumlar taneleme işleminin ardından tane özelliklerine göre ayrılmış ve ayırım yapılan tüm tohumlar bitki tek tek hassas terazide tartılarak tekerrür ortalaması alınmıştır. Tek tohum örnekleri mümkün olduğunca koçanın her bölgesinden (uç, orta ve son) kısımlarından alınmaya çalışılmıştır.

Protein Oranı (%): Tane protein içerikleri her genotipe ait uygulamalarda CRA (2011a) standart yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

Yağ Oranı (%): Tane yağ içeriği protein oranının belirlenmesinde CRA (2011b) standart yöntemi kullanılmıştır.

Toplam protein ekstraksiyonu, Iqbal ve ark. (2014) tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Her genotipten ayrılan 8-10 adet tohumun ayrıştırılan endosperm örnekleri sıvı azot içinde öğütülerek ve 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpüne 50 mg numune alınmıştır. Proteinler ekstraksiyonu için, her tüpe 950 µl ekstraksiyon tamponu (62.5 mM tris HC1 (pH 6.8)), %2.3 SDS, %5 2-ME, %10 gliserol, %0.1 bromofenol mavisini) ilave edilmiştir. Tüpler 5 dakika vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 1 saat tutulmuş ve daha sonra 3000 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra, üst faz toplanmış ve analiz edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan jel yükleme yapılmadan önce santrifüjde ekstrakte edilen örneklerin üst fazından eppendorf tüplere 300 µl alınmıştır. Üzerine 100 µl 4X yükleme solüsyonu eklenmiş ve örnekler vorteksledikten sonra 95 °C'de 5 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Her bir örnekten 15 µl alınarak ilk kuyucuğa standart devamındaki kuyucuklara da örnekler yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin ayırım işlemi için güç kaynağı 100 V'a ayarlanarak yükleme tamponu içerisindeki mavi boya jelin son kısmına ulaşıncaya kadar koşurma işlemine devam edilmiştir.

Örneklerin ayrımı gerçekleştirildikten sonra jel tankından alınan jel, 60 gr TCA, 1 gr Commasie Brilliant Blue ve 25 ml etanolün saf suyla 500 ml'ye tamamlanan karışım solüsyonuyla gece boyunca çalkalayıcıya bırakılmıştır. Ardından jelin görüntüsü masa üstü tarayıcıda kaydedilmiştir. Elde edilen jel görüntüsündeki bant varlığı ve yokluğu (1/0) GelAnalyzer programında (<http://www.gelanalyzer.com/index.html>) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla jel görüntüsü GelAnalyzer programına yüklenmiş ve bant tespitleri yapıldıktan sonra bantların rölatif mobilite değerleri bu programda hesaplanmıştır. Bu hesaplama, jelle yüklenen ve moleküler ağırlığı/büyüklüğü bilinen protein standardı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler farklı amaçlarla iki ayrı başlıkta hesaplama ve analizlere tabi tutulmuştur. Kullanılan istatistik analizler;

- i) Varyans Analizi Diallel Analizler
- ii) Kümeleme Analizi

Varyans Analizi ve Diallel Analizler: Çalışmada tek tohum ağırlığı ve tane kalite özelliklerine yönelik olarak varyans analizleri R paket programında (R Core Team, 2018) tesadüf blokları deneme desenine uygun varyans analiz modeli ile değerlendirilmiştir. Kantitatif genetik analizlerde Griffing Diallel analizleri ile farklı tozlama yöntemlerinde hatların genel kombinasyon yetenekleri (GCA) ile bu hatlarla oluşturulan melezlerin özel kombinasyon yetenekleri (SCA) belirlenmiştir. Bu hesaplamalar Kahrıman (2020) tarafından geliştirilen BAFR web uygulaması ile Zhang ve ark. (2005) tarafından SAS programı ile için geliştirilen makro yardımıyla yapılmıştır.

Kümeleme Analizi: Protein bant analizi sonuçları ise kümeleme analizi ile irdelenmiştir. Mevcut tozlama yöntemleri ile yeni geliştirilen yöntem aracılığıyla oluşturulan materyallere ait protein bant analizi sonuçları ile UPGMA metoduna dayalı olarak akrabalık dendogramları oluşturulmuştur. Moleküler verilerle oluşturulan akrabalık ağacı R programında (R Core Team, 2018) ape paketi (Paradis ve Schliep, 2018) kullanılarak oluşturulmuştur. Farklı tozlama yöntemlerinden elde edilen akrabalık ağaçlarında aynı düğüm altında sınıflanan genotip grupları karşılaştırılmış ve oluşan alt düğüm sayısı da dikkate alınarak tozlamayöntemleri arasındaki farklar irdelenmiştir. Kıyaslamaların yapılması amacıyla R paket programının dendextend paketi (Galili, 2015) kullanılmıştır. Oluşturulan çıktıda görsel sınıflamanın yanı sıra “karmaşıklık” değerinden de yararlanılmıştır. Karmaşıklık değeri 0 ile 1 arasında değişmekte olup, karşılaştırılan iki kümeleme dendogramında karmaşıklık değerinin 0’a yakın olması kümelemelerin benzer olduğuna, 1’e yakın olması ise iki dendrogram arasında farklılığın yüksek olduğuna işaret etmektedir.

