

Biyokimyasal Tekniklerin Hububat Islahı ve Teknolojisinde Kullanımı

Hamit KÖKSAL (1), Doç. Dr. Hazım ÖZKAYA (2), Dr. Ayhan ATLI (1)

(1) *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü — ANKARA*

(2) *Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Tek. Böl. — ANKARA*

1. GİRİŞ

Birçok ülkenin ekonomisinde ve tarımsal üretiminde temel rol oynayan tahıllar, insan beslenmesi bakımından da hayati önem taşır. Dünya'da üretilen buğday, pirinç, sorgum ve darının büyük bölümü insan gıdası olarak kullanılır ve bu ürünler farklı ülkelerin diyetine protein kaynağı olarak önemli katkıda bulunurlar. Gelişmekte olan birçok ülkede hububat proteinleri, toplam protein tüketiminin % 70-90'ını oluşturur (Lasztity, 1984). Tahılların önemli bir bölümünde özellikle gelişmiş ülkelerde hayvan beslenmesinde kullanılırlar.

Böyle yaygın olarak tüketilen tahılların birim alandaki verimlerinin, hastalık ve zararlılara dayanıklılığının, kalitesinin ve besleyicilik değerinin artırılması üzerinde çalışmalar yıllardır devam etmektedir. Ayrıca gelişmiş toplumlar tahıllardan yeni tüketim maddeleri üretimi arayışı içindedir. Yukarıda belirtilen hedeflerin gerçekleşmesi için bilim ve teknikteki yeniliklerin hububat teknolojisi alanındaki araştırmalarda kullanılması gerekir. Kullanılabilecek bilimsel yeniliklerden bazıları bilgisayar, «Near infrared reflectans» (NIR) spektroskopisi, «Image analysis» ve biyokimyasal tekniklerdir. Bu yazıda bunlardan biyokimyasal tekniklerin hububat teknolojisinde kullanılma imkanları ele alınacaktır.

2. BİYOKİMYASAL TEKNİKLERİN ÇEŞİTLİ AMAÇLARLA KULLANILMA İMKANLARI

Bilindiği gibi proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitler, biyokimyanın inceleme alanına giren doğal polimerlerdir. Nükleik asitlerden DNA (Deoksiribo nükleik asit), tüm canlılarda kalıtsal özellikleri kontrol eden genlerin yapısını oluşturur. Hücre bölünmesi sırasında çift zincirli DNA molekülünün kendisi ile tamamen aynı olan kopyası yapılır (DNA replikasyonu). Bu işlem her yeni hücrenin normal fonksiyon gösterebilmesi için gereklidir. Daha sonra kromozomlardaki bu DNA'lar kalıp olarak kulla-

nılarak mRNA'lar (messenger RNA= elçi RNA) üretilir (transkripsiyon). Elde edilen mRNA'lar çekirdekte stoplazmaya gider ve bu mRNA'nın baz dizilişi kendisinden sentezlenecek olan proteinlerin amino asit dizilimini yönlendirir. Böylece elde edilen proteinin primer yapısı, yani amino asit diziliş sırası genlerdeki baz diziliş sırası ile belirlenmiş olur.

Canlıların yapısında bulunan proteinler, yapı proteinleri, depo proteinleri, enzimler, hormonlar, immünolojik proteinler gibi birçok şekillerde bulunur. Bu proteinlerden bazıları sentezlendikten sonra çeşitli derecelerde modifikasyona uğrarlar. Hububat depo proteinleri ise sentezlendikten sonra değişime uğramadan endospermde depolandıklarından, bitkinin genetik (kalıtsal) özelliklerini direkt olarak yansıtır. Yani depo proteinlerindeki amino asit diziliş sırası DNA'daki baz diziliş sırasına direkt olarak bağlıdır. Genetik yönden farklı her bireyin, hattın, çeşitin ve ırkın kendine özgü protein imzası (finger print= parmak izi) vardır. Böylece depo proteinlerinin incelenmesi ile ortaya çıkan bilgiler o bireyin genetik olarak tanınmasında parmak izi gibi kullanılabilir. Bu parmak izlerinin elde edilmesi ve incelenmesi ile çeşit saflığının korunması ve kontrolü, yeni çeşit tescili; et, süt ve hububat ürünlerinde hile ve karışıklığın tespiti oldukça kolaylaşacaktır.

