

**SARIMSAKTA (*Allium sativum* L.) DÜŞÜK SICAKLIKTA  
DEPOLAMA UYGULAMASINDAN FARKLI ETKİLENEN ADAY  
GENLERİN cDNA- AFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**Özlem GÜNAYDIN**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARIMSAKTA (*Allium sativum* L.) DÜŞÜK SICAKLIKTA DEPOLAMA  
UYGULAMASINDAN FARKLI ETKİLENEN ADAY GENLERİN cDNA- AFLP  
YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**Özlem GÜNAYDIN**

Yrd. Doç. Dr. Ahmet İPEK

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA-2011

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Özlem GÜNAYDIN tarafından hazırlanan “Sarımsakta (*Allium sativum* L.) Düşük Sıcaklıkta Depolama Uygulamasından Farklı Etkilenen Aday Genlerin cDNA-AFLP Yöntemi İle Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Yrd. Doç. Dr. Ahmet İPEK

**Başkan** : Prof. Dr. Vedat ŞENİZ İmza:

Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Himmet TEZCAN İmza:

Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Ahmet İPEK İmza:

Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Kadri Arslan**

**Enstitü Müdürü**

**24/02/2011**

## **Bilimsel Etik Bildirim Sayfası**

**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 yararlanılması 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.**

**24/02/2011**

**İmza**

**Özlem Günaydın**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### SARIMSAKTA (*Allium sativum* L.) DÜŞÜK SICAKLIKTA DEPOLAMA UYGULAMASINDAN FARKLI ETKİLENEN ADAY GENLERİN cDNA- AFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

**Özlem GÜNAYDIN**

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Danışman:** Yrd. Doç. Dr. Ahmet İPEK

Sarımsak (*Allium sativum* L.) yüzyıllardan beri insan sağlığı açısından önemli kültür bitkilerinden biridir. Kültürü yapılan sarımsak genotipleri genelde çiçeklenmemekte çiçeklenen genotipler ise tohum üretmemektedir. Bu tez çalışmasında, dikim öncesinde dişlerin 4°C'de depolanmasının bitki morfolojisi üzerindeki etkilerinin gözlenmesi ve hangi genleri farklı etkilediğinin cDNA-AFLP yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bitki materyali olarak G1, G2, G3 ve G4 şeklinde adlandırılan dört sarımsak genotipi kullanılmıştır. Bu genotiplerden G1 ve G2 çiçeklenirken, G3 ve G4 çiçeklenmeyen genotiplerdir. Sarımsak genotiplerine ait başların bir kısmı dikim öncesi 4°C'de ve diğer bir kısmı ise 20°C'de, üç ay süre ile depolanmıştır. Depolama öncesinde ve depolama sonrasında dişlerden büyüme meristemi örnekleri alınırken; bitkiler 3-4 yaprak aşamasındayken ve bitkiler 7-9 yaprak aşamasındayken ise büyüme meristemi, yaprak, çiçek sürgünü, çiçek sapı örnekleri alınmıştır. Dört farklı gelişme döneminde alınan toplam kırk dört örnek arasında farklı ifade olan genler cDNA-AFLP yöntemi ile yirmi primer kombinasyonu denenerek belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre, 4°C'de depolanan sarımsak dişlerinin 20°C'de depolanan sarımsak dişlerine göre daha önce sürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca 4°C'de depolanan sarımsak genotiplerinin dişlerinden gelişen bitkiler, 20°C'dekilere göre çok daha hızlı ve sağlıklı bir gelişme göstermiştir. 20°C'de depolanan sarımsak genotiplerinin dişlerinden gelişen bitkilerde virüs semptomuna benzeyen, düzgün olmayan bir görünüm gözlenmiştir. Buna ek olarak, 4°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde baş oluşumunun daha erken başladığı tespit edilmiştir. Bütün genotiplerde; 4°C'de üç ay süre ile depolanan dişlerden gelişen bitkilerin ortalama yaprak sayısı, ortalama yalancı gövde uzunluğu (cm) ve ortalama yalancı gövde çapının (mm) 20°C'de depolanan dişlerden gelişen bitkilerin ortalamalarından daha fazla olduğu saptanmıştır.

cDNA-AFLP analizlerinde yirmi primer kombinasyonundan elde edilen bulgulara göre değerlendirilen 451 banttın 352 tanesi polimorfik, 99 tanesi ise dört genotipte dört farklı örnekleme aşamasında sürekli olarak ifade olan genleri göstermektedir. XabICC-MseICAT primer kombinasyonundan belirlenen bir bant, dişleri düşük sıcaklıkta

depolanan bütün genotiplerin meristemlerinde ifade olurken aynı genotiplerin oda sıcaklığında depolanmış dişlerden elde edilen meristemlerde görülmemiştir. Bu bantın dizi analizi yapılmış ve NCBI gen bankasında yapılan BLAST analizinde thiamin biyosentezinde görev yapan bir protein olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, sarımsak başlarının dikim öncesi düşük sıcaklıkta depolanması, dikimden sonra sarımsak bitkisinin gelişimini olumlu etkilediği gözlenmiştir. Yapılan cDNA-AFLP analiziyle ise dikim öncesi düşük sıcaklıkta depolanmasının sarımsakta gen ifade profilini de değiştirdiği belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Sarımsak, cDNA-AFLP, mRNA, DNA, gen ifadesi  
**2011, ix + 55 sayfa.**

## ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF DIFFERENTLY EXPRESSED CANDIDATE GENES IN GARLIC (*Allium sativum* L.) EFFECTED BY LOW TEMPERATURE STORAGE USING cDNA-AFLP

**Özlem GÜNAYDIN**

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Horticulture

**Supervisor:** Asst. Prof. Dr. Ahmet İPEK

Garlic (*Allium sativum* L.) is one of the cultivated plants and it is important for human health for centuries. Cultivated garlic genotypes usually do not flower and those that flower do not produce seed. Therefore, garlic has been cultivated by repropagating asexually. The purpose this MSc Thesis was to determine the effect of the storage of the garlic bulbs at 4°C before planting on plant morphology and on gene expression in garlic using cDNA-AFLP.

As plant materials, four garlic genotypes called G1, G2, G3 and G4 were used. While G1 and G2 were flowering garlic genotypes, the genotypes, G3 and G4 do not flower. One group of bulbs of these genotypes was stored at 4°C and another group of bulbs belongs to these genotypes stored at 20°C for three months. While meristems from the cloves of these genotypes were sampled both before and after storage, growing meristem, leaf and flower stalk samples were taken when the plants were at 3-4 and 7-9 leaf stages. Differentially expressed genes among the 44 samples taken from four different plant developmental stages were determined using twenty primer combinations of cDNA-AFLP.

According to the results obtained from this study, cloves stored at 4°C start growing earlier than those stored at 20°C. In addition, plants developed from the cloves stored at 4°C grew faster and produced healthier plants than those developed from the cloves stored at 20°C. Plants developed from the cloves stored at 20°C had leaves with virus like symptoms. Moreover, plants developed from the cloves stored at 4°C started bulb formation earlier. For all genotypes, plants developed from the cloves stored at 4°C had more leaves per plant, longer plant height and larger stem diameter.

Twenty primer combinations in cDNA-AFLP analysis generated a total of 451 bands. 352 of these bands were polymorphic while remaining 99 bands were monomorphic. A band from XabICC-MseICAT primer combination were present in meristem of cloves stored at 4°C but it was absent in the meristem of the cloves stored at 20°C. Nucleotide sequence of this band was determined and blasted against to sequences in the GenBank at NCBI. The sequences of this band significantly matched with the sequences of a gene in the pathway of thiamin biosynthesis.

In conclusion, storage of bulbs at low temperatures before planting promotes plant development after planting. cDNA-AFLP analysis demonstrated that storage of bulbs at low temperatures before planting changed the gene expression profile of garlic plants.

**Key words:** Garlic, cDNA-AFLP, mRNA, DNA, gene expression  
**2011, ix + 55 pages.**



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol göstererek katkıda bulunan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet İPEK'e ve Sayın Doç. Dr. Meryem İPEK'e çok teşekkür ederim.

Tez savunma sınavımda bilgi ve tecrübeleri ile değerli katkılarını esirgemeyen jüri üyelerim; başta Sayın Prof. Dr. Vedat ŞENİZ olmak üzere, Sayın Doç. Dr. Himmet TEZCAN ve tez danışmanıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olan Sayın Prof. Dr. Vedat Şeniz'e ayrıca teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında yardımını gördüğüm Arş. Gör. Müge KESİCİ ve Arş. Gör. Çiğdem AYDOĞAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca üniversite eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini gördüğüm ve çalışmalarım süresince de sabır ve ilgisini sürekli hissettiğim Sayın Cüneyt UTKU'ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK destekli 105O551 No'lu proje kapsamında gerçekleştirildiğinden TÜBİTAK'a da teşekkür ederim.

Özlem Günaydın

24/02/2011

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	9
2.1. Sarımsakta düşük sıcaklık uygulamasının vejetatif gelişim üzerine etkisi .....	9
2.2. Düşük sıcaklık uygulamasının generatif gelişim üzerine etkisi .....	10
2.3. Düşük sıcaklık uygulamasının tohum oluşumu ve çimlenme üzerine etkisi.....	11
2.4. Düşük sıcaklık uygulamasının aroma bileşenleri üzerine etkisi .....	11
2.5. Sarımsakta yapılan moleküler çalışmalar.....	12
2.6. cDNA-AFLP tekniği ile ilgili yapılmış çalışmalar .....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Yöntem .....	15
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi, morfolojik ölçümler ve örnek alınması.....	15
3.2.2. Toplam RNA izolasyonu .....	18
3.2.3. mRNA izolasyonu.....	19
3.2.4. cDNA sentezi.....	20
3.2.5. cDNA-AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizleri.....	21
3.2.5.1. cDNA'ların restriksiyon enzimleri (MseI ve XapI) ile kesilmesi.....	21
3.2.5.2. Adaptörlerin bağlanması.....	22
3.2.5.3. Ön seçici çoğaltması.....	22
3.2.5.4. Seçici çoğaltma .....	23
3.2.6. Farklılık gösteren bantların belirlenmesi.....	24
3.2.7. cDNA-AFLP bantının nükleotid dizi analizi (sekanslama).....	24
3.2.7.1. cDNA-AFLP bantının poliakrilamid jelden kesilmesi ve izole edilmesi.....	25
3.2.7.2. Poliakrilamid jelden izole edilmiş cDNA-AFLP bantının agaroz jelden izole edilmesi.....	25
3.2.7.3. Dizi analizi için PCR aşaması.....	26
3.2.7.4. PCR ürünün saflaştırılması ve DNA dizi analizi .....	27
3.2.8. Morfolojik ölçümlerin istatistiksel analizleri .....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Morfolojik Gözlemler.....	28
4.1.1. Yaprak sayısı .....	34
4.1.2. Yalancı gövde uzunluğu .....	37
4.1.3. Yalancı gövde çapı .....	40
4.2. cDNA-AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) Analizleri.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

### Açıklama

%	Yüzde
°C	Santigratderece
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

### Kısaltmalar

### Açıklama

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
Blast	Basic local alignment searching tool
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Dietil pirokarbonat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Institute
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleikasit
RT	Revers transkriptaz
SSR	Simple Sequence Repeats

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 3.1. Dikimden yirmi üç gün sonra kontrollü bitki büyütme kabiniinde G4 genotipinden bir görünüm.....	16
Şekil 4.1. Dikimden yirmi üç gün sonra G3 genotipi için; 20°C'de depolanan dişler henüz sürmemişken, 4°C depolanan dişlerden elde edilen bitki iki yaprak aşamasına gelmiştir.....	29
Şekil 4.2. G2 (A), G3 (B) ve G4 (C) genotiplerinde her iki uygulama için görülen gelişimsel farklılıklar .....	29
Şekil 4.3. G1 genotipinin 4°C ve 20°C'de depolanan dişlerinden gelişen bitkiler .....	30
Şekil 4.4. G1 (A), G2 (B), G3 (C) ve G4 (D) genotipleri için 4°C ve 20°C depolanan dişlerden elde edilen bitkiler arasında gelişme yönünden farklılıklar .....	30
Şekil 4.5. A) G4 genotipi, sökülen düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı uygulanmış bitkiler B) Düşük sıcaklık uygulaması C) Oda sıcaklığı uygulaması.....	31
Şekil 4.6. A) G1 genotipinde her iki sıcaklık uygulaması için baş oluşumunu karşılaştırma B) +20°C'de depolanan dişlerden gelişen bitki C) +4°C'de depolanan dişlerden gelişen bitkide baş oluşumu .....	33
Şekil 4.7. G1 (A), G2 (B), G3 (C) ve G4 (D) için 4°C ve 20°C depolanan dişlerden elde edilen bitkiler arasında kök gelişimi yönünden farklılıklar .....	34
Şekil 4.8. Dikim öncesi depolama sıcaklığına bağlı olarak, dikimden kırk beş gün (06.01.2010) ve dikimden doksan gün sonra (22.02.2010) sarımsak genotiplerinin ürettiği yaprak sayılarının karşılaştırılması .....	35
Şekil 4.9. Dikim öncesi depolama sıcaklığına bağlı olarak, dikimden kırk beş gün (06.01.2010) ve dikimden doksan gün (22.02.2010) sonra sarımsak genotiplerinde meydana gelen yalancı gövde uzunluklarının karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.10. Dikim öncesi depolama sıcaklığına bağlı olarak, dikimden kırk beş gün (06.01.2010) ve dikimden doksan gün sonra (22.02.2010) sarımsak genotiplerindeki yalancı gövde çaplarının (mm) karşılaştırılması .....	41
Şekil 4.11. 4°C'de ve 20°C'de depolanan sarımsak genotiplerinde depolamaya bağlı olarak farklı ifade olan gen. A, C, E ve G oda sıcaklığında depolanan sırasıyla G4, G3, G2 ve G1 sarımsak genotipleri. B, D, F ve H düşük sıcaklıkta depolanan sırasıyla G4, G3, G2 ve G1 sarımsak genotipleri .....	47