Polen etkisi hesaplamaları Bulant ve ark. (2000) ile Kahrıman ve ark (2017) tarafından önerilen hesaplama yöntemlerine göre gerçekleştirilmiştir. Ebeveynlere ait bireysel polen etkisi ve hibritlere göre özel polen etkisi değerleri, atfedilen çalışmalarda kullanılan formüller yardımıyla belirlenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Tek tohum ağırlığına ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 2’de gösterilmiştir. Birleştirilmiş veriler üzerinden yapılan varyans analizi sonuçları Tozlama, Genotip ve Tozlama×Genotip etkisinin tek tohum ağırlığı üzerine önemli bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Genel varyans analizinde veriler tozlama yöntemlerine göre ayrıştırılarak irdelendiğinde, yine tek tohum ağırlığı bakımından genotipler arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 2). Diallel analizlere yönelik

varyans analizinde GCA ve SCA etkileri hem birleştirilmiş veriler de hem de yöntemlere göre ayrı yapılan analizlerde önemli bulunmuştur. GCA ve SCA etkilerinin tozlama yöntemi ile interaksiyonunun önemli bulunmuş olması, farklı tozlama yöntemlerinde genotiplere ilişkin SCA ve GCA değerlerinde değişimlerin olduğuna işaret etmektedir.

Tek tohum ağırlığına ait ortalama değerler dikkate alındığında, 3 melez dışında (B73×P2, HYA×P2, IHO×B73) tüm genotipler için yeni yöntemden elde edilen ortalamalar kontrol uygulamasından düşük bulunmuştur. Yeni yöntemde ortalama tek tohum ağırlığı değerleri 151.7 ile 303.4 mg arasında bulunurken, kontrol uygulamasında 192.3 mg ile 387.7 mg arasında bulunmuştur. Yeni yöntem ile kontrol uygulamasına ait genel kombinasyon yeteneği hesaplamalarının işaretleri benzerlik göstermiştir. Buna karşın IHO×HYA ve IHO×P2’ye ait özel kombinasyon yeteneği değerlerine ait işaretlerin yeni yöntem ile kontrol arasında zıt yönde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3). Polen etkisi hesaplamalarına ilişkin sonuçlar ebeveynlerden HYA genotipinin polen etkisinin iki yöntem arasında farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Hibritler içerisinde IHO×HYA genotipi için farklı yöntemler arasında özel polen etkisi hesaplamasının işaretlerinin zıt yönde olduğu görülmüştür. Bu bulgular tüm genotiplerde olmasa da bazı ebeveyn ve hibritlerde yeni yöntemin kontrol uygulamasından farklı sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Tek tohum ağırlığı tohum iriliği ile ilgili bir özelliktir. Tohum iriliği daha çok ana ebeveynin genetik özellikleri ile kontrol edildiği kabul edilse de, bu konu henüz tam olarak çözümlenmemiştir (Motto ve ark., 2011). Fizyolojik açıdan tek tohum ağırlığı koçan üzerinde oluşan tohum sayısına ve bitkinin fotosentez üretim kapasitesine bağlıdır. Koçan üzerinde az sayıda tane bağlanması tek tohum ağırlığının artmasına neden olmuş olabilir. Diğer taraftan normal tarla şartlarında yetiştirilen bitkiler ile kontrollü şartlarda (sera) yetiştirilen bitkiler büyüme ve gelişim bakımından aynı performansı gösterememektedir. Yeni yöntemde tek tohum ağırlığının düşük bulunması daha çok kullanılan aparatın etkisiyle koçanda tohum sayısının artmasına bağlanabilir. Dado (1999) mısır tanesinde protein ve yağ oranı ile karbonhidrat içeriği arasında negatif yönde bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Yapılan tozlama uygulamaları veya genotipik etkiler nedeniyle koçanda tane sayısının artışı birim ağırlığın düşüşüne ve dolayısıyla tane başına karbonhidrat depolamasının azalmasına neden olmuş olabilir. Bunun yanı sıra sera şartlarından kaynaklanan nedenlerle tek tohum ağırlığının düşmesi muhtemeldir.