3. HUBUBAT PROTEİNLERİNİN İNCELENMESİ

Bilindiği gibi buğday proteinleri; suda çözünen albumin, tuzlu suda çözünen globulin, alkolde çözünen gliadin ve alkali çözeltilerinde çözünen glutenine ayrılmaktadır. Fakat günümüzde hububat proteinleri çok sayıda fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmekte ve çeşitli yeni bilgiler elde edilmektedir. Yeni tekniklerin kullanılması ile yukarıda sözü edilen dört protein grubunun herbirinin tek bir protein olmadığı, örneğin gliadinin jel elektroforez ve jel elektrofokusing tek-

niklerinin kullanılması ile 46'dan fazla farklı bileşene ayrılabilirdiği gösterilmiştir (Wrigley, 1976).

Herhangi bir protein veya protein grubunun yakından incelenebilmesi için önce kendisini içeren doku hücrelerinden ayrılması (ekstraksiyon), sonra elde edilen protein çözeltisinin diğer kalıntılardan izole edilmesi ve arıtılması gerekir. Arıtılan proteinler ise çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile incelenir.

4. BİYOKİMYASAL TEKNİKLERİN HUBUBAT ISLAH PROGRAMLARINDA KULLANILMASI

Tarımda kültür bitkilerinin ıslahı, onları belirli özellikler yönünden geliştirerek insanların ihtiyacını en iyi şekilde karşılayacak yönde değiştirmektir. Bu çalışmalarda verim, kalite, hastalıklara ve zararlılara dayanıklılık, erkencilik, soğuğa, sıcağa ve kurağa dayanıklılık gibi özellikler üzerinde durulmaktadır. Bu özellikler genler tarafından idare edildiğine göre istenilen özelliğe sahip olan bir bitki ile bu özelliğe sahip olmayan bitki arasındaki farklılık gen düzeyindedir. Bitki ıslahının özü istenilen özelliklerdeki bireyleri saptayıp, bu özellikleri kontrol eden genleri belirlemek ve istenilen genlerden mümkün olduğunca çoğunu bir genotip üzerinde toplamaktır. Genleri en kolay belirleme yolu ise protein düzeyindedir. Bu protein, istenilen karakteri kontrol eden genin direkt ürünü olabileceği gibi o genle aynı kromozom üzerinde sıkı bağlantısı olan bir genin ürünü de olabilir.

Hububat kalitesini etkileyen temel faktörler kalıtsal potansiyel ve çevre koşullarıdır. Topraktaki bitki besin maddeleri ve su miktarı, sıcaklık, hastalık ve zararlılar gibi çevre faktörlerinin hububat kalitesi üzerinde etkileri yıllara ve lokasyonlara göre oldukça farklı olmaktadır. Bu nedenle bir çeşit veya çeşit adayının potansiyelinin görülebilmesi için onun birçok lokasyonda ve birkaç yıl boyunca incelenmesi gereklidir.

Çeşit geliştirme programlarında çok değişik aşamalarda materyalin kalitesinin belirlenebilmesi için çeşitli testler uygulanır. Bunlardan erken generasyon materyali, yani açılan materyal hem sayıca çok fazla ve hemde

miktarca yetersiz olduğundan genellikle sadece bir lokasyonda denenir ve tek lokasyon bulgularına göre kalite hakkında tam olarak fikir edinilemez. Erken generasyon materyalinde uygulanacak analiz yöntemi; az miktarda numune ile çalışmalı, ucuz, hızlı ve hassas olmalıdır. Ayrıca seleksiyonda esas alınacak kalite kriterinin ise son ürün kalitesi hakkında fikir vermesi ve materyaldeki genetik farklılığı ortaya koyması gerekir. İşte bu ihtiyaca biyokimyasal teknikler cevap verebilmektedir.

Klasik usullerin aksine, biyokimyasal tekniklerle genetik potansiyel direkt olarak belirleneceği için materyali birçok yer ve yılda incelemek gerekmez. Tek bir örnekte veya tek bir hububat tanesinde kalıtsal potansiyeli görmek mümkündür. Hatta bir hububat tanesi ikiye bölünüp endosperm tarafı incelemeye alınıp, embriyo tarafı yetiştirilerek genetik yapı korunmuş ve devam ettirilmiş olur. Böylece çok lokasyonda ve birkaç yıl deneme kurmadan materyalin kalite potansiyeli belirlenmiş olur.