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. cDNA-AFLP analizleri için sarımsak genotiplerinin farklı gelişme dönemlerinde yapılan örnekleme zamanları ve tipleri.....	17
Çizelge 3.2. Seçici çoğaltmada kullanılan primer kombinasyonları .....	23
Çizelge 4.1. Dikim tarihinden itibaren sarımsak dişlerinin sürme tarihleri .....	28
Çizelge 4.2. Dikimden yüz on beş ve yüz yirmi gün sonra G1, G2, G3 ve G4'te her iki sıcaklık uygulaması için bitkiler arasındaki karşılaştırma .....	32
Çizelge 4.3. Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonra 4°C'de ve 20°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde yaprak sayımındaki farklılıklar .....	35
Çizelge 4.4. Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonra 4°C'de ve 20°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde yalancı gövde uzunluğundaki (cm) farklılıklar .....	38
Çizelge 4.5. Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonra 4°C'de ve 20°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde yalancı gövde çapındaki (mm) farklılıklar..	41
Çizelge 4.6. cDNA-AFLP analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve bu primer kombinasyonlarından değerlendirilen bant sayısı .....	44
Çizelge 4.7. cDNA-AFLP analizinde yirmi primer kombinasyonundan yaprakta, mersitemde ve iki farklı depolama uygulamasında elde edilen veriler.....	45

## 1-GİRİŞ

Anavatanı Orta Asya olan sarımsağın ( *Allium sativum* L. ) ikinci orijin merkezi Anadolu'dur. Türkiye, bu bitkinin ikinci gen merkezi olarak tanımlanan Akdeniz havzasından Kafkaslara kadar olan bölgenin içinde yer alması nedeniyle populasyon olarak zengin bir ülkedir (Etoh ve Simon 2002, Beşirli ve Yanmaz 2007).

*Allium* ve ona bağlı türler, kapalı tohumlular hakkında yapılan ilk sınıflandırma çalışmalarında *Liliaceae* familyasına (Melchior 1964), daha sonra çiçek durumları incelenerek *Amaryllidaceae* familyasına dahil edilmişlerdir. Günümüzde, tek çeneklilerle ilgili yapılan ve en çok kabul gören sınıflandırmada *Allium* türlerinin *Amaryllidaceae*'ye yakın *Alliaceae* adındaki başka bir familyaya ait olduğu kabul edilmiştir (Takhtajan 1997). Buna göre sarımsağın botanik olarak sınıflandırılması aşağıdaki gibidir:

Sınıf : *Liliopsida*  
Altsınıf : *Liliidae*  
Üsttakım : *Lilianae*  
Takım : *Amaryllidales*  
Familya : *Alliaceae*  
Altfamilya : *Allioideae*  
Cins : *Allium*  
Tür : *Allium sativum* L.

Sarımsak, soğandan sonra *Allium* türleri içindeki en önemli ikinci kültür bitkisidir. Çok önemli bir baharat ve tıbbi bitki olarak dünya üzerinde ılıman iklimden subtropikal iklime kadar geniş bir coğrafyada yetiştirilir (Fritsch ve Friesen 2002). Uzun yıllar boyunca tıbbi amaçlarla ve özellikle antimikrobiyel etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Son yıllarda bu özelliği yanında kolesterolü düşürücü, toksik etkiyi ve oksidasyonu önleyici, yüksek tansiyonu ve sinir sistemini düzenleyici, kanser önleyici, kalp dolaşımını düzenleyici etkisi nedeniyle yaygın olarak tüketilmektedir (Harris ve ark. 2001).

Sarımsağın insan sağlığında oynadığı rolün belirlenmesinden sonra üretimi ve tüketimi önemli ölçüde artmıştır (Vural ve ark. 2000). FAO'nun verilerine göre; dünya sarımsak üretimi 16 417 034 tondur. Ülkemiz ise 81 070 ton (% 4.93' lük üretim payı ) ile dünyadaki ilk yirmi ülke arasında on ikinci sırada yer almaktadır. Üretimde dünya üzerinde söz sahibi ilk üç ülke sırasıyla; Çin (12 088 000 ton) (% 73.63' lük üretim payı), Hindistan (645 000 ton) ve Güney Kore (325 000 ton)'dir (Anonim 2008). Sarımsak ülkemizin bütün bölgelerinde yetiştirilmesine rağmen sarımsak üretimi Kastamonu (20 380 ton), Hatay (8749 ton), Balıkesir (8344 ton), Kahramanmaraş (7955 ton) ve Gaziantep (5386 ton) illerinde yoğunlaşmıştır (Anonim 2009). Kastamonu ilindeki sarımsak üretiminin tamamına yakını (% 85-90) bu ilin Taşköprü ilçesinde yapılmaktadır.

Sarımsak uzun gün bitkisi olup ılıman iklim kuşağında yetişir. Sıcaklığın 15-20°C, nemin % 60 civarında olması yeterlidir. Bitkinin yeşil aksamı 15°C'nin üzerinde iyi gelişme gösterir. Sıcaklık 25°C'yi geçtiğinde ise gelişme yavaşlar, yapraklarda külleme hastalığı belirtileri ve sararma görülür. Kısa gün koşullarında, düşük veya çok yüksek sıcaklıkta bitki gelişmesi yavaşlar, verim oldukça azalır (Sabuncu 2005).

Geçmişten günümüze ticari olarak üretilen bütün sarımsak genotipleri tamamen kısırdır (Etoh ve Simon 2002). Bazı sarımsak genotipleri çiçek üretebilirken, bazı genotiplerin ise çiçeklenme özelliği yoktur. Çiçeklenen genotiplerde kısırlık sebepleri; generatif ve vejetatif organlar arasındaki besin rekabeti, tapetumun erken bozulması, çiçek tozu kısırlığı, üreticilerin baş iriliği lehine yaptıkları seleksiyonlar olarak gösterilmektedir (Koul ve Gohil 1970, Novak 1972, Etoh 1985). Dolayısıyla sarımsak vejetatif olarak çoğaltılmakta ve bu da gen kaynağı çeşitliliğinin sınırlı kalmasına neden olmaktadır. Klonal üretim, bu bitkilerin başta virüs olmak üzere üretim materyali ile taşınabilen birçok patojenle bulaşık olmasına ve doayısıyla verim ve kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Klonal üretim aynı zamanda sarımsakta üretim ve tohumluk depolama maliyetlerini de arttırmaktadır.

Sarımsakta tohum oluşumunun sağlanması, genetik özelliklerin genotipler arasındaki aktarımını kolaylaştırabilecek ve kültür çeşitlerinin klasik ıslah yöntemleriyle

geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır. Buna ek olarak; arzulanan genotiplerden tohum üretiminin sağlanması ile tohumla taşınmayan virüs hastalıklarına karşı alınacak önlemlerin maliyetlerinin düşmesi mümkün olacaktır. Üretim materyali ile taşınan hastalık ve zararlıların sebep olduğu ürün kaybını azaltacak ve depolama maliyetleri ile bu aşamada oluşacak üretim materyali kaybını en aza indirecektir (Kamenetsky ve ark. 2004).

Çiçeklenme, birçok *Allium* türünün de dahil olduğu çok sayıdaki bitkide, türün devamlılığının sağlanması açısından önemlidir. Çoğaltımda kullanılan organların genetiği ve çiçeklenme sürecinin anlaşılması, doğadaki bu en önemli süreç hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır (Kamenetsky ve Rabinowitch 2002). Kültürü yapılan önemli *Allium* türlerinden sarımsak ve soğanda çiçeklenmenin başlayabilmesi için soğuk uygulaması ve çiçek sapının uzaması için ise uzun fotoperiyod gereklidir (Takagi 1990, Kamenetsky ve Rabinowitch 2002). Çiçek sürgününde farklı sayılarda oluşan küçük dişler, çiçeklenme sırasında çiçeklerle eş zamanlı olarak gelişir ve erken dönemde çiçeklerin dejenerasyona uğramasına neden olmaktadır (Kamenetsky ve Rabinowitch 2001).

Sarımsak genotipleri arasında önemli ölçüde morfolojik varyasyon gözlenmiştir (İpek 2003). Baş büyüklüğü ve renginde olduğu gibi dişlerinin rengi, sayısı, büyüklüğü ve şekli bakımından da genotipler değişiklik gösterir. Ayrıca; yaprak sayısı, rengi, uzunluğu ve genişliğinde de büyük farklılıklar bulunur. Çiçek sapı oluşturan tipler olduğu gibi oluşturmayanları da mevcuttur. Çiçeklenen tipler de kendi içlerinde çiçek sürgünü, sap uzunluğu ve çiçek tablası üzerinde bulunan çiçek ve küçük dişlerin gelişimi, sayısı ve rengi ile anter renginde farklılıklar gösterir (Takagi 1990). Bu nedenle, bitkide genetik varyasyondaki artış sadece tesadüfi ve somaklonal varyasyonla ortaya çıkmıştır (Novak 1990). Çok sayıda farklı sarımsak klonunun bulunması, doğal mutasyonların gerçekleşmiş olabileceğini ve mutasyon tekniği ile varyasyon yaratılabileceğini düşündürmektedir (Beşirli ve ark. 2007).

Sarımsakta hem başlarla hem çiçeklerde oluşan küçük dişlerle üretim yapılabilir. Toprağa dişler dikildiğinde önce kökler sonra da yapraklar oluşur. Yapraklar dıştan içe



doğru gelişirler ve yaprak kınlarnn 20-60 cm kadar uzamasıyla yalancđ gövde oluşur. eşide bağlı olarak, bitkinin yeterli miktarda yaprak meydana getirmesinden sonra büyüme meristeminden yaprak gelişimi durur. Dişleri meydana getiren tomurcuklar bu dönemde yaprağın koltuğunda gelişerek depo halini alır. Yapraktan geriye kalan kısım incelererek gelişen sarımsak dişleri arasında kalır. Dışta kalan 5-6 yaprağın kınları başı korumak üzere dişlerden oluşan başı saracak şekilde gelişir (Vural ve ark. 2000). Bu yaprak kınları çiçeklenen türlerde iek sapının etrafını sararken çiçeklenmeyen türlerde böyle bir durum gözlenmez (İpek 2003). Sarımsağın gövdesi altta kökleri taşıyan rozet gövde şeklinindedir. Bu rozet üzerinde, başı oluşturun dişler dizilmiştir. Dişlerin her biri ve sarımsak başı, koruyucu birkaç kabuk tarafından sarılı durumdadır (Rubatzky ve Yamaguchi 1997).

Sarımsak iekleri erdişi (hermafrodit)'dir ve *Allium* türlerinin karakteristik özelliği olan altılı yapıdadır. Altı anak yaprak, altı ta yaprak, altı erkek organ ve üç karpelli bir dişi organdan oluşur (Jones ve Mann 1963). Bazı sarımsak genotipleri genetik özelliklerine ve bazı fizyolojik koşullara bağlı olarak morfolojik anlamda tam iek meydana getirir, fakat tohum oluşurmaz. Sarımsağın döllenme biyolojisi incelendiğinde çiçekte mayoz bölünmenin gerekleşiği görülür. Ancak ekirdek bölünmesi gerçekleşmez. Mikrosporlar yoğun bir protoplazma ile örtülür. Buna bağlı olarak vakuollerin oluşumu ile hücre içinde bir boşalma meydana gelir. Oluşan kuruma sonrası mikrosporların tamamı canlılığını kaybeder. Bunun sonucunda tohum oluşmayarak iek tablası üzerinde apomiktik dişler gelişir (Taner ve ark. 2004). Takenaka (1931) ilk defa sarımsakta mayoz bölünmeyi inceleyerek, düzensiz kromozom eşleşmeleri olduğunu belirlemiştir. Daha sonra Katayama (1936) farklı genotiplerde düzenli ve düzensiz mayoz bölünmeyi tespit etmiştir. Delesyon, duplikasyon, inversiyon ve translokasyonlar eşeysiz çoğaltılan soğanlı bitkilerde yaygın olarak görülür. Mayoz bölünme süresince bu işlemler yinelenmiş veya eksik kromozomlara neden olmuştur. Bu genetik dengesizlikler kısırlıkla sonuçlanır (Etoh ve Simon 2002).