Çizelge 2. Tek tohum ağırlığına ilişkin varyans analiz tablosu

| Varyans Kaynağı | SD | Kareler Ortalaması Birleştirilmiş Veri | SD | Kareler Ortalaması (Yeni Yöntem) | Kareler Ortalaması (Kontrol) |
|-------------------|----|---|----|-------------------------------------|------------------------------------|
| Tozlama | 1 | 29419.6** | - | - | - |
| Tekerrür(Tozlama) | 4 | 159.8 | 2 | 28.9 | 290.6 |
| Genotip | 9 | 17500.8** | 9 | 8933.8** | 11463.2** |
| Tozlama×Genotip | 9 | 2896.2** | - | - | - |
| GCA | 3 | 33883.3** | 3 | 23717.1** | 11807.9** |
| SCA | 6 | 9309.6** | 6 | 1542.20** | 11290.8** |
| GCA×Tozlama | 3 | 1641.8** | - | - | - |
| SCA×Tozlama | 6 | 3523.4** | - | - | - |
| Hata | 36 | 262.7 | 29 | 363.1 | 162.9 |

* ve ** sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 3. Ortalama tek tohum ağırlığına için ortalamalar, kombinasyon yetenekleri ve polen etkisi değerleri

| Genotip | Ortalama | | Genel/Özel Kombinasyon Yeteneği | | Genel/Özel Polen Etkisi | |
|-----------|-------------|---------|---------------------------------|---------|-------------------------|---------|
| | | | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol |
| Ebeynler | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol |
| IHO | 180.7 d | 202.9 c | -17.6** | -20.8** | - | - |
| HYA | 151.7 c | 192.3 c | -40.1** | -20.3** | -24.1 | 72.1 |
| B73 | 200.7 b | 295.0 a | 42.5** | 32.4** | 70.2 | 83.2 |
| P2 | 222.0 a | 233.7 b | 15.2* | 8.6** | 36.0 | 71.6 |
| Hibritler | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol |
| IHOxHYA | 156.5 c | 387.7 a | -10.5 | 47.1** | -24.2 | 72.1 |
| IHOxB73 | 272.2 a | 243.0 d | 22.7* | 37.9** | 91.5 | 115.6 |
| IHOxP2 | 227.6 b | 320.4 b | 5.4 | -36.1** | 47.0 | 17.8 |
| HYAxB73 | 200.7 b | 318.5 b | -26.3* | -38.0** | 49.0 | 50.8 |
| HYAxP2 | 222.0 b | 220.7 d | 22.2* | 63.1** | 70.3 | 128.1 |
| B73xP2 | 303.4 a | 275.0 c | 21.1* | 77.7** | 2.6 | 92.7 |

* ve ** sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

Protein oranına ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4'de sunulmuştur. Genel varyans analizi sonuçlarına göre genotip ve tozlama yöntemi etkisi ile bu etkilere ait interaksiyonun protein oranındaki değişim üzerine etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 4). GCA ve SCA ana etkileri ve bu etkilerin tozlama yöntemi ile interaksiyonu da önemli bulunmuştur. Tozlama yöntemlerine göre ayrıştırılan verilerle yapılan varyans analizi sonuçlarında da protein oranındaki değişime genotip etkisinin önemli bir etkisinin olduğu görülmüştür. GCA ve SCA etkilerine ilişkin kareler ortalamaları kontrol grubunda yeni yöntemden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4). Protein oranlarına ilişkin genotip ortalamalarının, GCA ve SCA değerlerinin, polen etkisi hesaplamalarının yeni yöntem ve kontrol uygulamasına göre farklılıkları Çizelge 4'te gösterilmiştir. Yeni yöntemde protein oranı ortalamaları %11.02 ile %13.07 arasında değişim gösterirken, Kontrol grubunda %9.64 ile 16.07 arasında bulunmuştur. Yeni yöntemde ebeveynlerin sıralaması IHO>B73>P2>HYA şeklinde

olurken, HYA>IHO>P2>B73 şeklinde olmuştur. GCA ve SCA hesaplamaları dikkate alındığında yeni yöntem ile kontrol uygulamaları arasında hem hesaplama ait işaret hem de önemlilik durumu bakımından önemli farklar olduğu görülmüştür. GCA hesaplamaları için HYA ve B73 genotiplerin önemlilik durumunun tozlama uygulamaları arasında farklılık gösterdiğine, B73 genotipinde ayrıca GCA hesaplamasının yönünün de değiştiği anlaşılmıştır. Mezlelere ait SCA hesaplamalarında HYAxP2 ve B73xP2 genotiplerine ait değerlerinin önemlilik durumunun tozlama uygulamalarına göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. HYAxP2 genotipi dışında tüm hibritlerin SCA değerlerine ait işaretin iki tozlama uygulaması arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Polen etkisi hesaplamalarında HYA genotipinin genel polen etkisine ilişkin hesaplama ait işaretin farklı tozlama yöntemlerinde değiştiği görülmüştür (Çizelge 5).