4.1. Biyokimyasal Yöntemlerle Çeşit Belirlenmesi (Varietal Identification)

Yakın bir geçmişe kadar çeşitleri belirlemek için fenol testi veya gözle morfolojik özelliklere göre, ayırım yapılmakta idi. Fakat bu yöntemlerle çeşit belirlenmesi yanıltıcı olmaktadır. Çünkü farklı çeşitler benzer morfolojik özelliklere sahip olabilir, veya bunların fenol testi sonuçları aynı olabilir. Bu nedenle çeşitler, arasındaki genetik farklılığı ortaya koyan biyokimyasal yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler, birçok ülkede;

- Çeşit belirlenmesi (Varietal identification)
- Çeşit tescilli ve sertifikasyonu
- Çeşit saflığının korunması
- Saf tohum yetiştirme
- Aynı fenotipe sahip farklı genotiplerin ayrılması
- Pedigri araştırması
- Islahçı hakları (Breeders'rights)nin korunması
- Islah materyalindeki ileri hatların homojen/heterojen olduğunun tetkiki, yani arılığının ve durulmasının belirlenmesi gibi birçok işlemde kullanılmaktadır.

Buğdayda çeşit belirlemede yaygın olarak kullanılan metotlardan birisi Kanada'lı iki araştırmacı tarafından geliştirilmiş ve bu metod birçok çeşite uygulanarak elde edilen gliadin bantlarına yeni bir adlandırma sistemi önerilmiştir (Bushuk ve Zillman, 1978). Aynı araştırmacılar bu yöntemle elde edilen elektroforegram bant desenlerinin çevreden, yıldan ve protein miktarından etkilenmediğini yaptıkları diğer araştırmalarla göstermişlerdir (Zillman ve Bushuk, 1979 a). Daha sonra yapılan araştırmalarda çeşitlerin elektroforegram formüllerinin kataloğu çıkarılmış (Zillman ve Bushuk, 1979 b), ve çeşit identifikasyonu için hazırlanan elektroforegramların densitometrik kurveleri çizilmiş; bu kurveleri birbirine ekleyip çıkarabilecek bilgisayar programları hazırlanmıştır (Sapirstein ve Bushuk, 1985). Böylece bir melezin bu şekilde hazırlanan kurvesinden bilinen ebeveyne ait olan kurve çıkarıldığında bilinmeyen ebeveyne ait kurve elde edilmekte ve daha önce hazırlanan çeşitler kataloğu yardımıyla bilinmeyen ebeveyn tahmin edilebilmektedir. Benzer şekilde bir karışımda bulunan iki buğday çeşiti ve bunların oranlarında bulunabilir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalara paralel çalışmalar birçok ülkedeki çeşitli araştırmacı gruplarınca yapılmıştır ve bu alanda çalışan bazı araştırmacılar geliştirdikleri metodların çeşit belirlemede etkinliğini incelemiştir. Bu araştırmacılar % 6 lık poliakrilamid, % 10 veya % 12 lik nişasta jeli, % 3-27 gradient poliakrilamid jeli ve % 3-15 gradient poliakrilamid jeli kullanmış ve en uygun olanın yukarıda bahsedilen Bushuk ve Zillman'ın poliakrilamid jel konsantrasyonu % 6 olan metodu olduğuna kadar vermişlerdir (Autran ve ark., 1979).

Çeşit belirlenmesi gliadin elektroforez yöntemi dışında izoenzim elektroforez ile de yapılmaktadır. İzoenzim terimi, bir enzimin aynı organizmada bulunan ve substrat spesifitesi aynı veya benzer olan formlarını ifade eder. Çok sayıda izoenzim sistemi bitkiler arasındaki genetik, biyokimyasal, fizyolojik vb. farklılıkları kalitatif ve kantitatif olarak belirlemede kullanılmaktadır. Esteraz izoenzimleri bu amaçla en yaygın olarak kullanılan genetik markörlerdir. Çünkü izoenzimlerin belirlenmesi kolay

olup hemen hemen her zaman varyasyon gösterirler. Bu nedenle yukarıda belirtilen gliadin elektroforez yöntemi gibi çeşit belirlemede ve benzeri çalışmalarda kullanılmaktadır.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography = yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) tekniğininde çeşit belirlenmesinde kullanılabilceği ve bu teknikle ortalama 1 saatte bir analiz yapılabileceği bildirilmiştir (Bietz ve ark., 1984). Daha sonra bu metod aynı laboratuvar-da geliştirilerek 10-15 dakikada bir analizi tamamlayabilecek hale getirilmiştir (Bietz ve Cobb, 1985). Ayrıca bu yöntemle buğday çeşitlerinin belirlenmesinin otomatik hale getirilebileceği ve bilgisayarla kontrol edilebileceği belirtilmiştir.

