



**SARIMSAKTA DEPOLAMA SÜRESİNCE TIAMİN
BİYOSENTEZİNDE GÖREV ALAN *THIC* GENİNİN
İFADE DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMİNİN
BELİRLENMESİ**

Saime KOÇÇAT



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SARIMSAKTA DEPOLAMA SÜRESİNCE TİAMİN BİYOSENTEZİNDE
GÖREV ALAN *THIC* GENİNİN İFADE DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMİNİN
BELİRLENMESİ**

Saime KOÇÇAT

Prof. Dr. Meryem İPEK
(Danışman)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

Bursa-2016
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Saime KOÇÇAT tarafından hazırlanan “Sarımsakta Depolama Süresince Tiamin Biyosentezinde Görev Alan *THIC* Geninin İfade Düzeyindeki Değişiminin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Başkan: Prof. Dr. Meryem İPEK
Uludağ Üniversitesi - Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK
Uludağ Üniversitesi - Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sergül ERGİN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi - Ziraat Fakültesi,
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
14/06/2016

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13/06/2016

İmza

Saime KOÇÇAT

ÖZET

Yüksek Lisans

SARIMSAKTA DEPOLAMA SÜRESİNCE TİAMİN BİYOSENTEZİNDE GÖREV ALAN
THIC GENİNİN İFADE DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Saime KOÇÇAT

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Sarımsak (*Allium sativum L.*) uzun yıllardan beri insan beslenmesinde ve sağlığında önemli bir yere sahip olmuştur. Yetiştiriciliği dışleri yardımıyla yapılan bu bitkide dış dormansisi önemli bir gelişim basamağıdır. Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı sarımsak başlarında düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı koşullarında depolama süresince tiamin biyosentezinde görev alan *THIC* geninin göreceli ifade düzeyindeki değişimin gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) analizleri ile belirlenmesidir. Tez çalışmasında geçici bir genotip olan Kastamonu sarımsağı ve erkenci bir genotip olan PI515971 sarımsağına ait başlar 12 hafta süreyle düşük sıcaklık (4°C) ve oda sıcaklığında (21°C) depolanmıştır. Örneklemeler depolama başlangıcında ve depolama süresince dört hafta aralıklarla yapılmıştır. Elde edilen örneklerde toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra *THIC* geninin ifade düzeyindeki değişimler aktin geni referans alınarak RT-PCR analizleri ile belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre, her iki genotipte de *THIC* genin göreceli ifade düzeyi 4°C'de depolamada belirgin şekilde artmıştır. PI515971 genotipinin başlangıç örneklerinde 1,60 olan gen ifade düzeyi, 4°C'de 12 hafta depolamadan sonra yaklaşık 25 kat artarak 40,58 düzeyine çıkmıştır. Bu genotipin 21°C'de depolanan örneklerinde ise göreceli gen ifade düzeyi 4 hafta depolanan örneklerde başlangıç örneklerine (1,60) göre yaklaşık 2,5 kat artmış, ancak 12 hafta depolama sonuna kadar bu seviyede kalmıştır. Kastamonu genotipinde ise başlangıçta 0,78 olan *THIC* gen ifadesi 4°C'de 12 hafta depolanan örneklerde 19,61 düzeyinde belirlenmiştir. Bu genotipin 21°C'de depolanan örneklerinde ise başlangıca göre *THIC* geninin göreceli ifade düzeyinde anlamlı bir artış belirlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, sarımsakta dormansinin kırılmasında önemli bir rolü olan düşük sıcaklığın bitkilerde birçok metabolik süreçteki enzimlerin ko-faktörü olarak kullanılan tiaminin sentezinde de önemli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile tiamin biyosentezinde görev alan bir enzimi kodlayan *THIC* geninin ifade düzeyinin incelenmesi yapılarak sarımsakta dormansinin kırılması sürecinde gen ifadesi ilk kez belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular sarımsakta dormansi ve vernalizasyon mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

Anahtar sözcükler: Gen ifadesi analizi, *THIC* geni, tiamin, *Allium sativum L.*, RT-PCR
2016, vii + 36 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF CHANGES IN EXPRESSION LEVEL OF *THIC* GENE INVOLVED IN THIAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY DURING STORAGE IN GARLIC

Saime KOÇÇAT

Uludağ University
Graduate School of Natural And Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Meryem İPEK

Garlic (*Allium sativum L.*) has an important role on human nutrition and health for many years. Production of garlic is done by using cloves and clove dormancy is an important development stage in this crop. The purpose of this master thesis is to determine changes in relative expression level of *THIC* gene which involves in thiamine biosynthesis pathway during storage under low temperature and room temperature conditions in garlic bulbs with Real Time PCR (RT-PCR) analyses. Bulbs of Kastamonu Garlic, which is a late maturing genotype and PI515971 which is an early maturing genotype, were stored at low temperature (4°C) and room temperature (21°C) for 12 weeks. Sampling was done at pre-storage and four weeks intervals during storage. After extraction of total RNA and cDNA synthesis from the samples of the genotypes, changes in expression level of *THIC* gene were determined with RT-PCR analysis by using actin gene as internal control.

According to the results obtained in this study, relative expression level of *THIC* gene significantly increased in both garlic genotypes at 4 °C storage. While relative gene expression level of PI515971 genotype was 1,6 in pre-storage samples, it was about 25 times higher with a 40,58 expression level after 12 weeks storage at 4°C. On the other hand, relative gene expression level of PI515971 genotype after four weeks storage at 21 °C was about 2,5 times higher than the pre-storage one and then it remained unchanged. While *THIC* Gene expression level of Kastamonu garlic was 0,78 at pre-storage samples, it increased to 19,61 after 12 weeks storage at 4 °C. However, there weren't any significant increase in the 21°C storage samples of this genotype. These results show that low temperature which has an important role on breaking dormancy in garlic is also essential for synthesis of thiamine which is the co-factor of enzymes involved in important metabolic processes in most of the plants.

In this research, gene expression during the dormancy breakage period in garlic was determined first time by analyzing expression level of *THIC* gene coding an enzyme that is a part of thiamin biosynthesis. The results obtained from this study could make contributions to explore mechanisms of dormancy and vernalization in garlic.

Key words: Gene expression analysis, *THIC* gene, thiamine, *Allium sativum L.*, RT-PCR
2016, vii + 36 pages

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında en büyük emeğe sahip, Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle hem tezin gelişimine hem de kişisel gelişimime büyük katkıda bulunan danışmam hocam Sayın Prof. Dr. Meryem İPEK'e çok teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü kurarak Yüksek Lisans eğitimimize başlamamızda ve bu süreçte en iyi şekilde gelişim göstermemizde en büyük katkıyı sağlamış olan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle her türlü desteği sağlamış olan Sayın Doç. Dr. Ahmet İPEK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımını esirgemeyen ve katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Asuman CANSEV'e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitim süresince her zaman yanımda olan ve destekte bulunan Günay YILDIZ'a, Büşra DİDİM'e, Sinem DENİZ'e, Yusuf Sercan TEMEL'e, Özgen ÖZ'e ve Ozan SARCAN'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca bana her türlü destekte bulunan ve her zaman iyi yerlere gelmem için emek veren annem Ayşe KOÇÇAT'a, babam Münür KOÇÇAT'a ve abim Taner KOÇÇAT'a çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimime başlamamda ilk adımı atmamı sağlayan daha sonrasında hem Lisans hem de Yüksek Lisans süresince her zaman destek olan Sayın Ali ENİNANÇ'a çok teşekkür ederim.

1130228 numaralı proje kapsamında tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK-TOVAG'a teşekkür ederim.

Saime KOÇÇAT
13/06/2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
2.1. Sarımsakta Dinlenme Fizyolojisi.....	7
2.2. B1 Vitamininin Stresle İlişkisi.....	9
2.3. Gerçek Zamanlı PCR.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Bitki Materyali.....	13
3.2. RNA İzolasyonu.....	13
3.3. cDNA Sentezi.....	14
3.4. Primer Tasarımı.....	16
3.5. Gerçek Zamanlı PCR.....	16
3.6. Kantitatif RT-PCR Sonuçlarının Analizi.....	18
3.7. İstatistiksel Analiz.....	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Gerçek Zamanlı PCR.....	19
4.2. Morfolojik İnceleme.....	20
4.3. İstatistik Veriler.....	23
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	36

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	alfa
β	beta
Δ	delta
Ha	hektar alan
Hg	hektogram
ng	nanogram
μ g	mikro gram
μ l	mikro litre
$^{\circ}$ C	santigrat derece
%	yüzde

Kısaltmalar

ABA	Absisik asit
AIR	5-aminoimidazol
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
F	Forwad
gDNA	Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
GA	Giberallik asit
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
HET-P	4-metil-5-(2-hidroksietil) tiyazol monofosfat
HMP-P	Hidroksimetil-pirimidin monofosfat
HPRT	Hypoxantine-guanine fosforibosil transferaz
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
mRNA	mesajcı Ribo Nükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
PCR	Polymerase Chain Reaction
Q-RT-PCR	Quantitation Real-time Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
rt-PCR	reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
R	Reverse
RNA	Ribo Nükleik Asit
SAR	Sistemiksel edinilen dayanıklılık
TDP	Tiamin difosfat
TMP	Tiamin monofosfat
TMP-PPase	Tiamin monofosfat pirofosforilaz
TPP	Tiamin pirofosfat
TPK	Tiamin pirofosfokinaz
CT	threshold cycle
TÜBİTAK -TOVAG	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Tarım Ormanlık Ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. PI515971 sarımsak genotipi 4°C örneğine ait RT-PCR veri görüntüsü. (a: 12. hafta; b: 0. hafta).....	19
Şekil 4.2. PI515971 sarımsak genotipi 21°C örneğine ait RT-PCR veri görüntüsü. (a: 12. hafta; b: 0. hafta).....	20
Şekil 4.3. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde 4°C ve 20°C’de 0., 4., 8. ve 12. haftalardaki diş ve diş içindeki sürgün uzunluğundaki değişimler...	22
Şekil 4.4. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve sürelerle göre <i>THIC</i> geni göreceli gen ifade düzeyi.....	26



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1: Real-time PCR’da kullanılan <i>THIC</i> ve aktin primerleri.....	16
Çizelge 3.2: LightCycler 480 II cihazında uygulanan koşullar.....	17
Çizelge 4.1. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve sürelerle göre <i>THIC</i> geni göreceli gen ifade düzeyi.....	25
Çizelge 4.2. PI515971 sarımsak genotipinin <i>THIC</i> geni ifade düzeyinin depolama sıcaklığı ve sürelerle göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksiyonları...	27
Çizelge 4.3. Kastamonu sarımsak genotipinin <i>THIC</i> gen ifade düzeyinin depolama sıcaklığı ve sürelerle göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksiyonları....	28



1.GİRİŞ

Sarımsak (*Allium sativum L*)'ın da içinde yer aldığı *Allium* cinsi, angiospermiler (kapalı tohumlu) için yapılan ilk sınıflandırmada *Lilliaceae* familyasında yer almıştır. Daha sonrasında yapılan incelemelerle çiçek yapısından dolayı *Amaryllidaceae* familyasında sınıflandırılmaya başlanmıştır. Monokotiledonların (tek çenekli) en son sınıflandırılmasında ise *Allium* ve yakın akrabaları *Alliaceae* familyasında yer almışlardır (Brewster 1990).