Mısır tohumunda protein içeriği çok gen ile kontrol edilen özelliklerden birisidir. Eklemeli ve dominans gen etkilerinin protein oranının

değişiminde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu durum çevresel etkilerle protein oranının değişmesinin nedenlerinden birisidir. Bu çalışmada protein oranı ile ilgili kombinasyon yeteneği ve polen etkisi hesaplamalarının kullanılan tozlama yöntemine göre önemli bir değişim gösterdiği saptanmıştır. Özellikle hibritlere ilişkin hesaplamalarda tozlama yöntemleri arasında önemli farklar olduğu

gözlenmiştir. Özel kombinasyon yeteneği hesaplamaları için 6 hibritten yalnızca iki genotipe, özel polen etkisi hesaplamalarında ise yalnızca bir genotipe ait değerler farklı tozlama yöntemlerinde benzer işaretli olduğu görülmüştür. Bu durum tozlama uygulamalarına göre ıslah potansiyellerine yönelik hesaplamaların değişebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4. Protein oranına ilişkin varyans analiz tablosu

| Varyans Kaynağı | SD | Kareler Ortalaması Birleştirilmiş Veri | SD | Kareler Ortalaması (Yeni Yöntem) | Kareler Ortalaması (Kontrol) |
|-------------------|----|---|----|--|------------------------------------|
| Tozlama | 1 | 14.8** | - | | |
| Tekerrür(Tozlama) | 4 | 0.08 | 2 | 0.14 | 0.03* |
| Genotip | 9 | 9.37** | 9 | 1.58** | 17.49** |
| Tozlama×Genotip | 9 | 9.71** | - | | |
| GCA | 3 | 17.57** | 3 | 0.67** | 28.8** |
| SCA | 6 | 5.28** | 6 | 2.03** | 11.8** |
| GCA×Tozlama | 3 | 11.9** | - | | |
| SCA×Tozlama | 6 | 8.57** | - | | |
| Hata | 36 | 0.04 | 29 | 0.07 | 0.01 |

* ve ** sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 5. Protein oranı için ortalamalar, kombinasyon yetenekleri ve polen etkisi değerleri

| | Ortalama | | Genel/Özel Kombinasyon Yeteneği | | Polen Etkisi | |
|---------|-------------|---------|---------------------------------|---------|--------------|---------|
| | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol |
| Ebeveyn | | | | | | |
| IHO | 12.19 a | 13.93 b | 0.21** | 1.32** | - | - |
| HYA | 11.13 b | 16.07 a | 0.04 | 0.76** | 0.89 | -0.49 |
| B73 | 12.15 a | 9.64 c | 0.01 | -1.43** | -0.41 | -2.56 |
| P2 | 11.24 b | 10.84 d | -0.26** | -0.64** | -0.40 | -0.66 |
| Hibrit | | | | | | |
| IHO×HYA | 13.07 a | 13.45 c | 1.17** | -1.29** | 0.89 | -0.49 |
| IHO×B73 | 11.48 c | 15.45 a | -0.39** | 2.91** | -0.71 | 1.52 |
| IHO×P2 | 10.64 d | 14.39 b | -0.97** | 1.08** | -1.54 | 0.45 |
| HYA×B73 | 11.02 cd | 9.43 f | -0.69** | -2.56** | -0.11 | -6.64 |
| HYA×P2 | 12.14 b | 12.80 d | 0.70** | 0.04 | 1.01 | -3.28 |
| B73×P2 | 11.49 c | 10.49 e | 0.07 | -0.09* | -0.67 | 0.85 |

* ve ** sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.

Varyans analizi sonuçlarına göre genotip ve tozlama etkisi ile bu etkilerin etkileşimleri ile yağ oranının değiştiği anlaşılmıştır (Çizelge 6). Kombinasyon yeteneklerine ait varyans analizi sonuçlarına göre GCA, SCA ana etkileri ve bu etkilerin tozlama yöntemleri ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkan farklılıkların önemli olduğu saptanmıştır. Tozlama yöntemlerine göre veri setleri ayrıştırıldığında da genotip etkisinin yağ oranındaki değişimde önemli olduğu gözlenmiştir. Yağ oranı ile ilgili GCA ve SCA etkilerinin de önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 6).

Mısır tohumunda yağ yüksek oranda embriyoda depolanmaktadır (Wang ve ark., 2012). Bu nedenle embriyo iriliği ile yağ oranı arasında bir

bağlantının olduğu ileri sürülmektedir. Yağ içeriği aynı zamanda polen etkisi ile önemli ölçüde değişmektedir (Letchwort ve Lambert, 1998; Kahrıman ve ark., 2015). Çalışmamızda yağ oranları üzerinden ebeveynler için hesaplanan GCA değerlerinin farklı tozlama uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmediği görülmüştür. Bu durum GCA hesaplaması ile eklemeli genler arasındaki ilişkiden kaynaklanabilir (Sprague ve Tatum, 1942). Eklemeli genler çevreden fazla etkilenmeyen ve çoğunlukla homozigot allellerin kontrolünde olan genlerdir. Yağ oranının da eklemeli genlerin kontrolünde olduğunu ileri süren farklı araştırmalar mevcuttur. Bu nedenle GCA hesaplamalarında önemli farklı tozlama

uygulamaları arasında önemli bir farkın oluşmadığı düşünülmektedir. Buna karşın özel kombinasyon yeteneği hesaplamalarında hem 6 hibritin 3'ünde hesaplanan SCA değerinin zıt yönde işarete sahip olduğu görülmüştür. Bu durum ise SCA hesaplamalarında dominans genlerin etkisinin önemli olmasına bağlanabilir (Sprague ve Tatum, 1942). Nitekim dominans genlerin çevre ile etkileşimi yüksek olan genler olduğu kabul edilmektedir. Genotiplerin yağ oranı ortalamaları yeni yöntemde %4.21-%10.1 arasında bulunurken, kontrol uygulamasında %3.21-%10.4 arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7). Ebeveynlerin ve F1 hibritlerin yağ oranına göre sıralaması tozlama yöntemlerine farklılık göstermemiştir. Yağ oranı için