1800'l yıllardan günümüze kadar yapılan bazı çalışmalarda, tohum üreten sarımsak genotiplerine rastlanmıştır (Hong ve Etoh 1996). Çoğu erkek fertil sarımsak genotipi

anthesiste mor anterler oluşturmaktadır ve bu önemli bir morfolojik markıdır. Bazı fertil genotiplerde ise mor pigmentasyon eksikliği vardır (Etoh ve Simon 2002). Fertil çiçeklerin anterlerinde oluşan polenlerin %50'den fazlası canlıdır. Sarı renkli anterlere sahip olan çiçekler ise genellikle polen oluşturmazlar (Hong ve Etoh 1996). Başarılı bir tohum üretimi için çiçek ve canlı gamet üretimi şarttır. Bu nedenle, çiçeklenmenin başlamasını engelleyen genetik yapı ve çevresel koşullar, polen veya ovul aborsiyonlarına neden olan kromozomal anormallikler ve patojenler araştırmacıların erkek fertil sarımsak ve tohum oluşumunun olmadığını düşünmelerine neden olmuştur (Etoh ve Simon 2002).

Etoh (1983a,b), Orta Asya'dan topladığı fertil sarımsak genotiplerinde küçük dişlerin uzaklaştırılmasıyla, tohum elde etmiştir. Küçük dişlerin uzaklaştırılması polen üretim potansiyelini, erkek organ fertilitasını, çiçek oluşumunu, tohum oluşumunu ve olgunlaşmasını teşvik etmektedir (Etoh ve ark. 1988). Ancak küçük dişlerin uzaklaştırılması çiçek sürgününde orta veya büyük diş oluşturan çeşitlerde etkili olurken, küçük dişli genotiplerde ise daha fazla sayıda küçük diş oluşumuna neden olmaktadır. Yapılan gözlemler sonucunda sarımsakta tohum üretimi ve fertilitenin genetik varyasyona bağlı olduğu görülmüştür (Etoh ve Simon 2002).

Günümüzde sarımsak genotipleri genellikle iki gruba ayrılmaktadır. Bunlarda; çiçek sapı üretenler (bolting/ hardneck) ve çiçek sapı üretmeyenlerdir (non-bolting/ softneck) (Jones ve Mann 1963). Sap üretme yetenekleri bakımından da farklılık göstererek (Gvaladze 1961, Takagi 1990, Etoh ve Simon 2002) aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

1. Tam çiçeklenen: Bitkiler birçok apomiktik diş ve farklı sayılarda çiçekle beraber uzun, kalın bir çiçek sapı oluştururlar,
2. Kısmi çiçeklenen: Bitki az sayıda apomiktik diş ve kısa bir çiçek sapı oluşturur; genellikle hiç çiçek oluşturmazlar,
3. Çiçeklenmeyen: Bitkiler normal olarak çiçek sapı oluşturmazlar, bunun yerine dişçikler yalancı gövde (pseudostem) içinde oluşurlar (Takagi 1990).

Tam çiçeklenen ve kısmi çiçeklenen genotipler uygun çevre koşullarında yetiştirildiklerinde çiçek tomurcukları oluşturur ve çiçeklenirler. Subtropikal ve tropikal bölgelerdeki çeşitler ılıman iklim bölgelerine ait genotiplere oranla çiçeklenme için daha az soğuklamaya ihtiyaç duyarlar. -2 ve 10°C arasında değişen indükleyici sıcaklıkların etkisi çeşitten çeşide büyük farklılıklar gösterir. Düşük sıcaklıkta uzun süreli depolanan başlar kısa süreli depolanan başlara oranla daha erken çiçeklenmiştir. Bununla beraber “*Yamagata*” çeşidinin 5 ay ve 2°C’de depolanmasının çiçeklenmeyi azalttığı belirlenmiştir (Takagi 1990).

Sarımsak  $2n=16$  kromozoma sahip diploid bir bitkidir. Genom büyüklüğü  $3 \times 10^{10}$  bp (30 milyar baz çifti)’dir. Sarımsağın bu büyük genomu ve tohum üretmemesi genetik ve moleküler çalışmaları sınırlamıştır. Sarımsak, içerdiği DNA miktarı açısından kültür bitkileri arasında genomu en büyük olan türlerden biridir. Buna neden olarak da daha çok protein üretmeyen DNA dizilimlerindeki tekrarlanmalar gösterilmektedir (İpek ve ark. 2003).

Çiçeklenmesinde ve tohum oluşumunda sorunlar olan sarımsağın ıslahı, klasik yöntemler yerine daha çok yabancı veya çevreye adapte olmuş türlerden yapılan seleksiyonla yapılmıştır. Fertil klonların tespitinden sonra sarımsakta eşeysel ıslah başlamıştır (Hong ve ark. 2000). Eşeysel olarak çoğalan üç yeni sarımsak varyetesi ıslah edilmiştir (Simon ve Jenderek 2003).

Doku kültürü ve genetik transformasyon sarımsak ıslahında alternatif yöntemler olarak düşünülmüştür. Meristem kültürü virüsten arı sarımsak bitkisi eldesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Somaklonal varyasyon yeni sarımsak klonları geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır, fakat bu metotla yeni bir klon geliştirilmemiştir. Birçok tek çenekli bitkide olduğu gibi sarımsakta da doku ve protoplast kültürü ile transformasyon çalışmalarında etkili sonuçlar alınamamıştır (İpek 2003). Mutasyon ıslahı da depolanabilirlik ve beyaz çürüklük hastalığına (*Sclerotinia sclerotiorum*) dayanıklılık gibi özellikleri olan yeni sarımsak klonlarının geliştirilmesini amaçlayan araştırmalarda kullanılmıştır (Taner ve ark. 2004).

Moleküler markırlar, bitki genetiğinin amaca uygun bir Şekilde y6nlendirilebilmesi i7in bilimsel 7alıŐmalarda kullanılmaktadır. Bitki ıslahında bu markırlardan nasıl yararlanılabileceği araŐtırılmaktadır. Seleksiyonda kullanılacak markır tipleri 67 sınıfta toplanabilir (Yıldırım ve ark. 2001). Bunlarda;

1. Morfolojik markırlar,
2. Biyokimyasal markırlar (Protein markırları),
3. Moleküler Markırlar (DNA markırları)'dır.
  - a. Hibridizasyona dayalı markırlar (RFLP)
  - b. PCR'a dayalı markırlar (AFLP, cDNA-AFLP, SSR, RAPD, SRAP vb.)

Moleküler markırlar; DNA'nın aktif b6lgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizinlerinden geliŐtirilebilirler (Yıldırım ve ark. 2001). Amino asit ya da DNA dizisinde bulunan polimorfizme dayanırlar. Moleküler markırların bitki molek6ler biyolojisinde kullanıldığı alanlara 6rnek olarak bitki genom haritalanması, markırlar yardımıyla ıslah (marker-assisted breeding), gen klonlama, tohum saflığı testleri ve saflık tayini verilebilir (Ayres ve ark. 1997). Ayrıca DNA markırları kullanılarak genetik 7eŐitlilik araŐtırılabilir. 6rneğin birbirine 7ok yakın olan k6lt6r 7eŐitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. T6rlerin taksonomik tanımlanması yapılabilir ve filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe ve ark. 1996).

Son yıllarda molek6ler d6zeyde daha ayrıntılı araŐtırmalar yapabilme fırsatı sağlayan molek6ler markır teknikleri, bitkiden alınacak 7ok az miktarda dokudan elde edilen DNA ile b6t6n bir genomun analizini m6mk6n kılması, genellikle yetiştirme koşullarının markırın ifadesini etkilememesi gibi bir7ok 6st6nl6kleri nedeniyle yoğun olarak kullanılmaktadır. B6ylece bitki genetik kaynakları daha doğru ve kesin bir Şekilde karakterize edilmeye baŐlanmıŐtır. Sarımsağın genetik yapısı, diğer *Allium* t6rleri ile olan akrabalığı, 7i7eklenmesi, sarımsak klonları arasındaki 7eŐitlilik ve 7eşit tespiti ile ilgili yapılan 7alıŐmalarda izoenzim, RAPD (Rastgele ArttırılmıŐ Polimorfik

DNA) ve AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) markırları kullanılmıştır (Pooler ve Simon 1993, İpek ve ark. 2003).

Bu çalışmada cDNA-AFLP yönteminin kullanılmasının nedeni; sarımsak genomunun çok büyük olması ve yaygın olarak genotiplerinde kısırılık probleminin görülmesinden dolayı bu bitkinin genomu hakkında ayrıntılı genetik bilginin bulunmamasıdır. Ayrıca söz konusu olan bitkinin DNA dizilimi hakkında gen bankalarında fazla bir bilgi de yoktur. Bu nedenlerle sarımsakta en uygun transkript (mRNA) profili analizi olan cDNA-AFLP tekniği kullanılarak, bu bitkide düşük sıcaklıkta depolama uygulamasından farklı etkilenen aday genleri belirlemek istenmiştir. cDNA-AFLP yöntemi AFLP yönteminin modifiye edilmiş bir versiyonudur. AFLP yönteminde, DNA kalıp molekül olarak kullanılırken; cDNA-AFLP yönteminde, cDNA kalıp molekül olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmayla cDNA-AFLP yöntemi sarımsakta transkript analizinde ilk defa uygulanmış olacaktır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, dikim öncesi 4°C ve 20°C'de depolanan sarımsak dişlerinden gelişen bitkilerdeki morfolojik farklılıkların tespiti ve bu bitkilerde farklı ifade olan genlerin cDNA-AFLP yönetimi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **2-KAYNAK ARAŞTIRMASI**

Sarımsak yıllardır sadece vejetatif yolla çoğalan bir bitki türü olarak tanımlanmıştır (Koul ve ark. 1979). Sarımsak ıslahı genelde mevcut klonların adaptasyonu ve bunların klonal seleksiyonla geliştirilmesi ile yapılmıştır. Son yıllarda ise sarımsağın anavatanı olan Orta Asya'da tohum üreten sarımsak genotipleri belirlenmiştir. Bu genotiplerin belirlenmesi ile sarımsakta melezleme ıslahına ve genetik araştırmalara daha çok ağırlık verilmiştir (Etoh ve Simon 2002, Simon ve Jenderek 2003, İpek ve ark. 2005).

### **2.1. Sarımsakta düşük sıcaklık uygulamasının vejetatif gelişim üzerine etkisi**

Kamenetsky ve ark. (2004)' na göre düşük yetiştirme sıcaklıkları, birçok durumda, yaprak uzamasını teşvik etmiştir. 4°C'de, 60 gün depolama yapılan başlarda tipik olarak 70-100 cm arasında yaprak uzaması görülmüştür. Uzun fotoperiyot koşullarının yaprak uzamasını teşvik edici etkisi yoktur; fakat aynı fotoperiyotta, daha sıcak koşullarda (23/15°C; gündüz/gece ) daha kısa yapraklar oluşturmuştur.

Shemesh ve ark. (2008), çeşitlilik gösteren bir sarımsak popülasyonu içindeki olgunlaşmış başları dikim öncesi 4°C veya 20°C'de depolamıştır. Bu başlar depolamadan sonra aynı iklim koşullarında yetiştirilmişlerdir. Filizlenme, dikimden 7-14 gün sonra gerçekleşmiştir ve bir yaprağın oluşması için geçen zamanı 8-9 gün olarak belirlemişlerdir. Depolama uygulamasının filizlenme zamanı, yaprak büyüme oranı ve dikimden sonra ikincil büyümenin ilk gözlemlendiği zaman üzerinde farklı bir etkisinin olmadığını; fakat baş oluşturma ve yanal tomurcukların ikincil filizlenmelerinin depolama sıcaklığı ile yakından ilgili olduğunu tespit etmişlerdir. 4°C'de depolananlarda yaklaşık on beşinci yaprak aşamasından sonra; 20°C'de depolananlarda ise yaklaşık yirmi ikinci yaprak aşamasından sonra baş oluşumunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca büyümekte olan bitkilerin vejetatif aşamadan generatif aşamaya geçişleri dikim öncesi depolama sıcaklıklarından etkilendiğini saptamışlardır. 4°C'de depolanan başların % 60'ında, 20°C'de depolanan başların ise % 7'sinde çiçek sapı oluşumu gözlenmiştir.

## 2.2. Düşük sıcaklık uygulamasının generatif gelişim üzerine etkisi

Japonya'daki Kagoshima gibi sıcak bölgelerde sapa kalkmayan genotipler, asla çiçek sapı oluşturmazlar. Fakat Etoh (1985) kıştan önce 2 ay süresince 10°C'de yaptığı soğuk uygulamasıyla çiçek tomurcuklarını uyarabilmiştir.

Pooler ve Simon (1993) yaptıkları bir çalışmada soğğun şiddetinden çok uyarıcı düşük sıcaklığın sürekliliğinin sapa kalkmayı teşvik ettiğini belirlemiştir. Sapa kalkmayan bir çeşidi ekim ve kasım ayları boyunca sürekli 10°C'de tuttuklarında % 26 oranında çiçeklenmenin başladığını belirlemiştirlerdir. Ortalama sıcaklığın 10°C olduğu (belki kasım- nisan aylarında daha düşük) Wisconsin koşullarında, arazide yetiştirilen bitkilerde bu oran % 11'de kalmıştır.