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin dışında, immünolojik yöntemlerle de istenilen bir karakteri kontrol eden ve bu karakterle sıkı bağlantısı saptanmış olan proteinlerin herhangi bir genotipte bulunup bulunmadığı belirlenebilir ve antikor ıslahcının elinde güçlü bir seleksiyon aracı olarak kullanılabilir.

5. BİYOKİMYASAL METODLARIN HUBUBAT TEKNOLOJİSİNDE ve BUĞDAY KALİTESİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANIMI

5.1. Makarnalık Buğday Kalitesinin Belirlenmesi

Çeşitli laboratuvarlarda durum buğday çeşitlerinde gliadin elektroforegram bant desenleri ile makarnalık kalitesi arasında önemli ilişkiler bulunmuştur.

Fransa'da bir grup araştırmacı (Damidaux ve ark., 1978) 75 adet durum buğday çeşitinde spesifik bir elektroforez yöntemi ile elde edilen protein bantları dağılım deseni ile glutenlerinin viskoelastik özelliklerini karşılaştırmışlar ve aşağıdaki sonuçlara varmışlardır.

— 45 nolu δ — gliadin fraksiyonu kuvvetli gluten özellikleri ile bağlantılı olup, bu nedende bu bantı içeren çeşitlerin makarnalarının pişme kalitesi yüksektir.

— 42 nolu δ — gliadin fraksiyonu ise zayıf gluten özellikleri ile bağlantılı olup, bu bantı içeren çeşitlerin makarnalarının pişme kalitesi düşüktür.

Bu ilişki dünyanın çeşitli kısımlarından gelen 113 buğday çeşitinde (Damidaux, 1979); Kanada buğdaylarında (Kosmolak ve ark., 1980) ve Avustralya buğdaylarında da (Du Cros ve ark., 1982) doğrulanmıştır.

Ayrıca makarnalık buğday çeşitlerinin kalite potansiyeli ile ilgili olan tüm elektroforetik protein bileşenlerini kodlayan genlerin 1 B kromozomunun kısa kolunda (1B_s) bulunduğu belirtilmiştir (Autran ve ark., 1981). Daha sonra Burnouf ve Bietz (1984) 42 ve 45 nolu bantlar ve durum buğday kalitesi arasındaki ilişkiyi HPLC tekniği ile de belirleyip kaliteli çeşit ve hatların bu teknikte kolay ve hızlı şekilde belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

5.2. Ekmeklik Buğday Kalitesinin Belirlenmesi

Jel filtrasyon yöntemi ile buğday proteinleri incelendiğinde yoğurma süresi uzun ve ekmeklik kalitesi yüksek olan çeşitlerin yüksek molekül ağırlığına sahip glutenin fraksiyonunun kalitesiz çeşitlerinkinden daha fazla olduğu çeşitli araştırmalarda görülmüştür (Huebner ve Wall, 1976).

Bir grup Hollandalı araştırmacı yüksek molekül ağırlığına sahip buğday gluteninin örneklerini SDS PAGE yöntemi ile incelemiş ve 3+10 subunit kombinasyonu ve 2* subunitinin

ekmeklik kalitesi üzerinde kesin olarak pozitif etkisi bulunduğunu belirtmişlerdir (Moonen ve ark., 1983). Fransa'da iki araştırmacıda 70 buğday çeşitinde elektroforezde çeşitli protein bantları ile alveograf değerlendirme kriterleri arasında önemli ilişki bulunmuş ve W ve L değerleri ile arasında pozitif ilişki bulunan protein bantlarını ihtiva eden çeşitlerin ebeveyn olarak kullanılması ile kalitenin artırılabilirliği sonucuna varmışlardır (Branlard ve Dardevet, 1985).

6. SONUÇ

Bu yayında hububat ıslahında ve kalitesinin belirlenmesinde kullanımı anlatılan biyokimyasal yöntemler ayrıca gıda ve yem kontrol laboratuvarlarında hile ve karışımın belirlenmesinde kullanılmaktadır. Örneğin bu yöntemlerle buğday ununa karıştırılan çavdar unu, makkarna yapımında kullanılan durum buğdayına karıştırılan ekmeklik buğday belirlenebilmektedir (Felliet ve Kobrehel, 1974).