GCA etkilerinin önemlilik durumları farklı tozlama yöntemlerinde benzerlik göstermiştir. Benzer şekilde ebeveynlerin GCA hesaplamaların ait işaretlerin aynı yönde olduğu belirlenmiştir. Hibritlerde ise IHO×P2, HYA×B73 ve HYA×P2 melezlerine ait SCA değerlerine ait işaretlerin ters yönde olduğu dikkat çekmiştir. Polen etkisi hesaplamalarında genel polen etkisi B73 genotipinde farklı tozlama yöntemlerinde zıt yönde işarete sahip olmuştur. Hibritlerde ise IHO×P2 ve HYA×B73 melezlerine ait özel polen etkisi hesaplamalarının zıt işaretli olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar polen etkisi hesaplamalarında geleneksel yöntemle yeni yöntem arasında farklılık genotiplere göre değişen farklar olduğunu göstermektedir.

Çizelge 6. Yağ oranına ilişkin varyans analiz tablosu

| Varyans Kaynağı | SD | Kareler Ortalaması (Birleştirilmiş Veri) | SD | Kareler Ortalaması (Yeni Yöntem) | Kareler Ortalaması (Kontrol) |
|-------------------|----|--|----|----------------------------------|------------------------------|
| Tozlama | 1 | 0.081** | - | - | - |
| Tekerrür(Tozlama) | 4 | 0.032* | 2 | 0.045 | 0.02 |
| Genotip | 9 | 36.93** | 9 | 13.93** | 25.16** |
| Tozlama×Genotip | 9 | 2.16** | - | - | - |
| GCA | 3 | 105.3** | 3 | 37.3** | 71.5** |
| SCA | 6 | 2.71** | 6 | 2.20** | 2.02** |
| GCA×Tozlama | 3 | 3.47** | - | - | - |
| SCA×Tozlama | 6 | 1.51** | - | - | - |
| Hata | 36 | 0.01 | 29 | 0.02 | 0.01 |

* ve ** sırasıyla p<0.05 ve p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 7. Yağ oranı için ortalamalar, kombinasyon yetenekleri ve polen etkisi değerleri

| Genotip | Ortalama | | Genel/Özel Kombinasyon Yeteneği | | Polen Etkisi | |
|---------|-------------|---------|---------------------------------|---------|--------------|---------|
| | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol | Yeni Yöntem | Kontrol |
| IHO | 10.1 a | 10.4 a | 1.66** | 1.96** | - | - |
| HYA | 8.02b | 9.95 b | 0.72** | 1.36** | 1.85 | 2.84 |
| B73 | 5.18 c | 5.18 c | -0.93** | -1.08** | 0.52 | -1.02 |
| P2 | 4.42 d | 3.29 d | -1.45** | -2.24** | -0.52 | -2.43 |
| | | | | | Yeni Yöntem | Kontrol |
| IHO×HYA | 9.96 a | 11.2 a | 0.12* | 0.64** | 1.85 | 2.84 |
| IHO×B73 | 8.90 b | 9.40 b | 0.71** | 1.29** | 0.79 | 1.04 |
| IHO×P2 | 8.18 c | 6.58 d | 0.52** | -0.36** | 0.07 | -1.79 |
| HYA×B73 | 8.26 c | 6.88 c | 1.00** | -0.63** | 0.24 | -3.08 |
| HYA×P2 | 7.36 d | 6.31 e | 0.64** | -0.03 | -0.65 | -3.64 |
| B73×P2 | 4.21 e | 3.21 f | -0.87** | -0.69** | -0.97 | -1.87 |