Sarımsak, uzun yıllardan beri insan beslenmesinde ve sağlığında önemli bir yere sahiptir. Keskin tadı nedeniyle yemeklere aroma verici ana baharatlardan (Ade-Ademilua ve ark. 2009) biri olarak kullanılmasının yanı sıra antibakteriyel ve antiseptik özelliklerinden dolayı bulaşıcı hastalıkların tedavisinde ve inme ve aterosklerozu önlemede geleneksel ilaç olarak çok eski tarihlerden bu yana kullanıldığı bilinmektedir (Bandara ve ark. 1999). Ayrıca hiperkolestromik etki ile kandaki kolesterol seviyesini düşürmede (Rahman ve ark. 2006), mikrobiyal ve fungal hastalıkların yanı sıra diğer birçok hastalığın kontrol ve tedavisinde de tıbbi önemi bulunmaktadır (Ade-Ademilua ve ark. 2009).

Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) sitesinden alınan 10 yıllık (2004-2014 yıllarına ait toplam üretim) verilere göre Dünya sarımsak üretiminin %90,5'i Asya, %3,8'i Avrupa, %3,2'si Amerika ve %2,6'sı Afrika kıtasında gerçekleşmektedir. En çok üretim yapan beş ülke Çin (159 699 800 ton), Hindistan (8 990 570 ton), Kore Cumhuriyeti (3 462 395 ton), Rusya Federasyonu (2 371 883 ton) ve Mısır (2 367 879 ton)'dır. En çok verim alan 3 ülke ise Mısır (2 456 951 Hg/Ha), Ürdün (2 366 146 Hg/Ha) ve Özbekistan (2 342 075 Hg/Ha)'dır (Anonim 2014).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre Türkiye illerinin, kuru sarımsak ekim alanları sıralamasında 24 000 dekar alan ile birinci sırada Kastamonu, 12 357 dekar alan ile ikinci sırada Kahramanmaraş, 9 325 dekar alan ile üçüncü sırada Aksaray, 8 992 dekar alan ile dördüncü sırada Balıkesir yer almaktadır. İllere göre kuru sarımsak

üretim miktarına bakılacak olunursa, 23 328 ton ile birinci sırada Kastamonu, 12 324 ton ile ikinci sırada Kahramanmaraş, 11 007 ton ile üçüncü sırada Gaziantep ve 6 545 ton ile dördüncü sırada Aksaray yer almaktadır (Anonim 2015). Bu verilere göre 2015 yılında Türkiye'deki kuru sarımsak üretiminin %24,59'u Kastamonu'da, %12,99'u Kahramanmaraş'ta, %11,60'ı Gaziantep'te ve %6,90'ı Aksaray'da gerçekleştirilmektedir. Balıkesir dekar alan olarak dördüncü sırada yer almasına karşın 5 600 ton üretim ve %5,90'lık üretim payı ile beşinci sırada yer alabilmiştir (Anonim 2015).

Yayılış merkezi Orta Asya olarak bilinen sarımsak, birçok farklı genotipe sahiptir. Bu genotipler çiçeklenme durumlarına göre birbirlerinden ayrılmaktadır. Bazı genotipler nadiren veya hiç çiçeklenme göstermezken, bir kısım genotipin düzenli çiçeklenme özelliğine sahip olduğu gözlemlenmekte, diğer bir kısmı ise nadiren çiçeklenmektedir. Sarımsak çiçek renkleri genelde pembe ve mor tonlarına sahiptir (Simon ve Jenderek 2003). Diğer *Allium* türlerinden farklı olarak sarımsakta çiçek gelişimi sırasında çiçekler arasında küçük dişler gelişmektedir. Çiçek taslaklarının farklılaşmasıyla oluşan bu vejetatif dişler, çiçek gelişimi için gerekli olan besin maddesinin tüketimine ortak olarak, gelişimlerini engellemektedir. Bu durumun sarımsağın kısır olmasının nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir (İpek 2011).

Vejetatif yayılım gösteren bir bitki olan sarımsak, kısır (steril) olmasından dolayı yetiştiriciliği de dişleri ile yapılmaktadır (Bandara ve ark. 1999). Sarımsağın bitki gelişimi döngüsüne bakılacak olunursa soğanın yaşam döngüsüne benzemekte, ancak tohum üretimi evresi birçok sarımsak genotipinde gerçekleşmemektedir. Temel olarak sarımsak gelişim basamakları vejetatif büyüme, diş oluşumu, diş dormansisi, dişteki dormansinin kırılması, diş sürmesi ve çiçeklenme aşamalarını kapsamaktadır (Brewster 1997, Ade-Ademilua ve ark. 2009, Youssef 2013).

Sarımsakta diş ve baş oluşumu, dinlenme halindeki (dormant) dişlerin ekim öncesinde maruz kaldığı gün ışığı, sıcaklık ve depolama süresinden etkilenir. Diş oluşumu için genellikle, düşük başlangıç sıcaklığını takiben uzun günler gereklidir (Bandara ve ark. 1999, Atashi ve ark. 2011, Youssef 2013). Başlarda sürgün gelişiminin sağlanması ve

verimi artırmak için düşük sıcaklıkta depolama veya soğuk dönemde dikim yapılmaktadır (Ade-Ademilua ve ark. 2009).

Sarımsakta yüksek verim, bitkinin farklı gelişim aşamalarında maruz kaldığı sıcaklık, ışık, nem, sulama zamanı veya yağış miktarı, toprak bileşenleri ve dikim zamanı gibi uygun zirai uygulamaları ve çevre koşullarına bağlıdır (Ade-Ademilua ve ark. 2009, Youssef 2013, Diriba-Shiferaw ve ark. 2013). Birçok çalışmada, düşük sıcaklıkta depolanan örneklerden gelişen bitkilerde başta yüksek oranda diş sayısı, büyümede artış, erken olgunlaşma, baş çapı ve veriminde artış gözlemlenmiştir (Youssef 2013).

Sarımsak dişleri hasat sonrası dormant olarak 3-4 hafta kalır. Bu dormansi hasattan dikime kadar kademeli olarak azalır (Rahman ve ark. 2003, 2006). Zorunlu dormansi durumundaki bir sarımsak başında, içinde bulunduğu çevre koşulları optimum düzeyde olsa bile gelişim gözlenmez. Sarımsakta dormansinin varlığı, *Allium* cinsi bitkilerin olumsuz çevre koşulları altında yaşamlarını devam ettirebilmek için geliştirdikleri bir adaptasyon şeklidir (Brewster 2008). Bu durum sayesinde sarımsak uzun süreler boyunca depolanabilmektedir (Rahman ve ark. 2003). Dormansinin kontrolü, gelişim inhibitörü absisik asit (ABA) ve gelişim regülatörü giberellik asit (GA_3) arasındaki denge ile sağlanır (Rahman ve ark. 2003, 2006). Yapılan çalışmalarda soğan başlarında dormant bitkilere göre dormant olmayan bitkilerde giberellik asitin daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Rahman ve ark. 2003, 2006).

Düşük sıcaklıkta depolamanın, sarımsakta dormansinin kırılmasını desteklediği bildirilmektedir (Youssef 2013). Dikim öncesi depolanan örneklerde, dikim sonrasında diğten filiz çıkışı daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Yaklaşık $7,5^{\circ}C$ 'de depolanan örnekler $0^{\circ}C$ ve $20^{\circ}C$ 'deki örneklere oranla daha hızlı filizlenmektedir. Ayrıca dikim öncesi depolama, filizlenme sonrası büyüme hızı ve yaprak morfolojisi üzerinde de etkilidir. Düşük sıcaklıkta depolanan örneklerin $0^{\circ}C$ ve $20^{\circ}C$ 'de depolanan örneklere oranla daha hızlı geliştikleri, daha geniş yapraklı ve kalın saplı oldukları yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Brewster 1997). Bu verilere karşın sarımsakta dormansinin mekanizması tam olarak çözülmemiştir. Dormant bir başta bu bekleme

sürecinin tamamlanması için gerçekleşen moleküler ve fizyolojik olayların belirlenmesi yapılacak moleküler düzeydeki çalışmalarla ortaya konulabilir.

Gen ifadesi, hücredeki genetik bilginin mRNA ve daha sonra proteine dönüşerek hücre içerisinde işlevsel hale gelme sürecidir. Hücre ve dokularda dönemsel olarak ve değişen çevresel koşullar ile birlikte farklı genlerin ifadesi oluşmakta veya ifade miktarları değişmektedir. Genel olarak hücre ve dokularda patolojik veya fizyolojik bir etkinin cevabının incelenmesi için mRNA ifade çalışmaları yapılmaktadır. mRNA ifade analizinde kullanılan temel teknikler; Northernblot, mikroarray ve rt-PCR (Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu)'dır. Northernblot tekniğinde mRNA'ların bir membrana transferi sonrası, radyoaktif problemlerin hibridizasyonu yapılarak incelenmesi sonucu mRNA ifadesi tespit edilmektedir. Mikroarray tekniğinde ise bir organizmanın genomunda yer alan bütün genlerin eş zamanlı olarak kantitatif ifade analizlerinin yapılabilmesini sağlamaktadır. rt-PCR tekniğinde ise toplam RNA'dan revers transkriptaz enzimi ile PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) gerçekleştirilerek cDNA (komplementer Deoksiribo Nükleik Asit) sentezlenir. Daha sonrasında gene özgü primerler yardımıyla gen ifadesi semi-kantitatif veya kantitatif olarak analiz edilebilir (Yüzbaşıoğlu 2008).

Semi-kantitatif analizlerde sadece hücre ve dokularda patolojik ve ya fizyolojik etki sonrası bir genin ifadesinin varlığı, farklı örneklerle de kıyaslanarak incelenmektedir. Kantitatif analizler de ise incelenen gen veya hedef dizinin kopya sayısının da belirlenmesi amaçlanır. Bu amaçla Gerçek Zamanlı PCR (real time, RT-PCR) cihazları kullanılmaktadır (Yüzbaşıoğlu 2008). Kantitatif RT-PCR yönteminde hücre ve dokularda farklı şekilde ifade olan hedef gen mRNA'sının ifade düzeyi, bitkinin gelişme süresince veya farklı çevresel koşullarda ifade düzeyi değişmeyen veya çok az değişen *housekeeping* genlerinin ifade düzeyleri ile normalizasyonu sonucu belirlenir (Yüzbaşıoğlu 2008).

B1 vitamini olarakta bilinen tiamin kükürt içeren renksiz bir maddedir ve kimyasal formülü $C_{12}H_{17}N_4OS$ şeklindedir. Tiaminin yapısı tiazol ve pirimidin halkasal bileşiklerden oluşmaktadır (Nosaka 2006). Tiaminin tiazol ve pirimidin kısımları iki

bağımsız biyosentez yolundan sentezlenir (Settembre ve ark. 2003). Tiyazol kısmı (4-metil-5-(2-hidroksietil) tiyazol monofosfat (HET-P)) HET-P sentez enzimiyle glisin, sistein ve NAD^+ yollarından sentezlenmektedir. Pirimidin (hidroksimetil-pirimidin monofosfat (HMP-P)) kısmı ise HMP-P sentez (*THIC* geninin protein ürünü) enzimiyle 5-aminoimidazol (AIR) yolundan sentezlenir. İki domainli Tiamin monofosfat pirofosforilaz (TMP-PPase)/ HMP-P kinaz enzimi bu iki bileşiği birleştirir ve tiaminmonofosfat (TMP) açığa çıkar. Sonra TMP defosforilize edilerek serbest tiamin sentezlenir ve tiamin pirofosfokinaz (TPK) enzimi serbest tiamini tiaminpirofosfat (TPP) formuna dönüştürür (Rapala-Kozik ve ark. 2008).