Kamenetsky ve Rabinowitch (2001) sarımsak genotiplerinin vejetatif ve generatif aşamalarındaki değişimleri elektron mikroskop (SEM) ile incelemişler ve apikal meristemin vejetatif gelişim evresinden generatif gelişim evresine sarımsak klonları 6-7 yaprak aşamasındayken olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu geçiş sırasında diğer *Allium* türlerinin aksine çiçek taslakları farklılaşmadan önce çiçek sapı oluşumu gerçekleşmektedir. Ancak, düşük sıcaklıkta depolamadan sonra tam çiçeklenen gurutaki sarımsak bitkileri yüksek sıcaklıkta (23/15°C, gündüz/gece) yetiştirildiğinde çiçek oluşturmuştur.

Takagi (1990) ile Kamenetsky ve Rabinowitch (2001)'e göre düşük sıcaklıkta depolamak (-2°C'den 9°C'ye) ve ılık sıcaklıklarda yetiştirmek (gün boyunca 17-23°C ve gece boyunca 9-15°C arası) erken sap oluşumunu ve uzamayı teşvik etmektedir.

Kamenetsky ve ark. (2004)'nin yaptığı araştırmaya göre; sarımsak bitkilerinin apikal meristeminin vejetatif aşamadan generatif aşamaya geçme zamanı, yapılan depolama uygulamalarından ve yetiştirme koşullarından önemli ölçüde etkilendiğini görmüşlerdir. Dikim öncesi, 4°C'de yapılan depolamayı takiben, vejetatif aşamadan generatif aşamaya doğru olan ilk meristem değişimi, uzun gün koşullarında yedi-sekiz yaprağın oluşumundan sonra gerçekleşmiştir. Bu değişim, dikimden kırk gün sonra gözle

görülebilmektedir. Kısa gün koşullarında ve 20/ 12°C’de, değişim ilk olarak elli-elli beşinci günlerde on bir- on üç yapraklı bitkilerde gözlenmiştir.

Kamenetsky ve ark. (2004)’na göre, 20°C’de depolama ve daha ılık büyüme sıcaklıklarının veya ağ ile örtülmüş olan açık alandaki çevresel ilkbahar sıcaklıklarının birlikte uygulanmasının etkisi sap uzamasının indüklenmesi için yeterli değildir. Aynı durum, önceden -2, 9, 20°C’de depolanmış, kısa gün koşullarındaki bitkilerde de yakalanmıştır. 2 veya 4°C’de depolanıp kısa gün koşullarında yetiştirilen bitkiler 18-20 cm uzunluğunda saplar oluşturmuştur. Ağ ile örtülmüş olan açık alanda yetiştirilen bitkilerde fitotronda yetiştirilen eş değer bitkilere oranla her zaman daha geç spata açılması görülmüştür. Uzun fotoperiyot ve ılık fitotron koşulları, daha serin çevrelerde yetiştirilen eş değer bitkilere oranla daha kısa saplar ve daha erken spata açılması ile sonuçlanmıştır. Hem -2 hem de 20°C’de yapılan depolama en düşük sap uzama oranı ve en geç spata açılması ile sonuçlanmıştır. En hızlı büyüme oranları soğuk depolama ve serin fitotron koşullarına sahip olan bitkilerde gözlemlenmiştir.

### **2.3. Düşük sıcaklık uygulamasının tohum oluşumu ve çimlenme üzerine etkisi**

Etoh (1983b), çimlenmenin uyarılmasında nemli ve soğuk ortamda muhafazanın, katlamanın ve zedelemenin çok etkili olduğunu ancak fitohormonların daha az etkili olduğunu tespit etmiştir. Üç-altı ay, 5°C’de, nemli ortamda muhafaza edilen tohumlar, 5 °C’de filtre kağıdı üzerinde çimlendirildiğinde, çimlenme oranı %20 olmuştur (Etoh ve ark. 1988, Pooler ve Simon 1994).

Pooler ve Simon (1994), sarımsak tohumlarını 1-12 ay boyunca 3°C’de muhafaza ettikten sonra tohumları in vitro koşullarda doku kültürü ortamında çimlendirmiştir ve % 10 çimlenme oranı elde etmiştir.

### **2.4. Düşük sıcaklık uygulamasının aroma bileşenleri üzerine etkisi**

Hughes ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada sarımsak dişlerini oda sıcaklığında ve 4°C’de, altı ay süre ile depolamış. Dişlerin baş üzerindeki yerlerinin ve düşük sıcaklığın



aroma maddelerinin ve organik sülfür bileşenlerinin kompozisyonundaki değişimini HPLC ile belirlemişlerdir. Alliin, gamma glutamyl allyl cysteine sulphoxide ve gamma glutamyl isoallyl cysteine sulphoxide seviyeleri dış taraftaki dişlerde iç taraftakilere oranla istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır. 4°C’de depolanan sarımsaklardaki en önemli aroma öncül bileşeni olan alliin miktarında istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir.

## 2.5. Sarımsakta yapılan moleküler çalışmalar

İpek ve ark. (2003) kırk sekiz sarımsak klonunda genetik çeşitliliği AFLP, RAPD, izoenzim markırlar kullanarak karakterize etmişler ve her bir markır sistemiyle elde edilen dendrogramları karşılaştırmışlardır. Sarımsak klonlarında oldukça fazla ve polimorfik düzeyde bulunan AFLP markırlarının sarımsak klonlarının detaylı ve doğru olarak karakterize edilmesinde diğer markır sistemlerine göre daha etkili markır tekniği olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar AFLP analizi sonucu kırk sekiz sarımsak klonunu % 60 benzerlik düzeyinde 10 genetik gruba ayırmış ve çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak klonlarının genetik olarak belirgin bir şekilde farklı gruplara düştüklerini belirlemişlerdir.

İpek ve ark.(2008)’nin yaptıkları diğer bir çalışmada; *Allium tuncelianum* ve *Allium sativum* L. morfolojik ve moleküler düzeyde karşılaştırılarak aralarındaki akrabalık belirlenmiştir. Sonuçta, *A. tuncelianum*’un sarımsağa pırasalardan (*A. ampeloprasum*) daha uzak olduğu belirlenmiştir.

## 2.6. cDNA-AFLP tekniği ile ilgili yapılmış çalışmalar

cDNA-AFLP tekniği Bachem ve ark. (1996) tarafından geliştirilmiştir. Bu tekniği kullanarak patatesteki yumru gelişimi dönemindeki transkript profili analiz etmişler ve iki gen belirlemişlerdir. Genlerden birinin patates depo proteini olan ‘patatini’ kodladığı diğer genin ise nişasta biyosentezinde önemli bir enzim olan ADP-glucose pyrophosphorylase olduğu tespit edilmiştir. cDNA-AFLP ile elde edilen gen ifade

profilinin ‘Northern Blot’ analizi ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Titarenko ve ark. (1997), *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, yaralanma stresi sonucu belirledikleri ve JR3 olarak adlandırdıkları bir cDNA klonu izole etmişlerdir. Araştırmacılar, yaralanma stresi, jasmonik asit (JA) ve ABA uygulamaları sonucunda, *Arabidopsis* yaprak dokularında JR3 cDNA klonunun anlatımının arttığını gözlemlemişlerdir.

Barcaccia ve ark. (2001) ise cDNA-AFLP tekniği kullanılarak yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisinin 2n yumurta oluşturan apomayotik mutant genotiplerinde apomayosiste etkili olan aday genleri belirlemişler ve klonlamışlardır.

Shindo ve Sasakuma (2002) farklılık gösterim tekniği ile ekmeklik buğdayda, genotipe özgü olan vernalizasyonla ilişkili gen anlatımını araştırmışlardır. Bitki materyali olarak bir yazlık, bir de kışlık ekmeklik buğday hattı kullanmışlardır. Değişik gelişim dönemlerindeki farklı süreli vernalizasyon uygulamalarından sonra, farklılık gösterim tekniğinden yararlanarak yüz on cDNA parçası izole etmişlerdir. Yedi tane genin vernalizasyonla ilişkili olarak anlatım yaptığını ve bu genlerin genotipe özgü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları istatistiksel analiz sonucunda, çalışılan iki buğday hattında dört genin de başaklanma faktörüyle önemli ölçüde ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Breyne ve ark. (2002) tütün bitkisinde hücre bölünmesinde değişik aşamalarında aktif olan 1340 geni cDNA-AFLP yöntemiyle belirlemişlerdir.

Cnudde ve ark. (2003) cDNA-AFLP yöntemi ile *Petunia hybrida* bitkisinin çiçek gelişiminde ifade olan genleri analiz etmişlerdir. Çiçek organları beş farklı gelişim aşamasında analiz edilmiş ve gen ifade profilleri karşılaştırılmıştır. Bu şekilde anterlerdeki mikrosporogenesis ve yumurtalıktaki makrosporogenesis gelişimleri sırasında ifade olan genleri belirlemişlerdir.

Sayari ve ark. (2005) tarafından, patates bitkisinin yapraklarında NaCl uygulanmış ve NaCl uygulanmamış deney gruplarında tuz stresinin etkisi cDNA- AFLP tekniği kullanılarak araştırılmış ve gen anlatımı farklılıklarının meydana geldiği görölmüştür.

Simoos-Araujo ve ark. (2008), börölce bitkisinin nodüllerinde sıcaklık stresine cevapta yer alan genleri belirlemek amacıyla cDNA-AFLP'den oluşturulmuş problarla bir cDNA kütüphanesini taramışlardır. Araştırma sonucunda bir tanesi küçük sıcak şoku proteini (VuHSP17.7) ile bir diğeri ise Nodulin 26 (VuNIP1) ile ilişkili iki adet tam uzunlukta cDNA izole etmiş ve karakterisasyonlarını yapmışlardır. VuHSP17.7'nin yüksek sıcaklık stresi ile nodülde, yapraklarda, çiçekte ve çiçek tomurcuğunda anlatımının yüksek düzeyde tetiklendiğini ve VUNIP1'in sıcaklık stresinden sonra nodülde baskılandığını tespit etmişlerdir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

Bu araştırma 2009–2010 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bu tez “Sarımsakta (*Allium sativum L.*) Gen İfade Profili (mRNA) Analizi ve Çiçeklenmeyi Kontrol Eden Aday Genlerin Belirlenmesi” adlı TÜBİTAK projesinin bir bölümüdür (Proje no:105O551).

#### **3.1. Materyal**

Bu tez çalışmasında, bitki materyali olarak G1, G2, G3 ve G4 şeklinde adlandırılan ve genetik olarak birbirinden farklı olduğu İpek ve ark. (2003) tarafından belirlenen dört sarımsak genotipi kullanılmıştır. Sarımsak genotipleri, Pulman (Washington, ABD) şehrindeki Batı Bölgesel Bitki Gen Bankası (WRPIS-Western Regional Plant Introduction Station)’ndan sağlanmıştır. G1 ve G2 çok iyi çiçeklenen ve tohum üretebilen, G3 ve G4 ise çiçeklenmeyen genotiplerdir.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi, morfolojik ölçümler ve örnek alınması**

Her bir genotipten, depolamadan hemen önce, büyüme meristemi örneği sarımsak dişleri açılarak alınmıştır. G1, G2, G3 ve G4’ten alınan iki grup sarımsak baş örneğinden ilk grup başlar üç ay süresince, oda sıcaklığında (20°C) depolanırken ikinci grup baş örnekleri aynı sürede düşük sıcaklıkta (4°C) depolanmıştır. Bu şekilde sarımsak üretiminde kullanılan dişlerin düşük sıcaklıkta ve oda sıcaklığında depolanmasının bitki gelişimi ve gen ifadesi üzerine etkileri belirlenebilecektir. 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkiler G1 +4°C, G2 +4°C, G3 +4°C, G4 +4°C olarak 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkiler ise G1 +20°C, G2 +20°C, G3 +20°C, G4 +20°C olarak adlandırılmıştır. Üç ay süre ile depolandıktan sonra, 4°C ve 20°C’de depolanmış genotiplerin her birinden dikim öncesinde dişlerin ortasındaki büyüme meristemi örneği cDNA-AFLP analizi için tekrar alınmıştır. Oda sıcaklığı ve düşük

sıcaklıkta depolanan dört sarımsak genotipinin kalan dişleri elenmiş bahçe toprağı, kaba kum ve torf karışımına (2:1:1); 16x13 cm çapındaki dezenfekte edilmiş saksılara, her saksıda üç bitki olacak şekilde üç tekerrürlü olarak dikilmiştir. Dikimi yapılan saksılar nem, ışık ve sıcaklık kontrollü bitki büyütme kabinine (Sanyo Electric Co Ltd. Japonya MLR-351H) yerleştirilmiştir ve büyütme kabini kısa gün koşullarına (10 saat aydınlık/14 saat karanlık; 19°C gündüz/8°C gece; % 65 nem) ayarlanmıştır. Bitkiler düzenli olarak sulanmış ve gerektiğinde Actagro Seven (7:7:7) (Actagro LLC, Biola, CA, USA) ticari gübresi verilmiştir.



**Şekil 3.1.** Dikimden yirmi üç gün sonra bitki büyütme kabininde G4 genotipinin görünümü

Dikimden altmış gün sonra, bitkilerin generatif döneme geçmelerini teşvik etmek için büyütme kabininde uzun gün programına geçilmiştir. Uzun gün programındaki bitki büyütme kabininin koşulları 16 saat aydınlık/8 saat karanlık; 20°C gündüz/10,5°C gece sıcaklığıdır. Nem ise % 65 oransal nemde sabit tutulmuştur. İklim dolabının sıcaklık değerleri minimum-maksimum termometre ile düzenli olarak kontrol edilmiştir.