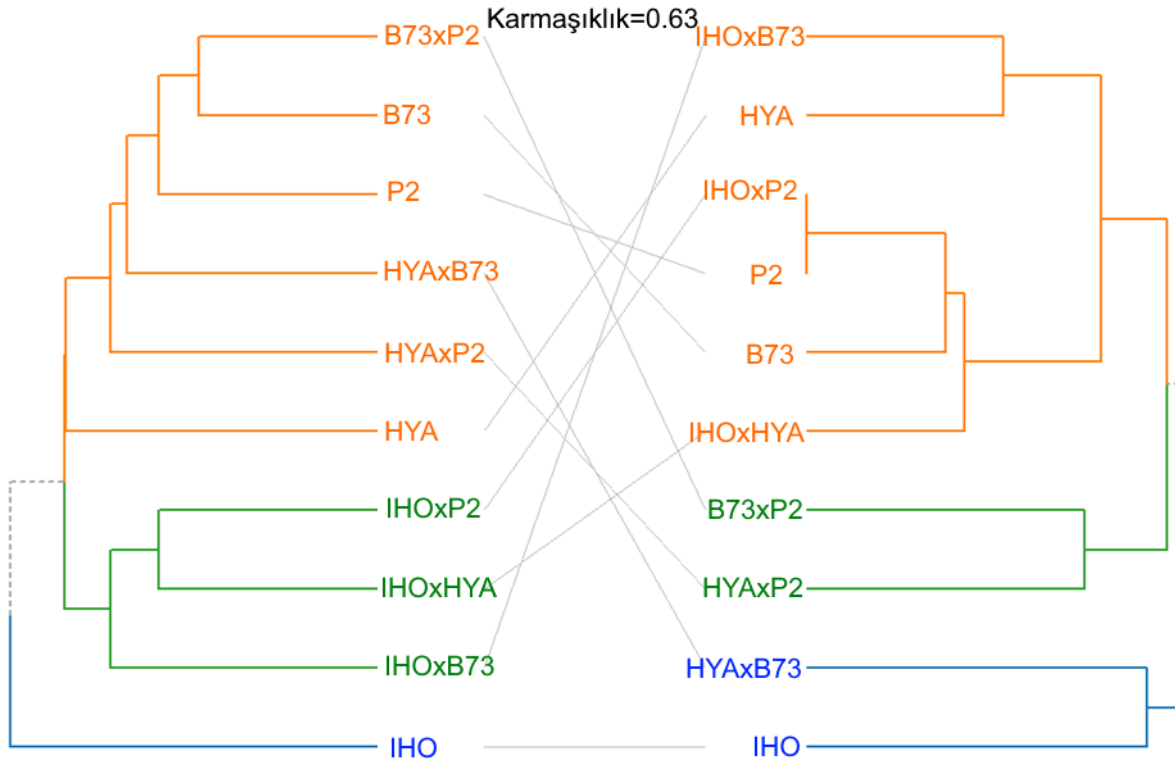
* ve ** sırasıyla p<0.05 ve p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Protein bant analizlerine dayalı karşılaştırmalı dendrogramlar Şekil 2'te gösterilmiştir. Kontrol gurubu ve yeni tozlama yöntemine ait örnekler ile oluşturulan dendrogramlarda 3 'er ana düğüm oluşmuştur. Kontrol gurubunun 1. alt kümede IHO, ikinci alt küme IHO×HYA, IHO×B73 ve IHO×P2 genotipleri,

üçüncü alt küme altında ise HYA, B73, P2, B73×P2, HYA×B73 ve HYA×P2 genotiplerinin yer aldığı görülmektedir. Buna karşın yeni yöntemden alınan örneklerle oluşturulan birinci alt kümede IHO ve HYA×B73 nolu genotipin, 2. Alt kümede B73×P2 ve HYA×P2 melezlerinin, üçüncü alt kümede ise HYA, B73, P2, IHO×B73, IHO×HYA ve IHO×P2

genotiplerinin sınıflandığı görülmektedir (Şekil 2). Ebeveynlerden IHO genotipinin her iki yöntemde de 1. Alt kümede yer aldığı görülmüştür. Bunun yanı sıra HYA, B73 ve P2 genotiplerinin ise her iki dendrogramda 3 nolu kümenin altında yer aldığı izlenmektedir. Bunun dışında kalan 6 genotipin ise iki yöntemde farklı kümeler altında sınıflandığı görülmüştür (Şekil 2). Kümeleme analizindeki sonuçlara göre IHO, HYA, B73 ve P2 kodlu genotiplerin ebeveyn genotipler olduğu ve bu genotiplerin her iki tozlama yönteminde de aynı kümeler altında sınıflanması dikkat çekmiştir. Hibrit genotiplerde ise farklı tozlama yöntemlerinden elde edilen örneklerden izole edilen depo proteinlerine yönelik bant analizlerine dayalı oluşturulan alt kümelerde farklı genotiplerin yer aldığı anlaşılmıştır. Karmaşıklık değeri dikkate alındığında iki dendrogram arasında %63 lük bir farklılık oluştuğunu söylemek mümkündür. Bu değerın 1'e yaklaşması iki dendrogram arasındaki farkın yüksek oluşuna, 0'a yakın olması ise dendrogramlardaki sınıflamanın benzer olduğuna işaret etmektedir.