Tiaminin fosfat türevlerinden olan tiamin difosfat (TDP) diğer adıyla tiamin pirofosfat (TPP) karbohidratların ve amino asitlerin katalizi, asetil-CoA sentezi, trikarboksilik asit döngüsü, pentoz fosfat yolu/ Calvin döngüsü, anaerobik etanolik fermantasyon, dallı-zincirli amino asit biyosentezi, isoprenoid biyosentezi ve bitki pigment biyosentezi gibi büyük metabolik yollarda görev alan enzimlerde kofaktör olarak görev almaktadır (Rapala-Kozik ve ark. 2008, Tunc-Ozdemir ve ark. 2009). Bakteriler, mayalar ve yüksek yapılı bitkiler basit evrensel öncülerden TDP'ı sentezleyebilmelerine karşın, hayvanlar dış kaynaklardan aldıkları tiamini kullanarak TDP'a dönüştürdükten sonra gerekli metabolik yollarda kullanabilmektedirler (Rapala-Kozik ve ark. 2008).

Son yıllarda tiaminin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bitkilerde savunma görevi yaptığı konusunda bazı bulgular elde edilmiştir. Tiaminin bu rolü TDP (Tiamin Difosfat)'ın kofaktör olarak görev aldığı enzimlerin aktivitelerinin stres koşullarında artmasıyla gerçekleşmektedir (Rapala-Kozik ve ark. 2008).

Daha önce tamamlanan TÜBİTAK-TOVAG 1050551 nolu proje kapsamında farklı sarımsak genotiplerine ait başların düşük sıcaklıkta (4°C) üç ay süreyle depolanması sonucunda farklı şekilde ifade olan bir gen belirlenmiştir. Farklı ifade olan bu genin nükleotid dizisinin NCBI gen bankasındaki BLAST analizlerinde tiamin biyosentezinde görev alan *THIC* (ADP-ribosepyrophosphohydrolase/ catalytic/ iron-sulfur cluster binding protein) geni olduğu belirlenmiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı sarımsak başlarında düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı koşullarında depolama süresince tiamin biyosentezinde görev alan *THIC* geninin ifade düzeyindeki değişimin Gerçek Zamanlı PCR analizleri ile belirlenmesidir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Sarımsakta Dinlenme Fizyolojisi

Arguello ve ark. (1990) sarımsakta dormansi mekanizmasını çözebilmek için büyüme düzenleyicilerin dormant haldeki başlarda etkilerini inceleyen bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sitokininlerin dışteki dormansi periyodu boyunca farklılaşma süreçlerinde aktif olduğunu belirlemişlerdir. Gibberellik asitin (GA) ise karbonhidrat metabolizmasının aktive edilmesinde rol alması nedeniyle dormansinin son aşamalarında önemli bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Sarımsak başlarında dormansinin bitiş aşamasında oksin aktivitesinin önemli derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bitkisel hormon uygulamalarının büyüme sürecindeki farklılaşmaya katkısının olduğunu vurgulamışlardır.

Bandara ve ark. (1999) üç tane sarımsak çeşidinde dikim öncesi optimum soğuk uygulama süresini araştırmışlardır. Çalışmada 0, 30, 45, 60 veya 75 gün süreyle 4 °C soğuk uygulaması yapılan sarımsak başları sera ve açık araziye dikilmiştir. Tüm çeşitlerde soğuk uygulaması sonrası başlarda dış gelişiminde ve verimde artışlar gözlenmiştir. Bu artış genel olarak açık alanda yetiştirilenlerde 30 günde, serada yetiştirilenlerde ise 45 günde ortaya çıkmıştır.

Rahman ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada sarımsak başlarına dikim öncesi değişik sıcaklık dereceleri uygulamasının ekzotik ve yerel çeşitlerde sürgün gelişimi ve büyüme davranışlarına etkilerini araştırmışlardır. Başları ağırlıklarına göre ayırarak dikim öncesi 14 gün boyunca beş ayrı sıcaklıkta uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Ekzotik çeşitlerde dikimden sonra sürgün gelişimi görülmezken. Yerel çeşitlerde ise düşük sıcaklık uygulamasında (%40) yüksek-düşük sıcaklık uygulamasına (%8,89) göre daha yüksek oranda sürgün gelişimi görülmüştür. Çıkan sonuçlara dayanarak sarımsak başlarına yapılan değişik sıcaklık uygulamalarının dormansinin kırılmasında ve sürgün gelişimini hızlandırmada potansiyel etkisinin olduğunu vurgulamışlardır.

Volk ve Rotindo (2004) yapmış oldukları çalışmada, hasattan sonra sarımsak başlarınının -3, 0 veya 5°C'de yaklaşık 6 ay muhafazası sonrasında ilkbahar dikiminde bitki gelişimleri incelenmiştir. En iyi sonuç -3°C'de depolanmış olan başlardan elde edilmiştir. Sıfır derecede depolanan başlarda ise yan diş oluşumu görülmüş ve baş sıklığı azalmıştır.

Rahman ve ark. (2006) sarımsakta dormansi sorununun giderilmesine yönelik yaptıkları çalışmalarında, yerel ve egzotik sarımsak çeşitlerinde GA₃'in diş sürmesi ve erken dönem gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yerel çeşitte diş filizlenmesi, bitki başına yaprak sayısı, bitki boyu, bitki başına kök sayısı, kök uzunluğu ve normal gelişen bitki yüzdesine GA₃'in etkisi daha fazla olmuştur. GA₃'in 250ppm konsantrasyonunda en yüksek sürgün gelişimi oranı (%31,67) gözlenirken, 500ppm'de ise en düşük sürgün gelişimi oranı (%10,00) gözlemlenmiştir. Ekzotik çeşitte ise sürgün gelişimi gözlemlenememiştir. Elde etmiş oldukları bulgular sonucunda, GA₃'in yerel çeşitlerde dormansiyi kırmada ve sürgün oluşumunu hızlandırmada potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir.

Ade-Ademilua ve ark. (2009) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada açık arazi ve gölgelendirilmiş arazide, soğuk uyguladıkları ve uygulamadıkları sarımsak başlarında büyüme ve verim değerlendirmesi yapmışlardır. Soğuk uygulamadıkları örnekler gölgede daha fazla gelişim gösterirken, soğuk uyguladıkları örnekler açık alanda daha fazla gelişim göstermişlerdir. Işıklanma koşullarına bakılmaksızın soğuk uygulanan başların veriminin daha iyi olduğunu belirtmişlerdir.

Atashi ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada, düşük sıcaklıkta depolanan sarımsakta hasattan sürmeye kadar oluşan fiyolojik değişimleri araştırmışlardır. On beş ve 30 gün 4°C'de depolanan örneklerin klorofil, karotenoid, karbohidratlar miktarları ve amilaz ve invertaz aktiviteleri incelenmiştir. Otuz gün depolama sonunda klorofil (a, b ve ab), karotenoid, glikoz miktarları ve amilaz ve invertaz enzim aktivitelerinde artış gözlenirken, sükröz ve nişasta içeriğinin istatistiki olarak düştüğü gözlemlenmiştir. En iyi sürme 30 gün 4°C'de depolanma sonucunda olmuştur.

Youssef (2013) gerçekleştirmiş olduğu çalışmada, iki ayrı sarımsak genotipi (Klon17 ve Egased1) kullanarak, dikimden 15, 21 ve 30 gün öncesinde, oda sıcaklığı (27°C) ve düşük sıcaklık (10°C, 15°C)'ta depoladığı örnekleri karşılaştırmıştır. 10°C (30gün) depolanan her iki genotipte diş sürgün uzunluğu ve diş sürgün yüzdesinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Arazi çalışmasında en iyi çıkış yüzdesini “klon 17” 15°C'de 30 günde vermiştir. Çeşitler arasında depolama sıcaklığı ve süresine göre önemli farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Örneklerde en yüksek yaş verim, kuru verim, ortalama baş ağırlığı, baş çapı (cm), ve baştaki diş sayısı, Egased1 genotipinde 15°C'de 15 günde, Klon17 genotipinde ise 10°C'de 21 günde elde etmiştir. Araştırmacılar düşük sıcaklığın çıkış yüzdesi, verim, baş ağırlığı, baş çapı ve diş ağırlığını artırdığını vurgulamışlardır.

Diriba-Shiferaw ve ark. (2013) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, kuru ve yağışlı olmak üzere iki ayrı dönemde, sarımsak başlarında hasat öncesi gübre uygulamasının ve toprak tipinin, hasat sonrası kalite ve depolanabilirlik üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda gübreleme, toprak tipi ve depolama mevsiminin, depolanabilirlik ve kalite yönünden önemli çeşitliliğe yol açtığı gözlemlenmiştir. Yüksek miktarda gübre uygulaması başlarda depolanabilirliği ve verimi geliştirmiştir. Kontrol grubu ve az miktarda gübre uygulanan başlarda ise ağırlık ve çap büyüklüğünde kayıp gözlemlenmiştir.

2.2. B1 Vitamininin Stresle İlişkisi

Ahn ve ark. (2005) yapmış oldukları çalışmada tiaminin besin değerine ilave olarak bitkilerde sistematiksel edinilen dayanıklılığı (SAR) tetiklediğini göstermeyi amaçlamışlardır. Tiamin uygulanan çeltik, Arabidopsis ve sebze türlerinde fungal, bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı direnç oluştuğunu belirlemişlerdir. Tiamin uygulaması sonucu patojen-ilişkili (PR) genlerin ifadesinin geçici olarak arttığını belirlenmişlerdir. Buna ek olarak protein kinaz C aktivitesinde arttığını tespit etmişlerdir. 15 günlük tiamin uygulaması sonucunda hastalık direnci ve savunma ile ilgili genlerin ifadesinin sistemik olarak bitkinin her tarafında arttığı belirlenmiştir.

Araştırmacılar tiaminin tetiklemiş olduğu SAR genlerinin salisilik asit ve Ca⁺² ilgili sinyal yollarıyla ilgili olduğunu belirtmektedirler.

Rapala-Kozik ve ark. (2008) mısır bitkisinde gerçekleştirmiş oldukları çalışmada tiamin biyosentezi ve aktivitesinin abiyotik stres koşulları (kuraklık, yüksek tuz ve oksidatif stres) ile ilişkisini ortaya koymuşlardır. Stres koşulları altında ABA ve antioksidan enzimler olan katalaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz miktarında artış tespit edilmiştir. Tüm stres koşulları altında mısır fidesinin yapraklarında toplam tiamin miktarında artış tespit etmişlerdir. Bu artışta serbest tiamin, TMP ve TDP'ın bağıl dağılığını da tespit etmişlerdir. Tiamin sentez enzimlerinden olan TMP sentetaz enzimi abiyotik stres koşulları altında olumsuz yanıt verirken, TDP sentetaz, tiamin pirofosfatkinaz ve TDP/TMP fosfataz sayısında artış tespit edilmiştir. Tuz ve oksidatif stres koşulları altında ise TDP-bağımlı bir enzim olan transkatalaz enzim aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Böylelikle araştırmacılar tiamin metabolizmasının çevresel stres koşullarındaki rolünü saptamışlardır.