Sonuç olarak uzun zaman gerektiren ve pahalı olan ıslah çalışmalarında hassas ve tek tanede dahi uygulanabilen biyokimyasal yöntemlerden gelecekte yaygın olarak yararlanılacaktır. Bu yöntemler ayrıca genetik farklılığın söz konusu olduğu diğer çalışma alanlarında analiz yöntemi olarak klasik analiz yöntemlerini destekleyici ve pekiştirici rol oynayacaktır.

LİTERATÜR

- AUTRAN, J.C., BERRIER, R., JEANJEAN, M. F., 1981. New Data on the Chemical and Genetic Composition of Durum Wheat Gluten Proteins. 66 th Annual AACC meeting, Denver. (Abstract).
- AUTRAN, J.C., BUSHUK, W., WRIGLEY, C. W., ZILLMANN, R., 1979. Wheat Cultivar Identification by Gliadin Electrophoregrams. IV. Comparison of International Methods. Cereal Food Worlds, 24 (9): 471-475.
- BIETZ, J.A., BORNNOUF, T., COBB, L.A., WALL, J.S., 1984. Wheat Varietal Identification and Genetic Analysis by RP HPLC. Cereal Chem. 61: 129-135.
- BIETZ, J.A., COBB, L.A., 1985. Improved Procedures for Rapid Wheat Varietal Identification by RP-HPLC of Gliadin. Cereal Chem. 62: 332-339.
- BRANLARD, G., DARDEVET, M., 1985. Diversity of Grain Protein and Bread Wheat Quality II. Correlation between HMW Subunit of Glutenin and Flour Quality Characteristics. J. of Cereal Sci. 3: 345-354.
- BURNNOUF, T., BIETZ, J.A., 1984. RP-HPLC of Durum Wheat gliadins: Relationships to Durum Wheat Quality. J. Cereal Sci. 2: 3-5.
- BUSHUK, W., ZILLMAN, R.R., 1978. Wheat Cultivar Identification by Gliadin Electrophoregrams. I. Apparatus, Method and Nomenclature. Can. J. Plant Sci. 58: 505, 515.
- DAMIDAUX, R., 1979. Nouveaux critères de sélection pour l'amélioration de la qualité

- culinaire du blé dur. Thèse. Université des sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- DAMIDAUX, R., AUTRAN, J.C., GRIGNAC, P. and FEILLET, P., 1978. Mise en évidence de relations applicables en sélection entre l'électrophorégramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de *Triticum durum*. DESF. C.R. Acad. Sci. Paris, Série D 287, 701-704.
- DU CROS, D.L., WRIGLEY, C.W., and HARE, R.A., 1982. Prediction of Durum Wheat Quality from Gliadin Protein Composition. Aust. J. Agric. Res. 33: 429-442.
- FEILLET, P., KOBREHEL, K., 1974. Determination of Common Wheat Content in Pasta products. Cereal Chem. 51: 203-209.
- HUEBNER, F.R., WALL, J.S. 1976. Fractionation and Quantitative Differences of Glutenin from Wheat Varieties Varying in Baking Quality. Cereal Chem. 53, 253-268.
- KOSMOLAK, I.G., DEXTER, J.E., MATSUO, R. R., LEISLE, D., MARCHYLO, B.A., 1980. A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregrams. Can. J. Plant Sci. 60: 427-432.
- LASZITTY, R. 1984. The Chemistry of Cereal Proteins. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- MOONEN, J.H.E., SCHEEPSTRA, A., GRAVELAND, A., 1983. The Positive Effects of the High Molecular Weight Subunits 3+10 and 2* Glutenin on the Breading Quality of Wheat Cultivars. Euphytica. 32: 735-742.
- SAPIRSTEIN, H.D., BUSHUK, W., 1985. Computer-Aided Analysis of Gliadin Electrophoregrams. II. Wheat Cultivar Identification and Class Comparisons. Cereal Chem. 62: 377-392.
- WRIGLEY, C.W., 1976. In «Isoelectric Focusing» (N. Catsimpolas, ed.), pp. 93-117. Academic Press, New York and London.
- ZILLMAN, R.R., BUSHUK, W., 1979 a. Wheat Cultivar Identification by Gliadin Electrophoregrams. II. Effects of Environmental and Experimental Factors on the Gliadin Electrophoregram. Can. J. Plant Sci. 59: 281-286.
- ZILLMAN, R.R., BUSHUK, W., 1979 b. Wheat Cultivar Identification by Gliadin Electrophoregrams. III. Catalogue of Electrophoregram Formulas of Canadian Wheat Cultivars. Can. J. Plant Sci. 59: 287-298.