Protein bant analizlerine göre ebeveyn genotiplere ait protein bant analizi sonuçlarının tozlama yönteminden önemli şekilde etkilenmediği anlaşılmıştır. Buna karşın heterozigot yapıdaki F1 melezlerinde protein bant dizilerine dayalı sınıfların tozlama yöntemine göre değiştiği belirlenmiştir. Bu durum depo proteinlerine ait bantların varlık/yokluk durumlarının polen kaynağı olarak kullanılan bitkilerin değişiminden etkilendiğini ortaya koymuştur. Mısır tohumundaki proteinlerin büyük kısmı (~%60) zein fraksiyonlarından oluşmaktadır ve alkolde çözünen bu gruba prolaminler adı verilmektedir. Zeinler dört alt sınıfa ayrılmıştır bunlar; α - (19 and 22-kDa), β - (15 kDa), γ - (16-, 27-, and 50-kDa), ve δ -zeinler (10- and 18-kDa) olup, farklı genler tarafından kodlanmaktadır (Holding ve Larkins, 2009). Çalışmamızda protein bant analizlerinde bu grupta önemli bir değişimin olmadığı, zein fraksiyonları dışındaki bant dizilerinde ise tozlama yöntemlerine göre değişimlerin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Protein bant analizlerine göre yeni tozlama yöntemi (solda) ve kontrol (sağda) uygulamalarından elde edilen dendrogramların karşılaştırılması.

Sonuç ve Öneriler

Varyans analizi sonuçları çalışmada incelenen özelliklerin hepsinde tozlama x genotip interaksyonu ve kombinasyon yeteneğine interaksyonların önemli olduğu görülmüştür. Bu durum farklı tozlama yöntemlerinden elde edilen

ölçüm sonuçlarının değişkenlik gösterdiğine işaret etmektedir.

Yürütülen bu çalışmanın bazı sınırlılıkları mevcuttur. Öncelikle bu araştırma sera şartlarında yürütülmüş olup, geliştirilen tozlama yönteminin tarla şartlarında da test edilmesinde yarar vardır.

Diğer taraftan çalışmada kullanılan Diallel Analiz yöntemi yarım diallel melezleme desenine dayalı bir yöntemdir. Kahrıman ve ark. (2017) tarafından yürütülen çalışmada kullanılan istatistik yöntemin kombinasyon yeteneği hesaplamaları üzerine önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle geliştirilen tozlama yönteminin respiroklü melezlerin de dahil edildiği setler üzerinde de test edilmesinde yarar vardır. Ayrıca bu aparatın kullanılabilmesi için diğer ebeveynlerden farklı renkte veya tane yapısına sahip en azından bir adet genotipin ebeveyn olarak kullanılması gerekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen tozlama yönteminin polen etkisi hesaplamalarında mevcut yöntemden farklı sonuçlar verdiği anlaşılmıştır. Özellikle polen etkisi hesaplamalarında yeni yöntemin kullanılması halinde, mevcut yöntemde ana ve baba bitkilerin birbirinden bağımsız bireylerden oluşması nedeniyle ortaya çıkabilecek hesaplama hatalarını bertaraf edebileceği değerlendirilmiştir.

Teşekkür: Bu çalışma ÇOMÜ Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından FHD-2020-3383 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü teşekkür ederiz. Ayrıca çalışmada geliştirilen yöntemle ilgili olarak 2021/018210 tarihli ve 2021-GE-799793 nolu başvuru numarası ile Türk Patent ve Marka kurumuna başvuru yapılmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Bulant, C., Gallais, A., Matthys-Rochon, E., Prioul, J.L. 2000. Xenia effects in maize with normal endosperm: II. kernel growth and enzyme activities during grain filling. *Crop Science*, 40, 182-189.
- CRA 2011a. *Corn Refiners Association Method PROTE-01, Protein (Kjeldahl)*. Standard Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association, Inc
- CRA 2011b. *Corn Refiners Association Method FATCR-01, Fat, Crude Hexane (Extractables)*. Standard Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association, Inc .