Tunc-Ozdemir ve ark. (2009)'nın gerçekleştirmiş oldukları çalışmada Arabidopsis bitkisine abiyotik stres koşulları uygulayarak tiamin ve TPP miktarlarını incelemişlerdir. Tiamin biyosentezinde görev alan enzimlerin ifade seviyelerini arttığını belirlemişlerdir. Arabidopsisin normal olmayan (mutant) bitkilerine dışarıdan tiamin ilavesi sonrası uygulamış oldukları oksidatif strese toleransın arttığını gözlemlemişlerdir. Reaktif oksijen türlerine duyarlı mutant bitkide tiamin uygulamasının oksidatif strese toleransı artırmanın yanında reaktif oksijen türlerinin üretimini de azalttığını belirlemişlerdir. Salisilik asit sinyalini başlatma eksikliği olan mutant bitkilerde tiaminin sağladığı oksidatif korumanın salisilik asit sinyali ve ya birikimi olmaksızın gerçekleşebileceğini bulmuşlardır.

Goyer ve ark. (2011) farklı çevresel koşullarda yetmişmiş olan 54 patates çeşidinde hasat sonrası yumrulardaki tiamin içeriğini belirlemişlerdir. On üç çeşidin taze ağırlıklarında >685ng/g, dört çeşitte ise >800ng/g konsantrasyonda tiamin içeriği belirlenmiştir. Olgunlaşma sonrası hasat edilen örneklerde erken dönemde hasat edilen örneklere oranla tiamin içeriğinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bazı genotiplerde

soğukta depolama süresince tiamin konsantrasyonunun çok az arttığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak patatesin tiamin kaynağı olarak insan beslenmesinde önemli bir yeri olduğunu açıklamışlardır.

Rapala-Kozik ve ark. (2012) tuz ve osmatik stres uyguladıkları Arabidopsis fidelerinde TDP biyosentezi ile ilgili *TH11*, *TH1C*, *TH1* ve *TPK* genlerinin ifadelerini incelemişlerdir. Strese yanıt olarak genellikle 2-6 saatlik bir sürede genlerin transkripsiyon seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu genlerin artışına paralel olarak tiamin ve difosfat ester içeriğinin de arttığını, TDP'ı kofaktör olarak kullanan enzimler olan α -ketoglutarat dehidrogenaz, piruvat dehidrogenaz ve transkatalaz enzimlerinin gen ifadelerinin de arttığını belirlemişlerdir. Bitki hormonlarından salisilik, jasmonik asit ve ABA uygulamaları sonucu, sadece absisik asitin önemli derecede tiamin biyosentez genlerine, TDP seviyesine ve tiamin difosfat-bağımlı enzimleri kodlayan genlerin ifadesine etki ettiğini belirlemişlerdir.

2.3. Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time PCR), PCR döngüsünü sağlayan ısıtıcı cihazlara (thermocycler) hassas ölçüm cihazlarının adapte edilmesiyle oluşmuş bir sistemdir (Sanlıdilek 2009). PCR reaksiyonu sonucu oluşan çift sarmalın arasına boya veya floresan prob veya primerin eklenmesi sonucu oluşan ışımaya cihaz tarafından algılanmaktadır (Richard 2004). Gerçek zamanlı PCR'da kullanılan prob sistemleri ve boyalardan en çok kullanılanları TaqMan problemleri, Molecular Beacons problemleri, hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri ve SYBR Green I boyasıdır (Bulakbaşı-Balcı 2009).

SYBR Green I metodu çift zincirli DNA'ya non-spesifik olarak bağlandığında floresan ışık yayan bir boyadan oluşmaktadır. PCR sonucu oluşan DNA miktarı arttıkça daha fazla boya bağlanarak daha yüksek bir ışımaya miktarı sağlamaktadır (Sanlıdilek 2009, Bulakbaşı-Balcı 2009, Özmen 2011). Gerçek zamanlı PCR'da oluşacak hataların kontrolü için normalleştirme yapılması gerekmektedir. Normalleştirme için farklı teknikler bulunmaktadır (Huggett 2005). Bunlar; benzer doku hacmi ve ya ağırlığın kullanılması deneysel hatayı azaltmanın ilk aşaması olarak görülmektedir. Ancak

örneklem büyüklüğüne göre normalleştirme yapılması basit görünmesine karşın farklı örneklerden eşit miktarda örnek alınsa dahi hücrel materyal içeriği eşit olmayabilir. Benzer örnekleme büyüklüğünü sağlamak tek başına yeterli olmamaktadır ve yanıltıcı olabilir (Huggett 2005). RNA ölçümüne göre normalleştirme yapmak ters transkripsiyon öncesi RNA değerlendirilmesiyle gerçekleşmektedir. RNA kalitesi iyi değilse ölçüm etkilenebilir. RNA ölçümlerinde toplam RNA miktarı tespit edilmekte, ancak çalışmalar protein kodlayıcı mRNA'lar ile gerçekleştirildiği için aralarında belirli bir oran varlığı gözetilerek işlemler gerçekleştirilmektedir (Huggett 2005).

Referans gen kullanılarak normalleştirme RT-PCR'da hata kontrolünde basit ve popüler bir yöntemdir. En yaygın kullanılan referans genler β -aktin, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), hipoksantin-guanin fosforibosil transferaz (HPRT) ve 18S ribozomal RNA genleridir (Huggett 2005).

RT-PCR'da çalışılan genin ifade düzeyinin rakamsal olarak belirlenmesi isteniyorsa Q-RT-PCR (Quantitative RT-PCR) analizi uygulanmaktadır. İki ayrı kantifikasyon yöntemi bulunmaktadır. Mutlak (*absolute*) kantifikasyon yönteminde önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrisinden faydalanarak alınan sinyallerin kopya sayısı hesaplanarak sonuca ulaşılmaktadır. Göreceli (*relative*) kantifikasyonda ise RNA ifade düzeyi sabit ifadelendiği bilinen (*house-keeping*) genlerin ifade düzeyine göre oranının ölçülmesiyle belirlenir. Göreceli kantifikasyonu son basamağı ise normalleştirme (Bulakbaşı-Balcı 2009).

Liu ve ark. (2015) farklı sarımsak genotiplerine, farklı organ ve gelişim evrelerinde, abiyotik stres ve farklı uygulamalar gerçekleştirerek, sarımsakta Q-RT-PCR için en uygun referans genlerini belirlemeye çalışmışlardır. Sekiz aday referans gen arasından, α -tubulin (TUA), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), poliübikülin (UBQ), siklofilin (CYP) ve aktin (ACT) genlerinin sarımsakta Q-RT-PCR çalışmalarında kullanılmak için en uygun referans genler olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma 2014 - 2016 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Bu tez çalışması yürütülmekte olan "Sarımsakta Düşük Sıcaklık Koşullarında Tiamin Biyosentezinde Görev Alan *THIC* Genin İfade Düzeyi, Tiamin ve Bazı Biyokimyasal Bileşiklerin İçeriklerinde Oluşan Değişimlerin Belirlenmesi" başlıklı ve TÜBİTAK-TOVAG - 113O228 numaralı projenin bir parçasıdır.

3.1. Bitki Materyali

Yapılan çalışmada materyal olarak ülkemizde oldukça önemli sarımsak genotiplerinden olan Kastamonu sarımsağı ve PI515971 kodlu (Pulman (Washington, ABD) şehrindeki Batı Bölgesel Bitki Gen Bankası (WRPIS-Western Regional Plant Introduction Station)'ndan sağlanan) sarımsak genotipi kullanıldı. Materyalin Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazisinde yetiştiriciliği yapıldı. 2014 Temmuz ayında hasadı gerçekleştirilen genotiplerden Ağustos ayının son haftasında analizler için örneklemeler yapıldı. Genotip başlarının bir kısmı soğukta (4°C) diğer bir kısmı oda sıcaklığında (21°C) muhafaza edildi ve 4, 8 ve 12 hafta muhafaza sonunda başlardan tekrar örnekleme gerçekleştirildi. Örnekler daha sonraki aşamaların gerçekleştirileceği süreye kadar -85°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için -85°C'de muhafaza edilen örnekler hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde havanda ezildi. RNA izolasyonunda RNeasy® Plant Mini Kit kullanıldı (QIAGEN). Kit içerisinde gelen Quick-Start Protocol'de yer alan adımlar takip edilerek toplam RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyonu tamamlanan örnekler 1,5ml'lik ependorf tüpler içerisinde -85°C'lik dondurucuda saklandı.

RNA izolasyonunda kullanılan protokolün aşamaları şu şekildedir:

1. Bitki materyali maksimum 100 mg olacak şekilde sıvı azot içerisinde öğütüldü.
2. İyice öğütülmüş örnek, içerisinde 450 µl RLT Tamponu bulunan 2 ml'lik RNaz-free, mikrosantrifüj tüplerine sıvı azotla soğutulmuş spatula yardımıyla dikkatlice aktarıldı ve vortekslenerek homojen hale getirildi.
3. Lizat 2 ml'lik toplama kabı içindeki QIAshredded dönüş kolonuna (lila) aktarıldı. 2dk tam hızda (16,000 x g) santrifüj edildi. Oluşan süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpe istenmeyen hücre artıkları pellette kalacak şekilde aktarıldı.
4. Hacimce 0,5 etanol (%96-100) eklenerek lizatın temizlenmesi sağlandı ve pipetle hemen karıştırıldı.
5. Çözelti ile örnek 2 ml'lik toplama kabı içindeki RNeasy mini dönüş kolonuna (pembe) transfer edildi ve 15 s \geq 8,000 x g (\geq 10,000 rpm)'de santrifüj edildi. Kolondan ayrılan sıvı kısım atıldı.
6. RNeasy mini dönüş kolonuna 700 µl RW1 tampon eklendi ve 15 s \geq 8,000 x g'de santrifüj edildi. Kolondan ayrılan sıvı kısım atıldı.
7. RNeasy mini dönüş kolonuna 500 µl RPE tampon eklendi ve 15 s \geq 8,000 x g'de santrifüj edildi. Kolondan ayrılan sıvı kısım atıldı.
8. RNeasy mini dönüş kolonuna 500 µl RPE tampon eklendi ve 2 dk \geq 8,000 x g'de santrifüj edildi.
9. RNeasy mini dönüş kolonu yeni 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Membranın kuruması için 1dk tam hızda santrifüj edildi.
10. RNeasy mini dönüş kolonu yeni 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildi. 30-50 µl RNaz - free su doğrudan dönüş kolonunun membranına eklendi ve RNA'nın ayrılması için 1 dk \geq 8,000 x g'de santrifüj edildi.