Dikimden önce sarımsak dişlerinin düşük sıcaklıkta depolanmasının, dikimden sonra sarımsak bitkisinin gelişimi üzerine etkisini tespit etmek için, dikimden kırk beş gün sonra her bitkinin yaprak sayısı, yalancı gövde boyu ve yalancı gövde çapı değerleri belirlenmiştir. Bu ölçümler yapıldıktan sonra her genotipten yaprak ve büyüme meristemi örnekleri oda sıcaklığı ve düşük sıcaklıkta depolanan dişlerden elde edilen bitkilerden her genotip için ayrı olarak alınmıştır. Bitkilerin büyüme meristemlerinin örneklenmesi, topraktan sökülerek yaprak kınlarının ortasındaki büyüme meristemlerinin çıkarılması şeklinde yapılmıştır. Aynı ölçümler, 4°C'de depolanmış dişlerden elde edilen bitkilerde dikimden yüz on beş gün sonra tekrarlanmıştır. Bu dönemde çiçeklenmeyen genotiplerden (G3 ve G4) meristem ve yaprak örnekleri tekrar alınmıştır. Çiçeklenen genotiplerde (G1 ve G2) ise; büyüme meristemi generatif meristeme farklılaşarak çiçek sapını ve sürgününü oluşturduğu için bu genotiplerden yaprak örneği, çiçek sürgünü ve çiçek sapı örnekleri alınmıştır. Vejetatif gelişme aşamalarında yaprak örneklerinin, yaprak kınlarının ortasındaki büyüme meristeminin, çiçek saplarının ve çiçek sürgünlerinin örnekleri cDNA-AFLP analizleri için alınmıştır (Çizelge 3.1). Alınan tüm örnekler -80°C'de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** cDNA-AFLP analizleri için sarımsak genotiplerinin dört farklı gelişme dönemlerinde yapılan örnekleme zamanları ve tipleri

Örnekleme No	Örnekleme Zamanı	Genotiplerin Gelişme Aşaması ve Örnek Tipi
1-	Depolama öncesi (24.08.2009)	Depolamadan önce sarımsak genotiplerinin dişlerinin ortasındaki büyüme meristemi örneği alınmıştır.
2-	Depolama sonrası (23.11.2009)	Depolama sonunda, dikimden hemen önce oda sıcaklığında ve düşük sıcaklıkta depolanan genotiplerin dişlerinden büyüme meristemi alınmıştır.
3-	Dikimden 45 gün sonra (08.01.2010-18.01.2010)	Bitkiler üç-dört yaprak aşamasındayken yaprak ve büyüme meristemi örneği alınmıştır.
4-	Dikimden 115 gün sonra (19.03.2010-26.03.2010)	Bitkiler yedi-dokuz yaprak aşamasındayken çiçeklenen klonlardan varsa çiçek sapı, çiçek sürgünü örneği ve tüm klonlardan yaprak örneği alınmıştır. Çiçeklenmeyen klonlardan ise çiçek sürgünü olmadığından meristem örneği bu dönemde de alınmıştır.

### 3.2.2. Toplam RNA izolasyonu

RNA izolasyonu düşük sıcaklıkta ve oda sıcaklığında depolanan sarımsak dişlerinin yetiştirilmesi esnasında, farklı gelişme dönemlerinde, farklı ifade olan genlerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Farklı gelişme dönemlerinde alınan yaprak, mersitem, çiçek sapı, çiçek sürgünü örnekleri toplam RNA izolasyonu yapılmaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmışlardır. cDNA-AFLP yönteminde kalıp molekül olarak kullanılacak olan cDNA eldesi için toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA moleküllerinin ribonükleaz (RNaz) enzimi tarafından parçalanmasını engellemek için denemede kullanılan bütün plastik ve cam malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) (Sigma) ile muamele edilmiştir.

RNA izolasyonu, Trizol (Invitrogen, Carlsbad, ABD) kullanılarak üretici firmanın tanımladığı yönteme göre yapılmıştır. RNA izolasyonu için her bitki örneğinden 100 mg bitki dokusu kullanılmıştır. Toplam RNA izolasyonunda izlenen yöntem aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan 150-200 mg bitki dokusu, havan ve havan tokmağı kullanılarak 1250 ml TRIZOL içerisinde öğütülmüş ardından RNaz ve DNaz'dan arı steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. 5 dk süre ile oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 600  $\mu\text{l}$  kloroform eklenerek karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında tekrar 5 dk tutulmuştur.
3. Bu süre sonunda tüpler 15 dk süre ile  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 12 000 g' de santrifüj edilmişlerdir.
4. Santrifüj sonunda en üstteki renksiz faz yeni 2 ml' lik RNaz ve DNaz'dan arı steril mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
5. RNA'ların çökeltilmesi için üzerlerine 1 ml izopropanol eklenmiş ve 1-2 kez karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletilmişlerdir.
6. Çökelen RNA örnekleri 10 dk, 12 000 g'de,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilmiştir ve üstteki sıvı kısım dökülmüştür.

7. Çökelti üzerine 1 ml % 75' lik etanol eklenerek yıkama yapılmıştır ve vortex kullanılarak karıştırılmıştır.
8. Örnekler 7500 g ile 4°C' de 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
9. Sıvı kısım döküldükten sonra oda sıcaklığında kurumaları sağlanan pelletler 500 µl RNaz içermeyen saf su içerisinde çözülmüşlerdir.
10. Çözelti içerisindeki RNA konsantrasyonu florometre (Qubit, İnvitrogen, USA) ile belirlenmiştir.

### 3.2.3. mRNA izolasyonu

mRNA izolasyonu 500 µl toplam RNA örneğinden PolyA Tract mRNA Isolation System (Promega, Madison, WI, ABD) kiti kullanılarak üretici firmanın tanımladığı aşağıda verilen yöntemle yapılmıştır.

1. 500 µl toplam RNA, 2 ml mikrosentrifüj tüpüne konulduktan sonra 56°C' de 10 dk tutulmuştur.
2. RNA içerisine 3µl Biotinylated -Oligo (dT) probu ve 13 µl 20XSSC eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk soğumaya bırakılmıştır.
3. İçerisinde 100µl SA -SMP bulunan 1,5 ml tüplere aktarılmış ve 2 dk'da bir karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında tutulmuştur.
4. SA-SMP mıknatısla tutulduktan sonra sıvı kısım pipet yardımıyla boşaltılmış ve 300 µl 0.1X SSC ile dört defa yıkanmıştır.
5. Dördüncü yıkamanın ardından mıknatısla tutulan SA-SMP mRNA komplekslerinin üzerine 100µl RNaz içermeyen saf su eklenmiştir. Bu işlemle mRNA' lar SA-SMP ayrılıp su içerisinde çözülmesi sağlanmıştır.
6. SA-SMP'ler mıknatısla tutulmuş ve mRNA içeren 100µl su yeni tüplere aktarılmış ve mRNA' lar cDNA sentezi için hazır olmuşlardır.

Elde edilen mRNA örneklerinin konsantrasyonları florometre ile belirlenmiştir.



### 3.2.4. cDNA sentezi

cDNA-AFLP yönteminde kalıp molekül olarak kullanılan cDNA'lar izole edilen mRNA'lar kullanılarak sentezlenmiştir. RNA'dan sentezlenen her bir DNA iplikçığı, kalıp olarak kullanılan mRNA'nın karşı iplikçığı özelliğinde olması nedeniyle bu DNA'lara tamamlayıcı DNA (complementer DNA) anlamına gelen cDNA denilmektedir. cDNA sentezi için RevertAid™ H minus First Strand cDNA Synthesis Kiti (Fermentas) kullanılmış ve üretici firmanın tanımladığı aşağıda verilen yönteme göre yapılmıştır:

1. Aşağıda verilen reaksiyon karışımı, cDNA sentezlemek için, buz üzerinde hazırlanmıştır. Ardından pipetle karıştırılmış ve reaksiyonları toplamak için 3-5 saniye santrifüj edilmişlerdir.

poly(A) + RNA	10 µl
oligo(dT)18 primer (0,5µg/µl)	1µl

2. Reaksiyonlar 70°C de 5 dk bekletildikten sonra buz üzerinde soğutulmuştur. Damlları toplamak için 3-5 saniye santrifüj edildikten sonra tekrar buz üzerine konulmuştur.
3. Yukarıda hazırlanan karışım üzerine aşağıda verilen reaksiyon bileşenleri eklenip karıştırıldıktan sonra 3-5 saniye santrifüj ile tekrar toplanmıştır.

5x reaksiyon tamponu	4µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20u/µl)	1µl
10mM dNTP karışımı	2µl

4. Reaksiyonlar 37°C'de 5 dk tutulduktan sonra üzerlerine 40µM -MuLV revers transkriptaz (20u/µl) enzimi eklenmiştir.
5. Reaksiyonlar sırasıyla 70°C'de 10 dk daha tutularak durdurulmuştur.

cDNA birinci ipliğinin sentezinin ardından, birinci ipliğin tamamlayıcısı olan ikinci ipliğin sentezi RNase H (Fermentas) ve DNA Polymerase I (Fermentas) enzimleri kullanılarak üretici firmanın tanımladığı aşağıda verilen yönteme göre yapılmıştır:

10× DNA Polymerase I reaksiyon tamponu	8 µl
Su	68,8 µl
RNase H (E.coli)	0,2 µl (1 u)
DNA Polymerase I (E.coli)	3 µl (30 u)

1. Hazırlanan reaksiyon karışımı yavaşça pipetle karıştırıldıktan sonra 15°C’de 2 saat tutulmuştur.
2. Reaksiyonlar 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklenerek durdurulmuştur.

Bu şekilde cDNA-AFLP analizleri için çift sarmallı cDNA’lar elde edilmiştir. cDNA’ların konsantrasyonları florometre ile belirlenmiştir.

### 3.2.5. cDNA-AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizleri

cDNA-AFLP analizleri Bachem ve ark. (1996) ve Breyne ve ark. (2002) göre yapılmıştır. cDNA-AFLP protokolü AFLP protokolünde olduğu gibi farklı aşamalardan oluşmaktadır. Vos ve ark. (1995) tarafından geliştirilmiş olan AFLP analizi **enzim kesimi, adaptör bağlanması, ön çoğaltım ve seçici çoğaltım aşamaları** dikkate alınarak dört basamakta gerçekleştirilmiştir. Ancak cDNA-AFLP yönteminde kalıp DNA olarak genomik DNA değil cDNA kullanılmıştır.

#### 3.2.5.1. cDNA’ların restriksiyon enzimleri (MseI ve XapI) ile kesilmesi

Çift iplikli cDNA, XapI ve MseI (New England Biolabs, Ipswich, ABD) restriksiyon endonükleazları ile üretici firmanın aşağıda verilen yöntemine göre kesilmiştir. DNA üzerinde; MseI enzimi dört bazda bir, XapI enzimi ise altı bazda bir kesim yapmaktadır.

5X Reaksiyon tampon çözeltisi	5 µl
XapI enzimi (10 u/ µl)	0,25 µl
MseI enzimi (10 u/ µl)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	7,50 µl
<u>cDNA (200-250 ng)</u>	<u>12 µl</u>
Toplam	25 µl

Reaksiyonlar, cDNA'ların kesilmesi için 37°C'de 3 saat süre ile bekletilmişlerdir. Daha sonra 70°C'de 15 dk tutularak restriksiyon enzimleri inaktif edilmiştir.

### 3.2.5.2. Adaptörlerin bağlanması

Restriksiyon endonükleazları ile kesilmiş olan çift iplikli cDNA molekülüne adaptörlerin bağlanması ligasyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Adaptörler ikili sarmal olarak hazırlanan ve DNA dizilimleri bilinen yapay oligonükleotidler olup *XapI* ve *MseI* enzimlerin kesim sekanslarını içermektedir. Kesilen DNA parçacıklarına adaptörler 20°C de 3 saat sürede tutularak bağlanmışlardır.

Adaptörleri bağlanması için kullanılan reaksiyonun bileşenleri aşağıdaki gibidir:

Adaptör bağlama solüsyonu (0.5 µM <i>XapI</i> ve 5 µM <i>MseI</i> adaptör)	24 µl
T4 DNA ligase (10 u/ µl)	1 µl
Kesilmiş cDNA parçaları	25 µl
Toplam	50 µl

### 3.2.5.3. Ön seçici çoğaltması

Ligasyon reaksiyonunun ardından, ön seçici çoğaltım (pre-amplification) işlemi PCR ile gerçekleştirilmiştir. Ön seçici çoğaltım reaksiyonunda kullanılan PCR reaksiyonun bileşenleri aşağıdaki gibidir.