- Dado, R. G. 1999. Nutritional benefits of specialty corn grain hybrids in dairy diets. *Journal of Animal Science*, 77: 197-207.
- Egesel, C. Ö., Kahrıman, F., Çorbacioğlu, N. 2013. Mısırdaki endosperm protein oranı ve protein fraksiyonlarının değişiminde ebeveyn ve generasyonların etkisi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28, 150-156.
- Focke W. O. 1881. Die Pflanzen-Mischlinge: Ein Beitrag zur Biologie der Gewächse. Borntraeger, Berlin, Germany, p. 510-518.
- Galili, T. 2015. dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*, 31(22), 3718-20
- Holdings, D. R., Larkins, B.A. 2009. Zein Storage Proteins, In: *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*, Kriz, Alan L. and Larkins, Brian A., 269-286, Springer Berlin Heidelberg.
- İlarslan, R., Kaya, Z., Tolun, A. A., Bretting, P. K. 2001. Genetic variability among Turkish pop, flint and dent corn (*Zea mays* L. spp. mays) races: Enzyme polymorphism. *Euphytica*, 122, 171-79.
- İqbal, J., Shinvari, Z.K., Rabbai, M.A. 2014. Investigation of total seed storage proteins of Pakistani and Japanese maize (*zea mays* L.) through SDS-PAGE markers. *Pakistan Journal of Botany*, 46(3), 817-822.
- Kahrıman F., Egesel C.Ö., Aydın T., Subaşı S. 2015. The role of artificial pollination and pollen effect on ear development and kernel structure of different maize genotypes. *Journal of Pollination Ecology*, 15, 6-14.
- Kahrıman F. 2016. Mısırdaki Polen Etkisi ve Bu Etkinin Kontrolünde Uygulanan Yöntemler. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken.
- Kahrıman, F., Serment, M., Haslak, M., Kang, M.S. 2017. Pollen effect (Xenia) for evaluating breeding materials in maize. *Genetika-Belgrade*, 49(1), 217-234.
- Kahrıman F., Yıldırım M., Pınar G., Zekai E., Egesel C.Ö. 2018. Comparison of open and hand pollination methods on combining ability values for kernel quality traits in a maize diallel experiment. *COMU Journal of Agriculture Faculty*, 6, 47-56.
- Kahrıman F. 2020. BAFR: R programı ile bitki ıslahı denemelerinin analizi için geliştirilmiş bir paket ve web uygulaması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7, 1-9.
- Khan, A. H., Khan, N., Minhas, N.M., Ghafoor, A., Rabbani, M.A. 2014. Diversity in seed storage proteins in maize genetic resources: I. variation in alcohol soluble zein protein

- fraction. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16, 1015–1018.
- Kiesselbach, T. A. 1999. The significance of xenia effects on kernel weight of corn, research bulletin (University of Nebraska), Agricultural Experimental Station, 191.
- Letchwort, M. B., Lambert, R. J. 1998. Pollen parent effects on oil, protein, and starch concentration in maize kernels. *Crop Science*, 38, 363–367.
- Lorencetti, C., Carvalho, F. I. F., Benin, G., Marchioro, V.S., Oliveira, A. C., Silva, J. A. G., Hartwig, I., Schmidt, D. A., 2005. Capacidade combinatória e heterose em cruzamento dialélico de aveia (*Avena sativa* L.). *Revista Brasileira de Agrociência*, 11, 143–148
- Melchinger, A. E., Schipprack, W., Friedrich, H.U., Mirdita, V. 2014. In vivo haploid induction in maize: identification of haploid seeds by their oil content. *Crop Science*, 54(4), 1497-1504.
- Motto, M., Hartings, H., Fracassetti, M., Consonni, G. 2011. Grain quality-related traits in maize: gene identification and exploitation. *Maydica*, 56, 291-314.
- Murray, L. W., Ray, I. M., Dong, H., Segovia-Lerma, A. 2003. Clarification and reevaluation of population-based diallel analyses: Gardner and Eberhart Analyses II and III revisited. *Crop Science*, 43, 1930-1937.
- Nduwumuremyi, A., Tongona, P., Habimana, S. 2013. Mating designs: helpful tool for quantitative plant breeding analysis. *Journal of Plant Breeding Genetics*, 1(3). 117-129.
- Paradis, E. ve Schliep K. 2018. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526-528.
- R Core Team 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Spalekova, A., Galova, Z. 2018. Comparison of American and European maize (*Zea mays* L.) protein profiles. *Journal of Central European Agriculture*, 9(2), 453-465.
- Sprague, G .F., Tatum, L. A. 1942. General versus specific combining ability in single crosses of corn. *Agronomy Journal*, 34, 923-932.
- Ünlü, E., Mutlu, E., Polat, M., Çeri, S., Kahriman, F. 2018. Diversity among Turkish maize landraces based on protein band analyses and kernel biochemical properties. *Journal of Crop Improvement*, 32, 175-187.
- Vivodík, M., Petrovičová, L., Balážová, Ž., Gálová, Z. 2017. Genetic variation of maize genotypes (*Zea mays* L.) detected using SDS-PAGE. *Agrobiodiversity*, 1, 11-24.
- Wang, H.-W., Hu, H.-X., Song, T.-M., Chen, S.-J. 2012. Seed traits evaluation from long-term selection of kernel oil concentration in a high-oil maize population KYHO. *Canadian Journal of Plant Science*, 92, 857–866.
- Weingartner, U., Prest, T.J. Camp, K-H., Stamp, P. 2002. The plus-hybrid system a method to increase grain yield by combined cytoplasmic male sterility and xenia. *Maydica*, 47, 127-134.
- Yıldırım, M. B, Öztürk, A. İkiz, F, Püskülcü, H. 1979. Bitki Islahında İstatistik-Genetik Yöntemler. Ege Bölge Ziraî Araştırma Enstitüsü. Menemen, Yayın No: 14.
- Zhang, Y., Kang, M. S., Lamkey, K .R. 2005. DIALLELSAS05: A comprehensive program for Griffing's and Gardner–Eberhart analyses. *Agronomy Journal*, 97, 1097–1106.