3.3. cDNA Sentezi

Elde edilmiş toplam RNA'lardan cDNA sentezi QIAGEN QuantiTect® Reverse Transcription Kiti içerisinde gelen Quick-Start Protocol'de yer alan adımlar takip edilerek gerçekleştirildi.

cDNA sentezinde kullanılan protokolün aşamaları şu şekildedir:

1. RNA'ların bulunduğu tüpler buz içerisinde tutularak RNA'ların çözünmesi sağlandı. gDNA Wipeout Karışımı, Quantiscript® Revers Transkriptaz, Quantiscript RT Tamponu, RT Primer Karışımı, ve RNase-free su oda sıcaklığında (15-25°C) çözdürüldü. Her çözelti tüpü ters düz edilerek karıştırıldı. Sıvı tüpün dibine toplanması için kısa süreli santirfüj edildi ve daha sonrasında buz içine yerleştirildi.
2. Genomik DNA uzaklaştırma reaksiyonu için 2 µl gDNA Wipeout Karışımı örnek sayısı kadar plate kuyucuğuna konuldu. Protokol 10 pg dan 1 µg'a kadar RNA kullanımına uygun olduğu için gerekli konsantrasyon hesaplamaları yapıldıktan sonra uygun miktardaki RNA içerisinde 2 µl gDNA Wipeout Karışımı bulunan kuyucuklara ilave edildi. Daha sonra bu aşama için gerekli olana son miktar olan 14 µl'den kuyucuğa ilave edilen gDNA Wipeout Karışımı ve RNA miktarı çıkartılarak hesaplanmış olan RNaz-free su miktarı ilave edildi.
3. Plate 3 dk 42°C'de inkübe edildi, daha sonra hemen buz içerisine konuldu.
4. Örnek sayısına uygun olarak hesaplanan reverse-transcription ana karışımı buz içerisinde bulunan tüp içerisine hazırlandı. Bu karışımda her bir örnek için 1µl Quantiscript® Revers Transkriptaz, 4 µl Quantiscript RT Tamponu ve 1 µl RT Primer karışımı kullanıldı.
5. Hazırlanan reverse-transcription ana karışımı adım 3 de hazırlanmış olan kalıp RNA'yı (14µl) içeren kuyucuklara 7'şer µl eklendi (son hacim 20 µl). Karıştırıldı ve daha sonra buzun içine yerleştirildi.
6. Tek iplikçikli cDNA'nın sentezi için 15dk, 42°C'de inkübe edildi. Bu inkübasyona 3dk 95°C'de inkübasyon eklenerek Quantiscript Reverse Transkriptaz'ın aktivasyonu durduruldu.
7. Reverse-transcription reaksiyonlarını buza yerleştirildi ve doğrudan real-time PCR analizi ile devam edildi.

3.4. Primer Tasarımı

THIC geninin Gerçek Zamanlı PCR analizleri için primerler daha önceki TÜBİTAK-TOVAG 105O551 numaralı proje kapsamında belirlenen sarımsak *THIC* geni dizilerinden Primer3 programı kullanılarak dizayn edilmiştir. İnternal kontrol için NCBI gen bankasında bulunan sarımsak actin geni (gi|56159166|gb|AY821677.1) dizilerinden primerler geliştirilmiştir. Primerler Metabion firmasında sentezlenmiştir.

3.5. Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu referans olarak aktin geni, analiz için de *THIC* geninin primerleri (Çizelge 3.1.) kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz için “RocheLightCycler® 480 SYBR Green Master I” kiti kullanıldı. Her primer kombinasyonu için ayrı olarak hazırlanan SYBRgreen karışımı her bir örnek için; 5 µl su, 1µl primer F (forward, ileri), 1µl primer R (reverse, geri), 10 µl SYBRgreen enzim karışımı kullanılarak hazırlandı, iyice pipetlendikten sonra içerisinde 3µl cDNA bulunan her bir kuyucuğa 17 µl karışımdan dağıtıldı (Aktin ve *THIC* gen primerleri için iki ayrı tüpte hazırlanan RT PCR reaksiyon karışımı, gerçekleştirilen reaksiyon sayısından %10 fazlası hesaplanarak hazırlanmıştır).

LightCycler 480 II'ye özel platelere aktin ve *THIC* genin bulunduğu iki ayrı SYBRgreen karışımının ayrı dağıtılabilmesi için her bir cDNA örneği iki paralel olarak kuyucuklara dağıtıldı.

Çizelge 3.1. Real-time PCR’da kullanılan *THIC* ve aktin primerleri

Gen	Dizisi (5’-3’)
<i>THIC</i>	F-5’- ACAAAGAAGTGCTGTGCCAAGAGC-3’ R-5’- GGTGCAATGAGGCACCTTTCTACA-3’
Aktin	F- 5’-TGTGAGCAACTGGGATGACATGGA-3’ R-5’- AGAGGTGCCTCAGTGAGAAGAACA-3’

Reaksiyon hazırlıkları bittikten sonra plate cihaza yerleştirildi ve Çizelge 3.2’de belirtilen program ayarlanarak analizler gerçekleştirildi. Ayarlanan program çalışırken “relative quantification” programı seçildi. Program tamamlandıktan sonra cihazda analiz bölümünde tanımlı analizlerden gerekli analizler gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2. LightCycler 480 II cihazında uygulanan koşullar.

AYARLAR				
Algılama biçimi	Blok Tipi	Reaksiyon hacmi		
SYRB Green	96	20 µl		
PROGRAMLAR				
Program ismi	Döngü	Analiz Modu		
Öncü-İnkübasyon	1	Hiç Biri		
Amplifikasyon	45	Miktar		
Erime Eğrileri	1	Erime Eğrileri		
Soğutma	1	Hiç Biri		
ISI HEDEFLERİ				
Hedef (°C)	Veri Alımı	Nüfuz (sa:dk:sn)	Yükselme Oranı (°C/s)	Veri Alımı (her °C)
Öncü-İnkübasyon				
95	Hiç Biri	00:05:00	4.4	-
Amplifikasyon				
95	Hiç Biri	00:00:10	4.4	-
59	Hiç Biri	00:00:10	2.2	-
72	Tek	00:00:15	4.4	-
Erime Eğrileri				
95	Hiç Biri	00:01:00	4.4	-
60	Hiç Biri	00:01:00	2.2	-
97	Sürekli	-	-	5-10
Soğutma				
40	Hiç Biri	00:00:30	2.2	-

3.6. Kantitatif RT-PCR Sonuçlarının Analizi

LightCycler 480 II cihazında analizleri gerçekleştirebilmek için öncelikle her bir kuyucukta bulunan örnekler ve hangi primer kombinasyonunu içerdiği tanımlandı. Daha sonra analiz bölümünden “Advanced Relative Quantification” seçeneği seçilerek tanımlatılmış olan örnek ve primer yerleri verilerini kullanması ve yüksek duyarlılıkta (High Sensitivity), birebir (one to one) karşılaştırma yapılması ayarlandı. Hesaplama butonuna basıldıktan sonra her bir örneğin CT değerleri (threshold cycle, eşik döngü değeri) ve Δ CT metoduna göre hesaplanmış normalleştirme değerleri görüntülendi.

LightCycler 480 II cihazının kullandığı Δ CT metodu formülü;

$$2^{-[Ct(referans) - Ct(hedef)]} = \text{Göreceli ifade düzeyi}$$

3.7. İstatistiksel Analiz

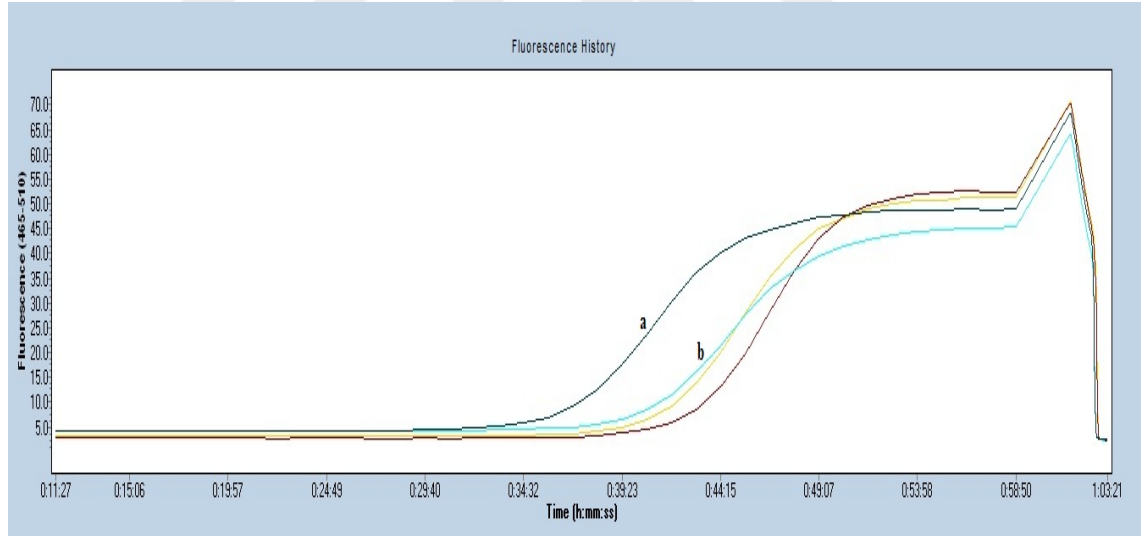
Yapılan analiz sonucu elde edilen normalleştirme değerleri SPSS 23.0 programına yüklendi ve ortalamalar arasındaki fark %5 önem seviyesinde belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Gerçek Zamanlı PCR

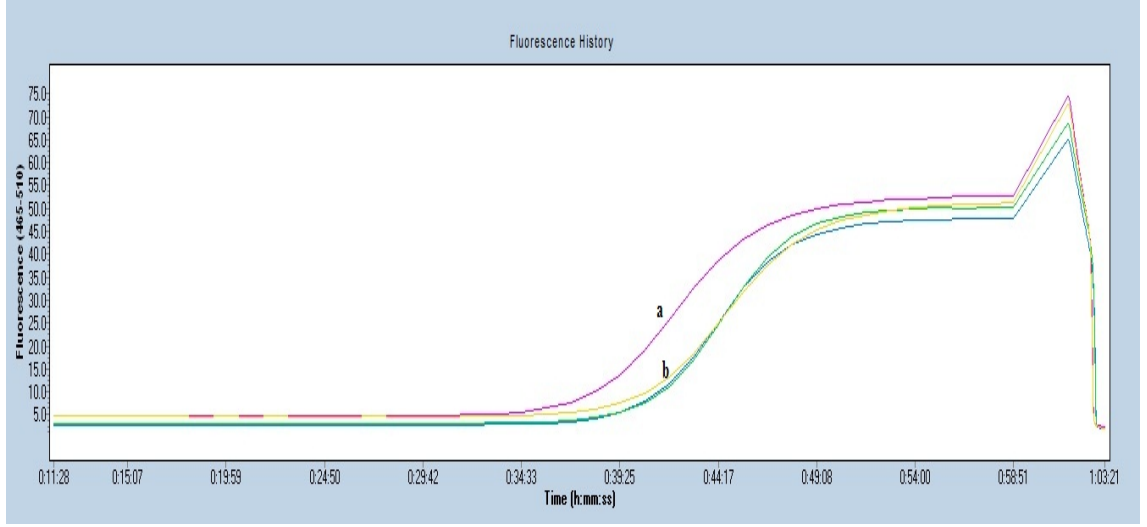
Gerçek zamanlı PCR analizinde zamana karşı floresan ışığın yoğunluğunda oluşan değişimi gösteren eğriler Şekil 4.1.ve Şekil 4.2.’de verilmektedir.