Kesilmiş ve adaptör eklenmiş cDNA (10 kez seyreltilmiş)	10 µl
10X PCR tamponu	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5 µl
dNTPs (2mM)2 µl	
P1 primer (10pmoles/µl)	1 µl
P2 primer (10pmoles/µl)	1 µl
<u>Taq DNA polymerase (5U/µl)</u>	<u>0,5 µl</u>
H <sub>2</sub> O	22,5 µl

Ön çoğaltım için PCR aşağıdaki sıcaklık ve süreler takip edilerek gerçekleştirilir:

- |   |      |       |
|---|------|-------|
| 1-                                      | 94°C | 4 dk  |
| 2-                                      | 94°C | 30 sn |
| 3-                                      | 52°C | 30 sn |
| 4-                                      | 72°C | 1 dk  |
| 2 ile 4 arası basamaklar arası 20 döngü |      |       |
| 5-                                      | 72°C | 7 dk  |
| 6-                                      | 4°C  | ∞     |

#### 3.2.5.4. Seçici çoğaltma

Ön seçici çoğaltmada elde edilen PCR ürünleri 1/50 oranında TE (Tris-EDTA) tamponu içerisinde seyreltikten sonra tekrar PCR cihazında seçici çoğaltma işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu aşamada XapI primerlerine 2 seçici nükleotid (*XapI*+2) ve MseI primerlerine ise 2 ya da 3 seçici nükleotid (*MseI*+2 veya *MseI*+3) eklenmiştir. Seçici çoğaltmada kullanılan primerlerin kombinasyonları, PCR reaksiyonunun bileşenleri ve PCR döngü protokolleri aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Seçici çoğaltmada kullanılan primer kombinasyonları

No	Primer Kombinasyonları	No	Primer Kombinasyonları
1-	XabICC- MseICAT	11-	XabITT- MseICCT
2-	XabICC- MseICTG	12-	XabITC- MseIGT
3-	XabICT- MseICCT	13-	XabICC- MseIGT
4-	XabICT- MseICTA	14-	XabICC- MseICGT
5-	XabICG- MseICAT	15-	XabITC- MseIAGC
6-	XabICG- MseICTA	16-	XabITA- MseIAGC
7-	XabICT- MseIGT	17-	XabICA- MseIAGC
8-	XabICT- MseIGC	18-	XabICG- MseIGA
9-	XabITT- MseICAC	19-	XabITG- MseICG
10-	XabITT- MseICTG	20-	XabITG- MseIGA

Seçici çoğaltmada kullanılan PCR reaksiyonunun bileşenleri:

DNA	1µl
10X PCR tamponu	1µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1µl
dNTPs (2mM)	1µl
Xap-sel primeri (7pmoles/µl)	1µl
Mse-sel primeri (7pmoles/µl)	1µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,5µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>3,5µl</u>
<b>Toplam</b>	<b>10µl</b>

Seçici çoğaltmada kullanılan PCR reaksiyonun sıcaklık döngüsü:

1-	94°C	5 dk
2-	94°C	30 sn
3-	65°C	30 sn
4-	72°C	1 dk

2 ile 4 arası basamakları 10 kere tekrarlar ve 3. basamakta her döngüde sıcaklığı 0,7°C azalt

5-	94°C	30 sn
6-	56°C	30 sn
7-	72°C	1 dk

5 ile 7 arası basamakları 24 kere tekrarlar

8-	72°C	7 dk
9-	4°C	∞

Seçici olarak çoğaltılan reaksiyonlar, eşit miktarda yükleme tamponu (10 ml Formamid, 10 mg bromfenol mavisi, 200 µl 0,5 M EDTA) ile karıştırılmıştır. Reaksiyonlar 90°C'de 3 dk tutularak DNA parçacıkları denature edilmiş ve hemen buz üzerinde soğutulmuşlardır. Denature edilen ve soğutulan reaksiyonlardan 5 µl alıp, 30 dk ön ısıtma yapılan % 6'lık poliakrilamid jel elektroforezinde 60 W güçle 2 saat 30 dakika süre ile ayrıştırılmıştır. Büyüklüğüne göre ayrıştırılan cDNA'lara ait bantların görüntülenmesi için gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyama işlemi Silver Sequence DNA Sequencing System protokolüne (Promega, ABD) göre yapılmış ve fotoğraflanmıştır.

### 3.2.6. Farklılık gösteren bantların belirlenmesi

cDNA bantlarının gümüş boyama yöntemi ile görüntülenmesinin ardından, sarımsak genotiplerine ait 4°C ve 20°C'de depolanan örnekler arasında farklı ifade olan bantlar poliakrilamid jel üzerinde belirlenmiştir. Daha sonra gen ifade farklılığı sonucu olduğu öngörülen bantlar numaralandırılarak işaretlenmiştir.

### 3.2.7. cDNA-AFLP bantının nükleotid dizi analizi (sekanslama)

cDNA-AFLP bantının dizi analizi cDNA-AFLP analizleri gibi birçok aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar aşağıda belirtilmiştir. Bunlarda;

1. cDNA-AFLP bantının poliakrilamid jelden kesilmesi ve izole edilmesi,
2. Poliakrilamid jelden izole edilmiş cDNA-AFLP bantının agaroz jelden izole edilmesi,
3. Dizi analizi için PCR aşaması ve
4. PCR ürününün saflaştırılması ve DNA dizi analizidir.

### **3.2.7.1. cDNA-AFLP bantının poliakrilamid jelden kesilmesi ve izole edilmesi**

Polimorfik bantlardan biri, dizi analizleri için poliakrilamid jelden keskin bir bisturi yardımıyla kesilmiştir. Kesme işlemi beyaz ışık veren negateskop cihazı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kesilen bant, içinde 75 µl TE (Tris-EDTA) çözeltisi bulunan 1,5 ml tüp içinde bir gece buzdolabında 4°C'de bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra, kesilen cDNA-AFLP bantı pipet ucu ile iyice parçalanmıştır. Daha sonra bu tüp mikrosantrifüj cihazında 1 dk kadar döndürülerek jel parçalarının ve diğer kimyasalların tüp dibinde çökmesi ve DNA'nın ise çözelti içinde kalması sağlanmıştır. Elde edilen örnek daha sonraki aşamalar için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.7.2. Poliakrilamid jelden izole edilmiş cDNA-AFLP bantının agaroz jelden izole edilmesi**

Poliakrilamid jelinden izole edilen cDNA-AFLP bantı PCR ile çoğaltılmış ve tekrar agaroz jelden izole edilmiştir. Bu şekilde cDNA-AFLP bantı dizi analizleri için saflaştırılmıştır. cDNA-AFLP bantının çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu ve PCR döngüsü aşağıdaki gibidir.

PCR reaksiyonunun bileşenleri:

Akrilamid Jelden İzole Edilen DNA	2 µl
10X PCR tamponu	2 µl
dNTPs (2,5mM)	2 µl
XapI-sel primeri (5 µM/µl) önseçici çoğaltma	0,8 µl
MseI-sel primeri (5 µM/µl) önseçici çoğaltma	0,8 µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,16 µl
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>12,24 µl</u>
Toplam	20µl

Sıcaklık döngüsü:

- |    |  |       |
|----|--|-------|
| 1- | 94°C                                       | 2 dk  |
| 2- | 94°C                                       | 45 sn |
| 3- | 56°C                                       | 1 dk  |
| 4- | 72°C                                       | 1 dk  |
|    | 2 ile 4 arası basamakları 28 kere tekrarla |       |
| 5- | 72°C                                       | 5 dk  |
| 6- | 4°C  | ∞     |

PCR cihazında çoğaltılan bant, % 2 konsantrasyonundaki agaroz jelde ayrıştırılmıştır. Bant, agaroz jelden keskin bir bisturi ile kesilmiştir. Kesilen bantın agaroz jelden izolasyonunda “EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction kiti (BioBasic, Kanada)” kullanılmıştır.

### 3.2.7.3. Dizi analizi için PCR aşaması

Dizi analizi için PCR aşaması ve diğer aşamalar Amerika Birleşik Devletleri-Wisconsin Üniversitesi'ndeki Prof. Dr. P. W. Simon'un laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi için PCR reaksiyonları bir bant için iki taraflı olarak (geri ve ileri primerleri için ayrı reaksiyonlar) yapılmıştır. Bu şekilde bir bant için iki defa dizi analizi yapılmıştır.

Dizi analizi için yapılan PCR bileşenleri ve döngüsü aşağıda verilmiştir.

PCR bileşenleri:

Agoroz jelden izole edilen DNA	1 µl
2,5 X PCR tamponu	0,75 µl
XapI veya MseI primeri (5 µM/µl)	1 µl
Big Dye karışımı	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	1,75 µl
<b>Toplam</b>	<b>5 µl</b>

PCR döngüsü:

- |    |  |            |
|----|--|------------|
| 1- | 95°C                                       | 15 sn      |
| 2- | 50°C                                       | 15 sn      |
| 3- | 60°C                                       | 2 dk 30 sn |
|    | 1 ile 3 arası basamakları 25 kere tekrarla |            |
| 4- | 4°C  | ∞          |

#### **3.2.7.4. PCR ürününün saflaştırılması ve DNA dizi analizi**

Dizi analizi için elde edilen PCR ürününün saflaştırılması “Agencourt CleanSEQ kiti (Beckman Coulter, CA, ABD)” kullanılarak yapılmıştır. Sekans analizleri Wisconsin Üniversitesi, Madison, WI, ABD’de bulunan sekanslama makinalarında yapılmıştır. Elde edilen bulgular Gen Bankası’ndaki DNA dizilimi veri tabanı ile karşılaştırılmıştır.

#### **3.2.8. Morfolojik ölçümlerin istatistiksel analizleri**

Deneme, ‘Tesadüf Parselleri’ deneme desenine göre 3 tekrarlamalı olarak yürütülmüştür. Uygulamalar arasındaki farklılık ‘Duncan’ testi ile 0,05 önem seviyesinde ortaya konulmuştur.



## 4- BULGULAR

### 4.1. Morfolojik Gözlemler

İki adet çiçeklenen (G1, G2) ve iki adet çiçeklenmeyen (G3, G4) dört farklı sarımsak genotipi dikim öncesi depolama sıcaklıklarının bitki gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 4°C’de ve 20°C’de depolanan G1 , G2 , G3 ve G4 sarımsak genotiplerinin dişlerinden gelişen bitkiler arasındaki morfolojik farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu bitkilere ait yaprak sayısı, yalancı gövde uzunluğu ve yalancı gövde çapı dikimden kırk beş gün (6 Ocak 2010) ve dikimden doksan gün (22 Şubat 2010) sonra ölçülmüştür.

Yapılan morfolojik gözlemlere göre, sarımsak dişleri saksılara dikildikten sonra, 4°C’de depolanan sarımsak dişlerinin 20°C’de depolanan sarımsak dişlerine göre daha önce sürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Özellikle çiçeklenmeyen G3 genotipinde, 20°C’de depolanan dişler 4°C’de depolananlardan yirmi altı gün sonra sürdüğü görülmüştür.

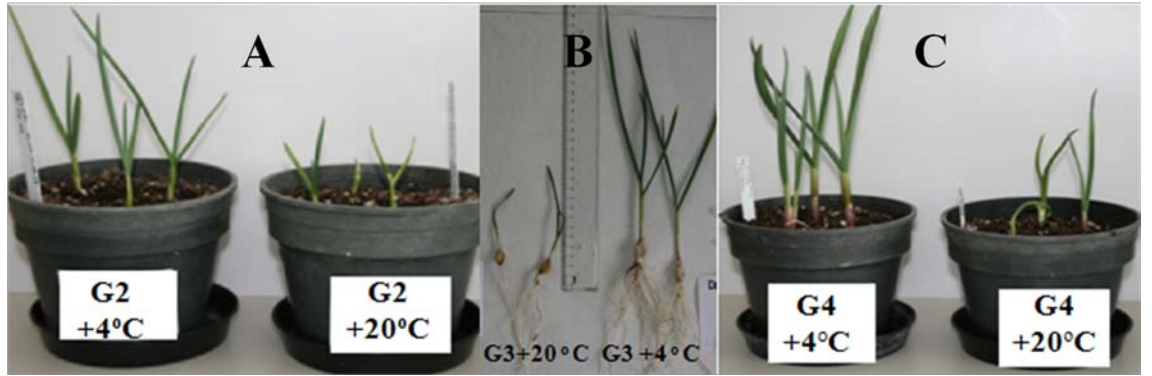
**Çizelge 4.1.** Dikim tarihinden itibaren sarımsak dişlerinin sürme tarihleri

Genotipler	Bitkilerin dikim zamanı	Bitkilerin sürme zamanı	
		4°C	20°C
<b>G1</b>	23.11.2009	30.11.2009	07.12.2009
<b>G2</b>	23.11.2009	02.12.2009	06.12.2009
<b>G3</b>	23.11.2009	06.12.2009	01.01.2010
<b>G4</b>	23.11.2009	30.11.2009	05.12.2009



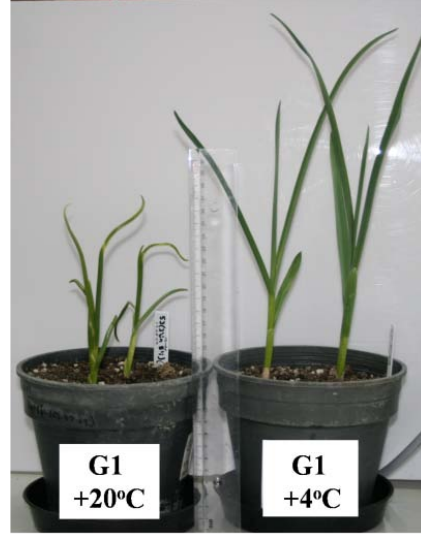
**Şekil 4.1.** Dikimden yirmi üç gün sonra G3 genotipi için; 20°C'de depolanan dişler henüz sürmemişken, 4°C depolanan dişlerden elde edilen bitki iki yaprak aşamasına gelmiştir

Yine dikimden yirmi üç gün sonra yapılan gözlemlere göre, 4°C'de depolanan sarımsak genotiplerinin dişlerinden gelişen bitkiler, 20°C'dekilere göre çok daha hızlı ve sağlıklı bir gelişim göstermiştir ( Şekil 4.2).

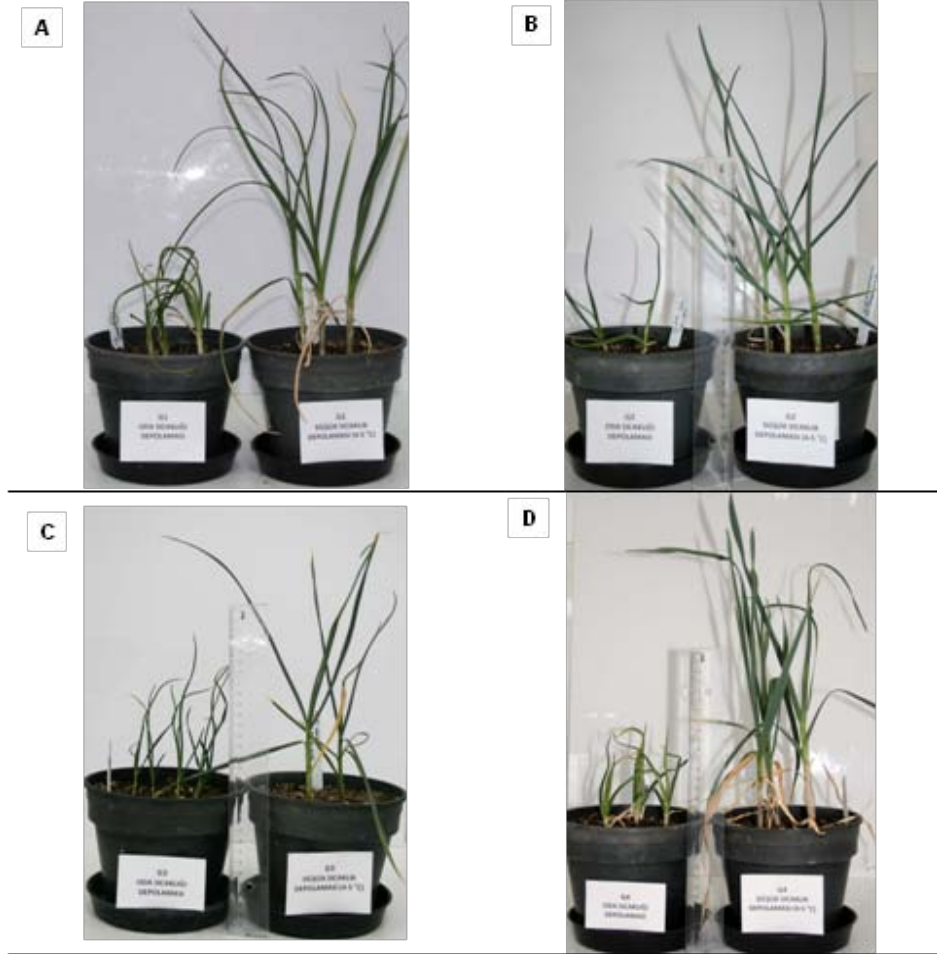


**Şekil 4.2.** G2 (A), G3 (B) ve G4 (C) genotiplerinde her iki uygulama için görülen gelişimsel farklılıklar

Dikimden yirmi yedi gün sonra yapılan gözlemlerde 20°C'de depolanan sarımsak genotiplerinin dişlerinden gelişen bitkilerde büyümenin ilk aşamalarında virüs semptomuna benzeyen, düzgün olmayan yaprak gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.3) ve bu görünüm ilerleyen safhalarda daha da belirgin hale gelmiştir (Şekil 4.4).

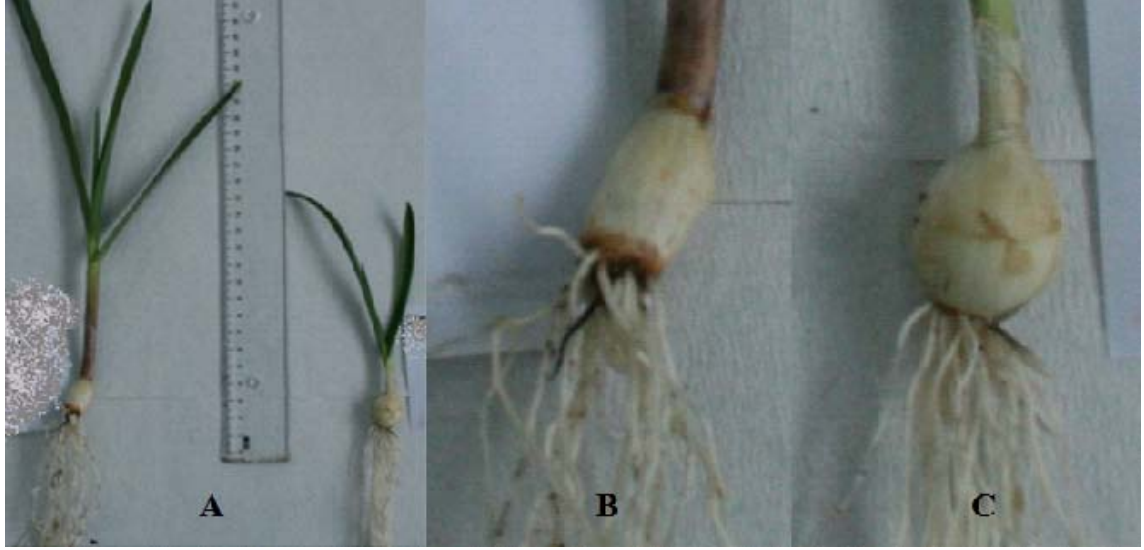


Şekil 4.3. G1 genotipinin 4°C ve 20°C'de depolanan dişlerinden gelişen bitkiler



Şekil 4.4. G1 (A), G2 (B), G3 (C) ve G4 (D) genotipleri için 4°C ve 20°C depolanan dişlerden elde edilen bitkiler arasında gelişme yönünden farklılıklar

Dikimden kırk beş gün sonra, genotipe ve depolama uygulamasına göre değişmekle birlikte, bitkiler ortalama üç dört yaprak aşamasına gelmiştir. Bu dönemde, yaprak ve meristem örneği almak için sökülen bitkilerde üç yaprak aşamasından sonra dışteki besin maddelerinin tamamen tüketildiği görülmüştür (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** A) G4 genotipi, sökülen düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı uygulanmış bitkiler B) Düşük sıcaklık uygulaması C) Oda sıcaklığı uygulaması

Dikimden yüz on beş gün sonra, çiçeklenen bir genotip olan G1 ile çiçeklenmeyen bir genotip olan G4'ten sökülen bitkilerde, 4°C'de ve 20°C'de depolanan sarımsak genotiplerinin dışlerinden gelişen bitkiler arasındaki karşılaştırma ve sayısal veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ayrıca dikimden yüz yirmi gün sonra, çiçeklenen bir genotip olan G2 ile çiçeklenmeyen bir genotip olan G3'ten sökülen bitkilerde, 4°C'de ve 20°C'de depolanan sarımsak genotiplerinin dışlerinden gelişen bitkiler arasındaki karşılaştırma ve sayısal veriler aynı çizelgede yer almaktadır.

**Çizelge 4.2.** Dikimden yüz on beş ve yüz yirmi gün sonra G1, G2, G3 ve G4'te her iki sıcaklık uygulaması için bitkiler arasındaki karşılaştırma

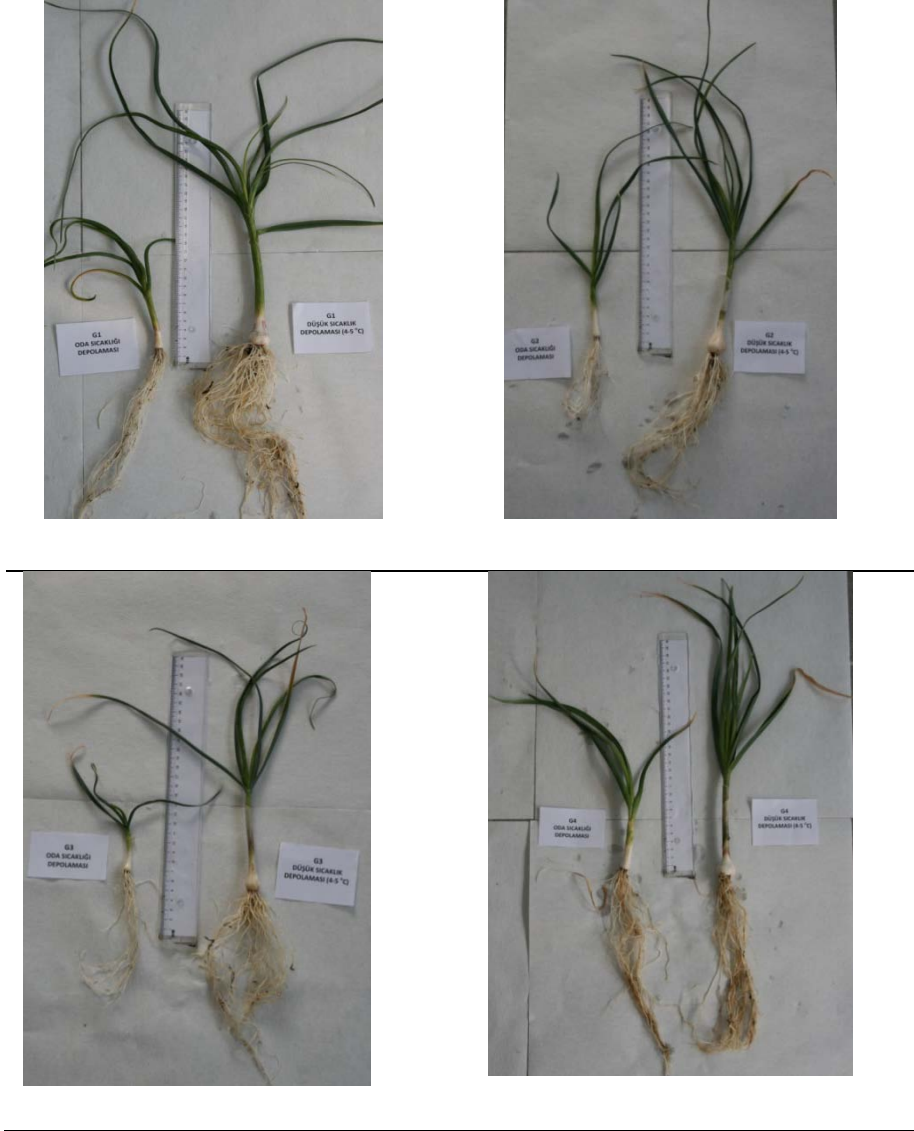
	Dikimden 115 gün sonra				Dikimden 120 gün sonra			
	G1 +4°C	G1 +20°C	G4 +4°C	G4 +20°C	G2 +4°C	G2 +20°C	G3 +4°C	G3 +20°C
<b>Yaprak aşaması</b>	8	6	8	5	10	6	10	5
<b>Baş çapı (cm)</b>	2,1	0,85	2,1	1,2	1,9	0,8	1,5	0,7
<b>Bitki boyu (cm)</b>	16,5	7,5	13	8	16	7,5	11	4,5
<b>Çiçek sapı boyu (cm)</b>	1,5	Yok	-	-	1,5	Yok	-	-
<b>Çiçek sürgünü çapı (mm)</b>	3	Yok	-	-	2	Yok	-	-
<b>Çiçek sürgünü boyu (cm)</b>	1,2	Yok	-	-	2,5	Yok	-	-
<b>Diş oluşumu</b>	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok

Çizelge 4.2' deki bulgulara göre dikimden yüz on beş gün sonra G1 genotipi için, 4°C'de depolanan dişlerden elde edilen sarımsak bitkilerinde çiçek sapı ve çiçek sürgününün büyüme başladığı gözlenirken 20°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde henüz başlamadığı saptanmıştır. Ayrıca düşük sıcaklıkta depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde dişlerin oluştuğu ve dolayısıyla baş oluşumunun başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6). 20°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde böyle bir durum gözlenmemiştir. Dikimden yüz yirmi gün sonra, yapılan gözlemlere göre de G1 genotipine benzer şekilde G2 genotipinin 4°C'de depolanan dişlerinden gelişen bitkilerinde hem çiçek sapı gelişimi hem de başta diş gelişiminin başladığı, 20°C'de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde ise henüz bu özelliklerin gelişmeye başlamadığı gözlemlenmiştir. G3 ve G4 çiçeklenme özelliği olmayan klonlar olduğu için bu genotiplerin her iki depo sıcaklığı uygulamasında da çiçeklenme görülmemiş ancak bu genotiplerde diş oluşumunun sadece 4°C'de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde başladığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.6.** A) G1 genotipinde her iki sıcaklık uygulaması için baş oluşumunu karşılaştırma B) +20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitki C) +4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkide baş oluşumu

4°C depolanan dişlerden gelişen bitkiler ile 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler arasında kök gelişimi bakımından da farklılık söz konusudur (Şekil 4.7). 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde kök gelişiminin çok daha iyi olduğu görülmüştür.