Şekil 4.1.’de PI515971 sarımsak genotipinin 4°C’de depolanan örneklerinden “a” ile belirtilen lacivert renkli eğri 12 hafta depolanan örneğin ve “b” harfi ile belirtilen mavi renkli eğri ise başlangıç haftasındaki örneğin *THIC* genine ait ifade eğrisidir. Şekilde 12 haftalık örneğe ait eğrinin erken yükselmesi Ct değerinin daha düşük olduğunu, buna zıt olarak da ifade düzeyinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Sarı renkli eğri 0. hafta, bordo renkli eğri 12 hafta örneklerinin aktin genine ait reaksiyonlarda oluşan eğriyi göstermektedir.



Şekil 4.1. PI515971 sarımsak genotipi 4°C örneğine ait RT-PCR veri görüntüsü. (a: 12. hafta; b: 0. hafta).

Şekil 4.2.’de ise aynı genotipin 21°C’de depolanan örneklerinden “a” harfi (pembe) ile 12 hafta, “b” harfi (sarı) ile 0 hafta depolanan örneğin *THIC* genine ait eğrisi gösterilmiştir. Harf ile belirtilmemiş birbiriyle çakışık yükselen yeşil ve mavi eğriler ise referans geninin 0. ve 12. haftalardaki ifade miktarlarını temsil etmektedir.



Şekil 4.2. PI515971 sarımsak genotipi 21°C örneğine ait RT-PCR veri görüntüsü. (a: 12. hafta; b: 0. hafta)

Aynı döneme ait üç tekerrürlü çalışılmasına rağmen, Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'deki verilerin daha iyi anlaşılabilmesi için temsili olarak 0. hafta ve 12. hafta örneklerinde *THIC* geni primeri ve aktin geni primerleri ile gerçekleştirilmiş reaksiyonlardan birer tane seçilerek şekillerde yer verilmiştir.

4.2. Morfolojik İnceleme

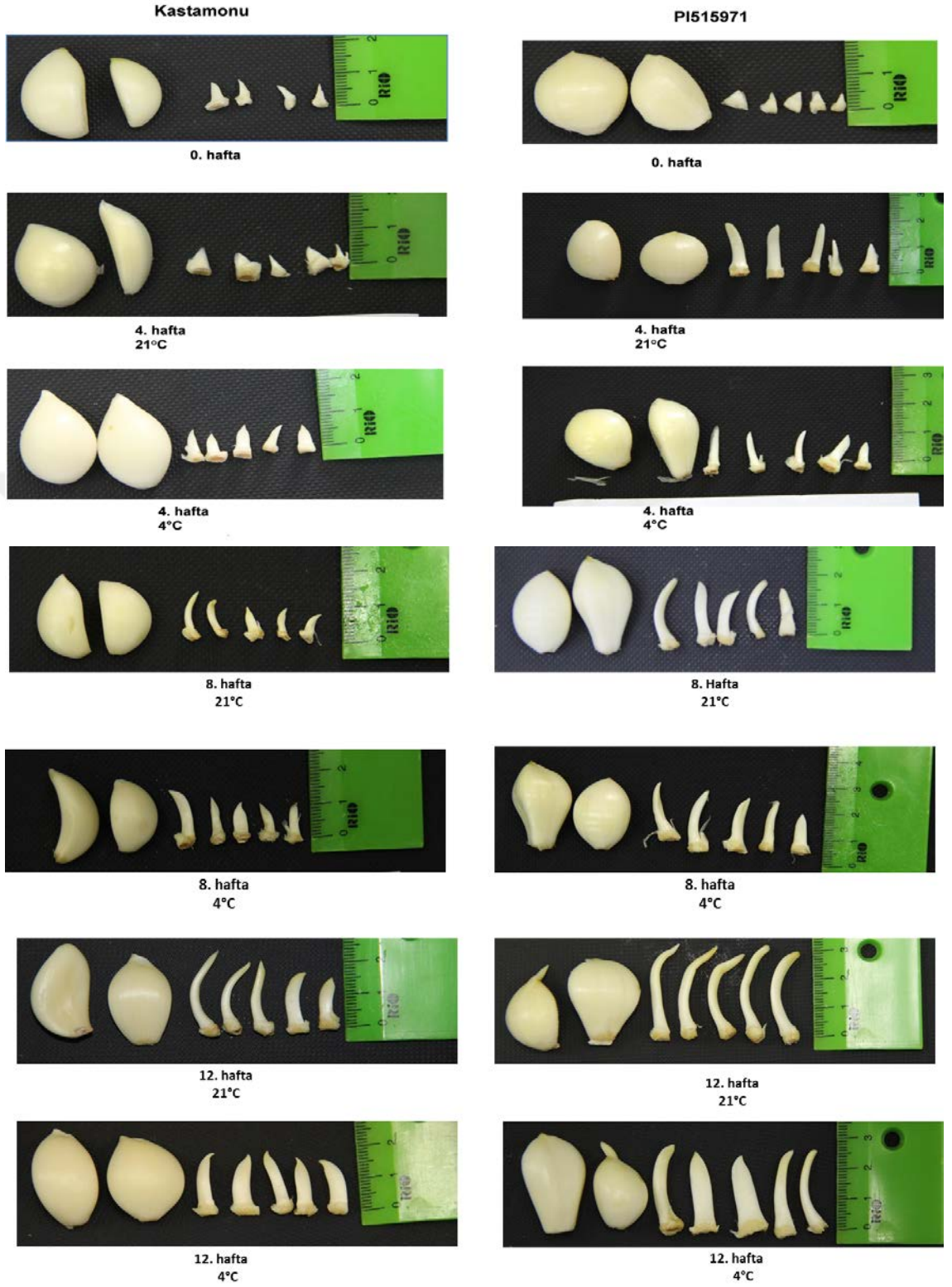
Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde *THIC* geninin göreceli gen ifade düzeylerini belirlemek için örneklemelerin gerçekleştirildiği dönemlerde sarımsak dişlerinde gerçekleşen morfolojik değişimi gözlemlemek için dişler soyulmuş ve diş ortasında gelişen sürgünler de çıkartılarak fotoğraflanmıştır. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinin 4°C ve 21°C sıcaklık depolamaları için 0., 4., 8. ve 12. haftalardaki diş ve diş ortasındaki sürgün uzunlukları, Şekil 4.3.'de gösterilmektedir.

Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinin diş ortasındaki sürgünün büyüme hızı depolama sürelerine göre birbirlerinden farklı bulunmuştur. Her iki genotipte sürgün uzunluğu başlangıçta birbirine yakın iken depolama sıcaklığı uygulaması süresince PI515971 genotipinde sürgün büyüme hızı daha fazla olmuştur. İki genotip arasında

sürgün büyüme hızındaki farklılık PI515971 genotipinin erkenci, Kastamonu genotipinin ise geççi bir sarımsak genotipi olmasından kaynaklanmış olabilir.

Sürgün büyüme hızı genotiplerde sıcaklığa bağlı olarak da farklı olmuştur. Her iki genotipte de sürgün büyüme hızı 21°C depolamada 4°C depolamaya göre daha fazla olmuştur (Şekil 4.3.).





Şekil 4.3. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde 4°C ve 21°C’de 0., 4., 8. ve 12. haftalardaki diş ve diş içindeki sürgün uzunluğundaki değişimler.

4.3. İstatistiki Veriler

Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve süreler gere *THIC* geni göreceli gen ifade düzeyinin istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.1., Çizelge 4.2, Çizelge 4.3. ve Şekil 4.4.'de verilmiştir.

PI515971 genotipinde depolama sıcaklığı ve süreye göre *THIC* geni göreceli ifade düzeyi önemli derecede değişmiştir. En yüksek göreceli gen ifade düzeyi 4°C'de gerçekleşmesine karşın 21°C örneklerinde de başlangıca göre anlamlı bir artış gerçekleştiği belirlendi (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.4.). Bu genotipte 4°C'de depolanan örneklerde (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.4.) 4 hafta depolanma sonucu *THIC* geninin göreceli ifade düzeyi 13,48 olarak belirlendi. Göreceli gen ifade düzeyindeki başlangıca göre (1,60) yaklaşık 8 katlık bu değişim istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Sekiz hafta depolanan örneklerin göreceli ifade düzeyi (14,79) ise başlangıca (1,60) göre yaklaşık 9 kat yüksek, ancak 4 hafta depolanan (13,48) örneklere göre istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu durumda bu genotipte 4°C'de depolanan örnekler için 4 ile 8 hafta depolamanın örneklerdeki *THIC* geninin göreceli ifade düzeyinde bir farklılık yaratmadığı söylenebilir. On iki haftalık depolanan örneklerde ise göreceli *THIC* gen ifade düzeyinin başlangıç örneklerine göre yaklaşık 25 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç hem PI515971 genotipinde farklı depolama sıcaklığındaki örneklerde belirlenmiş olan göreceli *THIC* geni ifade düzeylerine göre, hem de diğer genotip olan Kastamonu genotipinde farklı sıcaklık ve sürelerde depolanan örneklerdeki göreceli *THIC* geni ifade düzeyine göre belirlenmiş en yüksek (40,54) ifade düzeyidir.

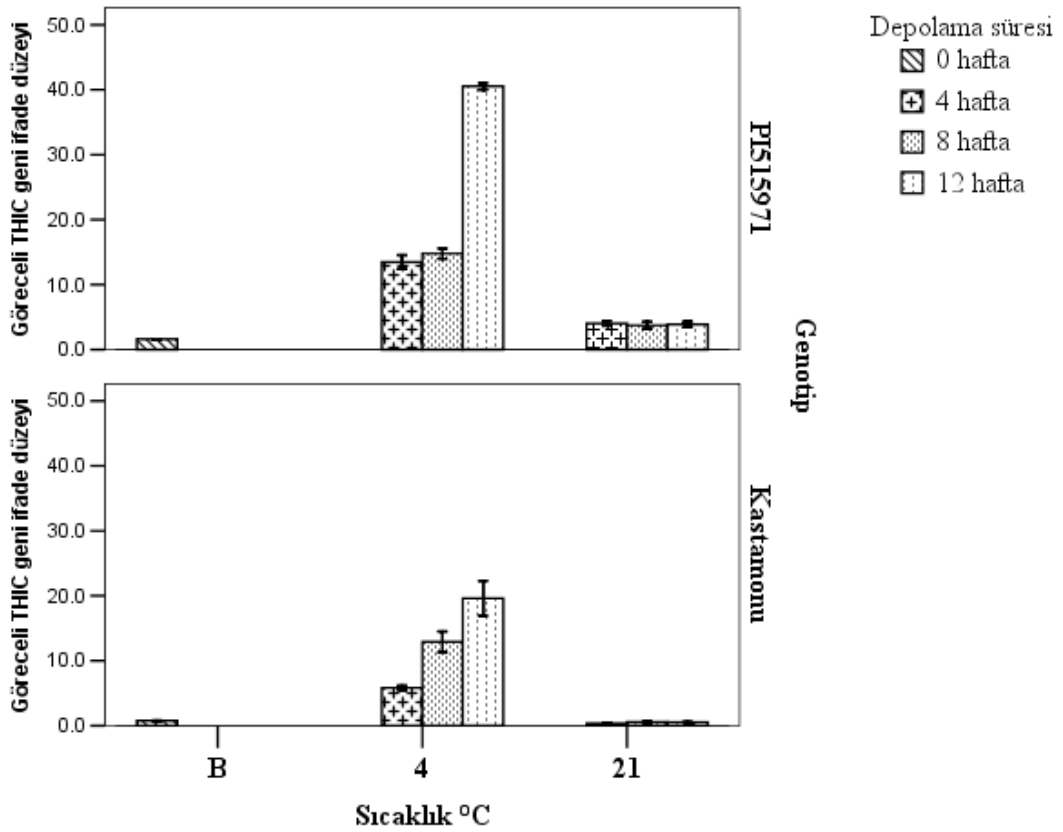
PI515971 genotipinin 21°C'de depolanan örneklerinin göreceli *THIC* geni ifade düzeylerine bakıldığında (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.4.), 4 hafta depolanan örneklerin ifadesinde (4,02), başlangıca (1,60) göre yaklaşık 2,5 kat artış bulunmaktadır. Aralarındaki bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bir farktır. Ancak daha sonraki depolama süreleri olan 8 ve 12 haftalık örneklerin göreceli *THIC* geni ifade düzeyi başlangıca göre yüksek olmasına karşın 4 haftalık örneklerden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır.

Kastamonu genotipi 4°C örneklerinin göreceli *THIC* geni ifade düzeylerine bakılacak olunursa (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.4.), başlangıç haftasında 0,78 düzeyinde iken 4 hafta depolanan örneklerde yaklaşık 7 kat bir artışla 5,82'ye yükselmiştir. Daha sonraki depolama süreleri olan 8 haftada bu düzey 12,91'e yükselerek başlangıca göre yaklaşık 16 kat, 12 haftada ise 19,61'e yükselerek başlangıca göre yaklaşık 25 kat arttığı belirlendi. Bu genotipin 4°C örnekleri için depolama süresine göreceli *THIC* geni ifade düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Her iki genotipin 4°C sıcaklıkta depolanan örneklerindeki göreceli *THIC* geni ifade düzeyleri karşılaştırılacak olunursa, Kastamonu sarımsağında depolama süresi arttıkça göreceli *THIC* geni ifade düzeyi artmış olsa da bu artış PI515971 sarımsak genotipi örneklerine göre düşük kalmıştır (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.4.). İki genotipin 21°C örneklerinin göreceli *THIC* geni ifade düzeylerine bakıldığında ise PI515971 genotipi örneklerinde başlangıca göre 4 hafta depolama süresi sonrası artış olduktan sonra göreceli ifade düzeyi sabit olarak kalmasına karşın, Kastamonu genotipi örneklerinde depolama sürelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.4.).

Çizelge 4.1. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve sürelerine göre *THIC* geni göreceli gen ifade düzeyi

Genotip	Depolama Sıcaklığı (°C)	Depolama süresi	THIC geni göreceli ifade düzeyi
PI515971	4	0 hafta	1,60±0,058
		4 hafta	13,48±1,85
		8 hafta	14,79±1,14
		12 hafta	40,54±0,73
	21	0 hafta	1,60±0,058
		4 hafta	4,02±0,64
		8 hafta	3,72±0,93
		12 hafta	3,88±0,68
Kastamonu	4	0 hafta	0,78±0,70
		4 hafta	5,82±0,60
		8 hafta	12,91±2,80
		12 hafta	19,61±4,66
	21	0 hafta	0,78±0,70
		4 hafta	0,36±0,08
		8 hafta	0,56±0,00
		12 hafta	0,55±0,01



Şekil 4.4. Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve sürelerine göre *THIC* geni göreceli gen ifade düzeyi. B; Başlangıç.

PI515971 sarımsak genotipinde göreceli *THIC* geni ifade düzeyinin sıcaklığa göre karşılaştırmasına bakıldığında (Çizelge 4.2.), 4°C’de depolanan örneklerde (21,58) 21°C’de depolanan örneklere (3,88) göre daha yüksek seviyede ifade olduğu, ancak başlangıca (1,60) göre her iki sıcaklıktaki göreceli ifade düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu genotipin sıcaklıklara bakılmaksızın depolama süresinin göreceli *THIC* geni ifade düzeyi üzerine etkisine bakıldığında başlangıca göre 4. Hafta örneklerinde ifade düzeyi (8,15) anlamlı olarak artmasına karşın 8. haftadaki ifade düzeyinin (8,75) 4. haftaya göre farklı olmadığı belirlenmiştir. 12 hafta depolanan örneklerde (18,54) ise en yüksek seviyede göreceli *THIC* geni ifade düzeyi tespit edilmiştir. Çizelge 4.2.’de yer alan verilere göre PI515971 genotipinde göreceli *THIC*

geni ifade düzeyinde depolama süresi ve depolama sıcaklığı arasındaki interaksiyon %1 önem seviyesinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.2. PI515971 sarımsak genotipinin *THIC* geni ifade düzeyinin depolama sıcaklığı ve sürelerine göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksiyonları

Değişkenler	<i>THIC</i> göreceli ifade düzeyi
Depolama sıcaklığı (°C)	
Başlangıç	1,60c
4	21,58a
21	3,88b
Depolama süresi	
0 hafta	1,60c
4 hafta	8,15b
8 hafta	8,75b
12 hafta	18,54a
ANOVA	
Dönem x Depolama Sıcaklığı	**

Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında en az %5 önem seviyesinde farklılık vardır.

**; %1 seviyesinde önemli.

Kastamonu sarımsak genotipinde göreceli *THIC* geni ifade düzeyinin sıcaklıklara göre karşılaştırmalı analizine bakıldığında (Çizelge 4.3.), 4°C’de depolanan (12,78) örneklerin başlangıç (0,78) örneklerine göre ifade düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Aralarındaki bu fark istatistiksel olarak da anlamlıdır. Ancak 21°C’de depolanan örneklerin göreceli *THIC* geni ifade düzeylerinde (0,49), başlangıca göre istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Depolama sürecindeki sıcaklıklar dikkate alınmaksızın bu genotipteki göreceli *THIC* geni ifade düzeylerinin başlangıç örneklerinde 0,78 ve 4. haftada 3,64’dir. Aralarındaki ifade düzeyi farkının istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir. Sekiz (7,97) ve 12 hafta (11,98)

depolanan örneklerde ise kendi aralarında istatistiki fark bulunmazken, başlangıç ve 4 haftalık örneklerle göre göreceli *THIC* gen ifade düzeylerinin istatistiki olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir. Çizelge 4.3.'de yer alan verilere göre Kastamonu genotipinde göreceli *THIC* gen ifade düzeyinde depolama süresi ve depolama sıcaklığı arasındaki etkileşim %1 önem seviyesinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Kastamonu sarımsak genotipinin *THIC* gen ifade düzeyinin depolama sıcaklığı ve sürelerine göre karşılaştırmalı analizleri ve etkileşimleri

Değişkenler	<i>THIC</i> gen göreceli ifade düzeyi
Depolama sıcaklığı (°C)	
Başlangıç	0,78b
4	12,78a
21	0,49b
Depolama süresi	
0 hafta	0,78b
4 hafta	3,64b
8 hafta	7,97a
12 hafta	11,98a
ANOVA	
Dönem x Depolama Sıcaklığı	**

Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında en az %5 önem seviyesinde farklılık vardır.

**; %1 seviyesinde önemli.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tiamin (B1 vitamini) bakteri, maya ve yüksek yapılı bitkiler tarafından öncül maddelerden *de nova* olarak sentezlenebilmektedir. Hayvanlar ise tiamini ekzojen kaynaklardan besin yoluyla almaları gerekmektedir. Tiaminin aktif formu olan tiamin difosfat (TDP; tiamin pirofosfat, TPP)'a dönüşümü tüm canlılar tarafından yapılabilmektedir (Rapala-Kozik ve ark. 2008). Yapılan araştırmalarda tiamin eksikliğinde insanlarda Wilson's hastalığı, beriberi, Wernicke-Korsakoff sendromu (WKS), Alzaymır ve alkolik-ketoasidoza rastlanıldığı belirlenmiştir (Goyer ve Haynes 2011, Anonim 2016).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında 4°C ve 21°C'de 0, 4, 8 ve 12 hafta depolanmış Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde RT-PCR ile göreceli ifade düzeyini incelemiş olduğumuz *THIC* geni, tiamin biyosentezinde Pirimidin halkasının oluşumunda görev alan HMP-P kinaz enzimini kodlamaktadır.

Gerçekleştirilen analizler sonucu *THIC* geninin göreceli ifade düzeyinde en yüksek sonuçlar PI515971 genotipinin 4°C'de 12 hafta süre depolanan örneklerinde gözlemlenmiştir (bkz Şekil 4.4., Çizelge 4.1.). Bu ifade düzeyini takip eden en yüksek ifade düzeyine ise Kastamonu genotipinin 4°C'de 12 hafta boyunca depolanan örneklerinde rastlanmaktadır.

PI515971 genotipinin 4°C'de depolanan örneklerine bakıldığında 0. haftaya göre 4. hafta örneklerinin göreceli ifade düzeyleri anlamlı olarak artmış, 8. hafta örneklerinde ise 0. haftaya göre anlamlı artış olmasına karşın, 4. hafta örneklerine göre artış olmamıştır. On ikinci hafta örneklerinde ise hem başlangıç hem de diğer iki döneme göre ifade düzeyinde büyük bir artış tespit edilmiştir. 21°C'de depolanan örneklerine bakıldığında ise başlangıca göre 4. hafta örneklerinde sadece anlamlı bir artış olmasına karşın daha sonraki depolama süreleri olan 8 ve 12 haftalık dönemlerdeki ifade düzeylerinin 4. hafta örneklerine yakın olduğu belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.1.).

Kastamonu genotipinin *THIC* geni göreceli ifade düzeylerine bakıldığında ise 4°C’de depolanan örneklerde 0. haftaya göre 4, 8 ve 12 hafta depolanan örneklerde ifade düzeyleri anlamlı artışlar göstermiştir. 21°C’de depolanan örneklerde ise 0, 4, 8 ve 12 hafta depolanan örneklerinde oluşan ifade düzeyleri birbirine çok yakın olmakla birlikte her iki genotipte oluşan tüm ifade düzeyleri dikkate alındığında en düşük ifade düzeylerinin bu örneklerde gerçekleştiği belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.1., Şekil 4.4.).

Çalışmış olduğumuz iki genotipte depolama sürelerinin ve depolama sıcaklıklarının istatistiksel olarak %1 önem seviyesinde *THIC* geninin ifade düzeyi artışında etkili oldukları belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.).

TDP’in asetil-CoA sentezi, trikarboksilik asit döngüsü, pentoz fosfat yolu/ Calvin döngüsü, anaerobik etanolik fermantasyon, dallı-zincirli amino asit biyosentezi, isoprenoid biyosentezi, karbonhidrat katabolizması ve bitki pigment biyosentezi gibi büyük metabolik yollarda görev alan enzimlerde kofaktör olarak görev alması (Rapala-Kozik 2008, Tunc-Ozdemir 2009), hasat sonrası dormansi halinde olan sarımsak başlarında tekrardan gelişim sağlanabilmesi açısından *THIC* geninin ifade düzeyinin depolama süresince kademeli (bkz. Çizelge 4.2., Çizelge 4.3.) bir şekilde değiştiğini ve dişlerde sürgün gelişimini tetiklediği (bkz. Şekil 4.3.) düşünülmektedir. Nitekim daha önce tamamlanan TÜBİTAK-TOVAG-1050551 nolu proje kapsamında yapılan çalışmada oda sıcaklığı ve düşük sıcaklık depolaması sonrası dikilen dişlerden gelişen bitkilerin gelişmeleri incelendiğinde düşük sıcaklıkta depolanan dişlerde sürgün gelişiminin daha hızlı olduğu ve bu bitkiler topraktan söküldüğünde dişlerde bulunan depo besin maddelerinin ise daha hızlı tüketildiği görülmüştür. Oda sıcaklığında depolanan dişlerden gelişen bitkilerde ise gelişme anormallikleri ve dişteki depo besin maddesinin ise tam olarak kullanılmadığı görülmüştür (İpek ve Utku, 2013). Bu çalışmadan elde edilen sonuç oda sıcaklığında depolama sonunda gelişen sarımsak bitkilerinde karbonhidrat katabolizmasının tam olarak çalışmadığına işaret etmektedir. Bu durum karbonhidrat katabolizmasında görev alan enzimlerin kofaktörü olan tiaminin oda sıcaklığı depolama süresince yeterince sentezlenmemesinden kaynaklanmış olabilir.

Daha önce yapılan başka çalışmalarda da dikim öncesi farklı sıcaklık ve sürelerde depolamalar ile sarımsaklarda dikimden sonraki dönemdeki gelişimler incelenmiştir. Bandara ve ark. (1999) dikim öncesi sarımsaklara farklı sürelerde soğuk uygulayarak, başlarda verimin ve diş oluşumunun arttığını belirlemişlerdir. Rahman ve ark. (2003) değişik sıcaklık dereceleri ve süreleri uyguladıkları sarımsak başlarında, düşük sıcaklık uygulanan başlarda sürgün gelişiminin daha yüksek olduğunu belirleyerek, dormansinin kırılması için depolama sıcaklığının önemli olduğuna belirtmişlerdir. Yine benzer şekilde Volk ve Rotindo (2004) farklı sıcaklıklarda depoladıkları örneklerden soğuk uyguladıkları başların dikim döneminde daha başarılı bir şekilde diş oluşturduğunu belirlemişlerdir. Atashi ve ark. (2011) 30 gün 4°C’de depoladıkları örnekte klorofil, karotenoid, glikoz, amilaz ve invertazda artış gözlemlenirken sükroz ve nişasta içeriğinde düşüş belirledikleri başların en iyi filizlenmeyi de gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada depo besin maddesi olan sükroz ve nişanta miktarının düşük sıcaklık uygulaması ile düşmesi, düşük sıcaklıkta depolamanın sarımsakta dikim sonrası karbonhidrat katabolizmasının tam olarak çalışmasını sağladığını göstermektedir. Youssef (2013) farklı sıcaklık ve sürelerde depoladığı örneklerde düşük sıcaklık uyguladığı başlarda daha yüksek yaş verim, kuru verim, ortalama baş ağırlığı, baş çapı (cm) ve başta diş sayısı belirlemiştir.

Tiamin ile ilgili daha önce yapılan birçok çalışma önemli yollarda kofaktör olarak görev aldığı için stres koşullarında bitkiye sağladığı yararlar yönünde olmuştur. Ahn ve ark. (2005) çeltik, Arabidopsis ve sebze türlerinde fungal, bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı tiamin uygulanan örneklerin direnç geliştirdiğini ve bunu patojen-ilişkili genlerin ifadesini geçici olarak artırarak yaptığını belirlemişlerdir. Rapala-Kozik ve ark. (2008) mısır bitkisine abiyotik stres uygulamaları sonucu toplam tiamin miktarında ve tiamin sentezinde görev alan bazı enzim miktarlarında da artış belirlemişlerdir. Tunc-Ozdemir ve ark.(2009) Arabidopsis bitkisinde tiamin uygulaması sonrası oksidatif strese toleransın arttığını belirlemişlerdir. Rapala-Kozik (2012) tuz ve oksidatif stres uyguladıkları Arabidopsis fidelerinde tiamin difosfat biyosentezi ile ilgili *TH11*, *TH1C*, *TH1* ve *TPK* genlerinin ifadelerinin arttığını, ayrıca tiamin difosfatı kofaktör olarak kullanan bazı enzimlerin gen ifadelerinin arttığını belirlemişlerdir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, diğer çalışmalardan farklı olarak hasat sonrası dormansinin kırılması sürecinde iki ayrı sarımsak genotipinde iki ayrı sıcaklıkta, farklı sürelerde depolama uygulamasının gelişim özellikleri, kalitesi, verimliliği vb. incelemek haricinde bu sürede gen ifadesinde gerçekleşen değişim incelendi. Ayrıca tiaminin biyotik ve abiyotik stres koşullarındaki mekanizmasını çözebilmek adına gerek miktar çalışmaları gerekse gen ifadesi çalışmaları başka bitki türlerinde yapılmasına karşın, sarımsakta tiaminin gen ifadesi ile ilgili bir çalışma yürütülmemiştir.

Sonuç olarak, *THIC* geni ifade düzeyinin her iki genotipte de 4°C'de depolamada önemli düzeyde arttığı belirlendi. Bu da sarımsakta dormansinin kırılmasında önemli bir rolü olan düşük sıcaklığın bitkilerde önemli metabolik süreçlerde ko-faktör olarak görev yapan tiaminin sentezinde de önemli olduğunu göstermektedir. Bu çalışma ile tiamin biyosentezinde görev alan bir enzimi kodlayan *THIC* geninin ifade düzeyinin incelenmesi yapılarak sarımsakta dormansinin kırılması sürecinde gen ifade düzeyi ilk kez belirlenmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular sarımsakta dormansi ve vernalizasyon mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

- Ade-Ademilua, O. E., Iwaotan, T. O., Osaji, T. C. 2009.** Pre-planting (cold) treatment of *Allium sativum* cloves improves its growth and yield under open field and open shade conditions. *Journal of Plant Sciences*,4(3): 49-58.
- Ahn, I. P., Kim, S., Lee, Y. H. 2005.** Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology*, 138: 1505-1515.
- Anonim. 2014.** Dünya sarımsak üretimi. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (Erişim tarihi: 09.05.2016)
- Anonim. 2015.** Türkiye kuru sarımsak üretimi. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 30.04.2016)
- Anonim. 2016.** Tiamin eksikliğinde oluşan hastalıklar. <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiamine> (Erişim tarihi:10.05.2016)
- Arguello, J., Ledesma, A., Bottini, R. 1991.** Hormonal regulation of dormancy in garlic (*Allium sativum* L.) cv Rosado Paraguayo. *Agriscientia*, VIII: 9-14.
- Atashi, S., Akbarpour, V., Mashayekhi, K., Mousavizadeh, S.J. 2011.** Garlic physiological characteristics from harvest to sprouting in responses to low temperature. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2(15): 285-291.
- Diriba-Shiferaw, G., Woldetsadik, K., Nigussie-Dechassa, R., Tabor, G., Sharma, J. J. 2013.** Postharvest quality and shelf life of garlic bulb as influenced by storage season, soil type and different compound fertilizers. *Journal of Postharvest Technology*,1(1): 69-83.
- Bandara, M.S., Krieger, K., Slinkard, A. E., Tanino, K. K. 1999.** Pre-planting chilling requirements for cloving of spring-planted garlic. *Canadian Journal of Plant Science.*, 80(2): 379-384.
- Brewster, J.L. 1990.** The genus *Allium* L. : Onions and Allied crops volume I. Editörler: Brewster, J.L., Rabinowitch, H. D., CRC Press, Florida, pp 2-15.
- Brewster, J.L. 1997.** Onions and garlic: The physiology of vegetable crops, Editör: Wien, H. C., CAB International, New York, USA, pp. 581-619.
- Brewster, J. L. 2008.** Crop Storage and Dormancy: Onions and Other Vegetable Alliums. CAB International, Wallingford UK. pp: 146-169.
- Bulakbaşı-Balcı, T. 2009.** İlaç direnci gelişen kronik myeloid lösemi olgularında BCR-ABL1 T3151 mutasyonları ve AHI1 gen ifadenme düzeylerinin belirlenmesi. *Uzmanlık Tezi*, BÜ, TIP FAKÜLTESİ, Ankara.

Goyer, A., Haynes, K. G. 2011. Vitamine B1 content in potato: effect of genotype, tuber enlargement, and storage, and estimation of stability and broad-sense heritability. *American Journal of Potato Research*, 88: 374-385.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6:279-284.

İpek, M. 2011. Sarımsak yetiştiriciliği (*Allium sativum* L.): Bahçe tarımı II, Editörler: Şeniz, V., Erdoğan, V., Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, pp. 171-173.

İpek M., Utku Ö. 2013. Dikim öncesi depolama sıcaklığının sarımsak (*Allium sativum* L.) klonlarında bitki gelişimi üzerine etkisi. *Bahçe*, 42: 1-10.

Liu, M., Wu, Z., Jiang, F. 2015. Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 122(2): pp435-444.

Nosaka, K. 2006. Recent progress in understanding thiamine biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 30-40.

Özmen, M. 2011. Tavuk trakelerinde mycoplasma gallisepticum'un real-time PCR tekniği ile saptanması ve istatistik analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, ÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Rahman, M.H., Haque, M.S., Ahmed, M. 2003. Pre-planting temperature treatments for breaking dormancy of garlic cloves. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2(1): 123-126.

Rahman, M.H., Haque, M.S., Karim, M.A., Ahmed, M. 2006. Effect of Gibberellic Acid (GA₃) on breaking dormancy in garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Agriculture & Biology*, 8(1):63-65.

Rapala-Kozik, M., Kowalska, E., Ostrowska, K. 2008. Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedling under conditions of abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59(15): 4133-4133.

Rapala-Kozik, M., Wolak, N., Kujda, M., Banas, A. K. 2012. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMS Plant Biology*, 12(2): 1471-2229.

Richard, G. P., Watson, M. A., Kingsley, D. H. 2004. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stool. *Journal of Virological Methods*, 116: 63-70.

Simon, P. W., Jenderek, M. M. 2003. Flowering, seed production, and the genesis of garlic breeding: *Plant Breeding Reviews*, volume 23, Editörler: Janick, J., Wilay, USA, pp. 211-244.

Sanlıdilek, S. D. 2009. Light cycler real time PCR teknolojisi ile faktör V geninde yeni mutasyon taranması. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

SETTEMBRE, E., Begley, T.P., Ealick, S.E. 2003. Structural biology of enzymes of the thiamine biosynthesis pathway. *Current Opinion in Structural Biology*, 13, 739–747.

Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Misra, A. N., Mittler, R., Shintani, D. 2009. Thiamine confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151: 421-432.

Volk, G. M., Rotindo, K. E., Lyons, W. 2004. Low –temperature storage of garlic for spring planting. *Hort Science*,. 39(3): 571-573.

Youssef, N. S. 2013. Growth and bulbing of garlic as influenced by low temperature and storage period treatments. *World Rural Observations*, 5(2): 47-57.

Yüzbaşıoğlu, A. 2008. Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Saime KOÇÇAT
Doğum Yeri ve Tarihi : Yukarı Girne/Girne K.K.T.C. - 23/09/1992
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yılı)

Lise : Girne Anafartalar Lisesi-2010
Lisans : Uludağ Üniversitesi – Biyoloji Bölümü-2014

İletişim (e-posta) : skoccat@gmail.com