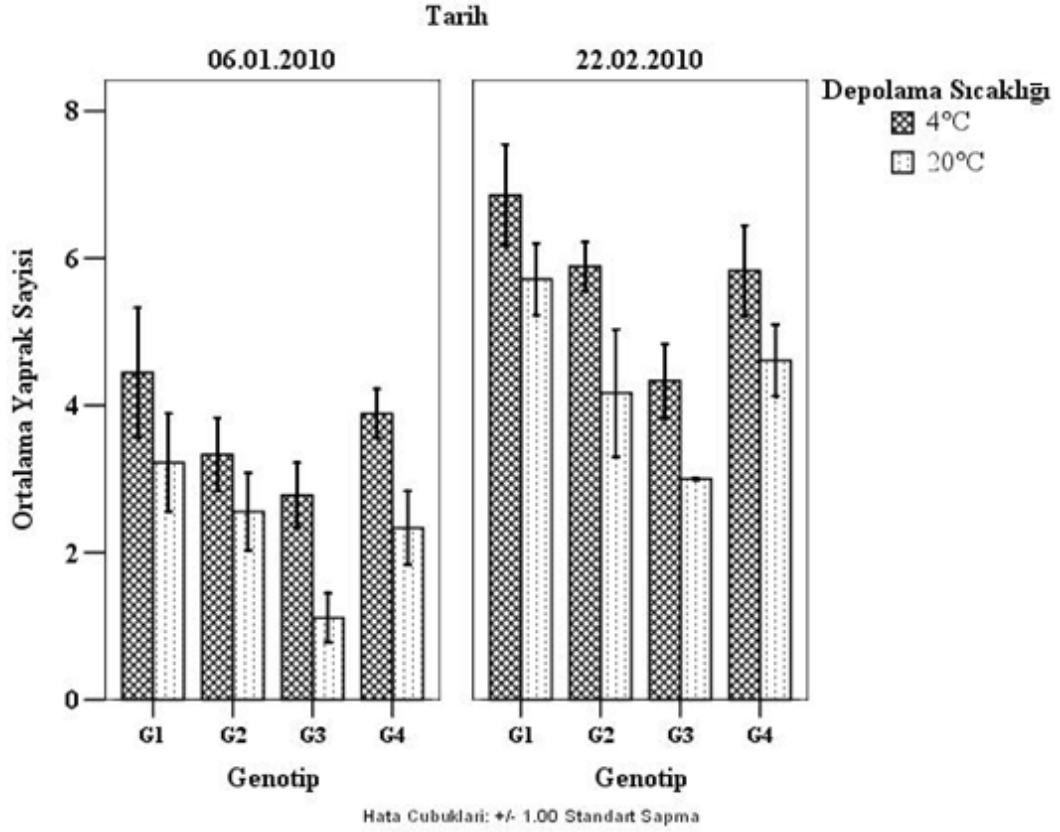
**Şekil 4.7.** G1 (A), G2 (B), G3 (C) ve G4 (D) için 4°C ve 20°C depolanan dişlerden elde edilen bitkiler arasında kök gelişimi yönünden farklılıklar

#### 4.1.1. Yaprak sayısı

Bütün genotiplerde; 4°C’de üç ay süre ile depolanan dişlerden gelişen bitkilerin ortalama yaprak sayısı, 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerin ortalama yaprak sayısından daha fazla olduğu saptanmıştır. Genotipler arasındaki farklılık ‘Duncan’ testi ile 0,05 önem seviyesinde SPSS 17.0 bilgisayar programı kullanılarak ortaya konulmuştur. Duncan testine göre yapılan analizlerde, dikimden kırk beş gün (6 Ocak 2010) ve dikimden doksan gün (22 Şubat 2010) sonra yapılan yaprak sayımında, 4°C’de



ve 20°C'de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde yaprak sayısı bakımından genotipler arasında istatistiki olarak fark görülmüştür (Şekil 4.8, Çizelge 4.3).



**Şekil 4.8.** Dikim öncesi depolama sıcaklığına bağlı olarak, dikimden kırk beş gün (06.01.2010) ve dikimden doksan gün sonra (22.02.2010) sarımsak genotiplerinin ürettiği yaprak sayılarının karşılaştırılması

**Çizelge 4.3.** Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonra 4°C'de ve 20°C'de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde yaprak sayımındaki farklılıklar

Genotip	Dikimden kırk beş gün sonra		Dikimden doksan gün sonra	
	4°C	20°C	4°C	20°C
G1	4,44 <sup>d</sup>	3,22 <sup>c</sup>	7,11 <sup>c</sup>	5,78 <sup>d</sup>
G2	3,33 <sup>b</sup>	2,33 <sup>b</sup>	5,89 <sup>b</sup>	4,61 <sup>c</sup>
G3	2,78 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	4,33 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>
G4	3,89 <sup>c</sup>	2,56 <sup>b</sup>	5,83 <sup>b</sup>	4,17 <sup>b</sup>



Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonraki ölçümlerde, 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerden en az bir adet fazla yaprak ürettiği gözlemlenmiştir. Örneğin G4 genotipi için; dikimden kırk beş gün sonra yapılan ölçümde 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde ortalama yaprak sayısı 3,89 olurken aynı genotipin 20°C’de depolanan dişlerinden gelişen bitkilerinde yaprak sayısı 2,56’da kalmıştır. Dikimden doksan gün sonraki ölçümlerde ise 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde ortalama yaprak sayısı 5,83 ve 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde ise ortalama yaprak sayısı 4,17 olmuştur (bkz. Çizelge 4.3).

Hem dikimden kırk beş gün hem de dikimden doksan gün sonra yapılan yaprak sayımında, 4°C ve 20°C depolama uygulamalarının her ikisinde de en fazla ortalama yaprak sayısı G1 genotipinde en az ortalama yaprak sayısı ise G3 genotipinde olduğu görülmüştür. Dikimden kırk beş gün sonra yapılan ölçümde G1 genotipi için 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yaprak sayısı 4,44 iken 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde 3,22’de kalmıştır. Aynı şekilde dikimden doksan gün sonra, G1’de düşük sıcaklıkta depolanan dişlerden elde edilen bitkiler için ortalama yaprak sayısı 7,11 iken oda sıcaklığında depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yaprak sayısı 5,78’de kalmıştır. G3 genotipinde ise; dikimden kırk beş gün sonra yapılan ölçümde düşük sıcaklıkta depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yaprak sayısı 2,78 iken oda sıcaklığında depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde 1,11’de kalmıştır. Dikimden doksan gün sonra, G3 genotipinde 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkiler için ortalama yaprak sayısı 4,33 iken 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde 3,00’da kalmıştır.

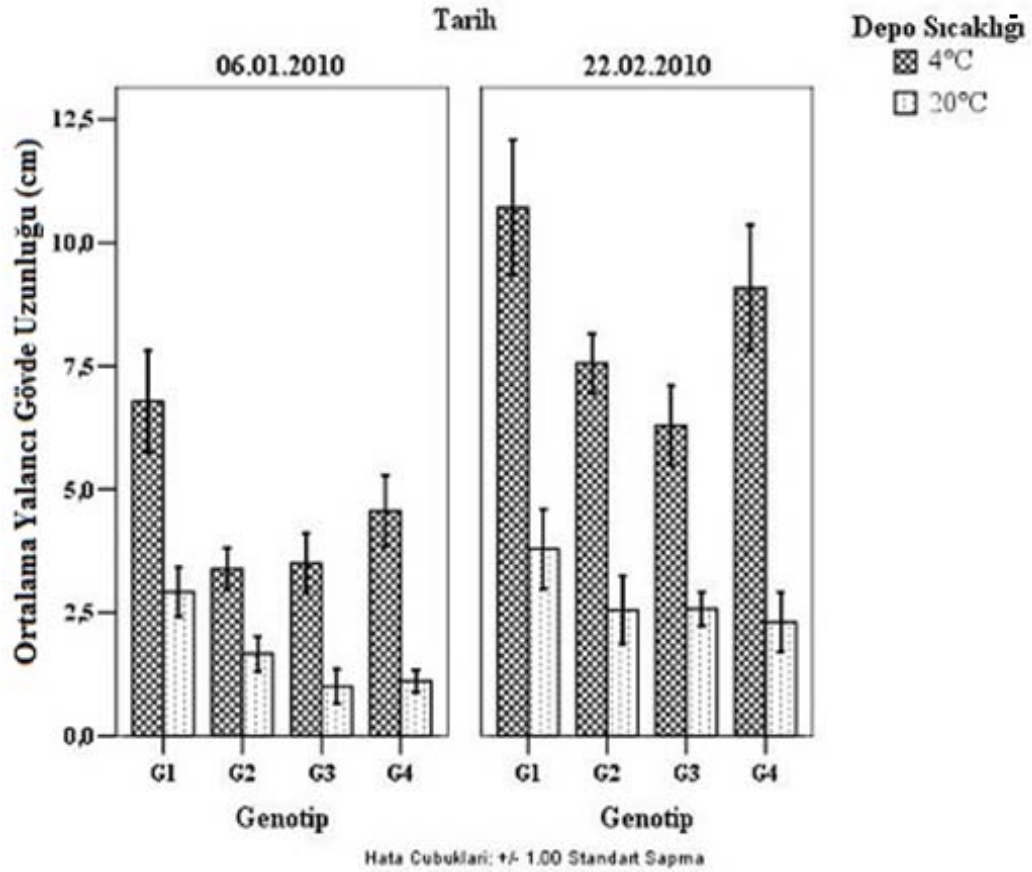
Dikimden kırk beş gün sonra 20°C uygulaması için en fazla yaprak sayısına sahip genotip olarak G1 genotipi belirlenmiştir. Buna karşın G2 ve G4 genotipleri arasında istatistiki bir fark görülmemiştir. En az yaprak sayısının ise G3 genotipinde olduğu belirlenmiştir. Buda istatistiki olarak diğerlerinden farklıdır.

Dikimden doksan gün sonra ise 4°C uygulaması için en fazla yaprak sayısına sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir. Buna karşın G2 ve G4 genotipleri

arasında istatistiki bir fark görülmemiştir ve sırasıyla 5,89 ve 5,83 yaprak meydana getirdiği görülmüştür. En az yaprak sayısının ise 4,33 ile G3 genotipinde olduğu belirlenmiştir ve istatistiki olarak diğerlerinden farklıdır. Dikimden doksan gün sonra 20°C uygulaması için en fazla yaprak sayısına sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 5,78 yaprak sayısına sahip olmuştur. Yine G2 ve G4 genotipleri sırasıyla 4,17 ve 4,61 yaprak ürettiği görülmüştür. En az yaprak sayısının ise 3,00 ile G3 genotipinde olduğu belirlenmiştir. İstatistiki olarak diğerlerinden farklıdır.

#### **4.1.2. Yalancı gövde uzunluğu**

Bütün genotiplerde; 4°C’de üç ay süre ile depolanan dışlardan gelişen bitkilerin ortalama yalancı gövde uzunluğu, 20°C’de depolanan dışlardan gelişen bitkilerin ortalama yalancı gövde uzunluğundan daha fazla olduğu saptanmıştır. Genotipler arasındaki farklılık ‘Duncan’ testi ile 0,05 önem seviyesinde SPSS 17.0 bilgisayar programı kullanılarak ortaya konulmuştur. Duncan testine göre yapılan analizlerde, hem dikimden kırk beş gün hem de dikimden doksan gün sonra yapılan yalancı gövde uzunluğu ölçümünde, 4°C’de ve 20°C’de depolanan dışlardan gelişen bitkilerde yalancı gövde uzunluğu bakımından genotipler arasında istatistiki olarak fark görülmüştür (Şekil 4.9, Çizelge 4.4).



**Şekil 4.9.** Dikim öncesi depolama sıcaklığına bağlı olarak, dikimden kırk beş gün (06.01.2010) ve dikimden doksan gün (22.02.2010) sonra sarımsak genotiplerinde meydana gelen yalancı gövde uzunluklarının karşılaştırılması

**Çizelge 4.4.** Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonra 4°C’de ve 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde yalancı gövde uzunluğundaki (cm) farklılıklar

Genotip	Dikimden kırk beş gün		Dikimden doksan gün sonra	
	4°C	20°C	4°C	20°C
G1	6,78 <sup>c</sup>	2,91 <sup>c</sup>	11,11 <sup>d</sup>	4,06 <sup>b</sup>
G2	3,39 <sup>a</sup>	1,66 <sup>b</sup>	7,55 <sup>b</sup>	2,56 <sup>a</sup>
G3	3,50 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	6,66 <sup>a</sup>	2,56 <sup>a</sup>
G4	4,56 <sup>b</sup>	1,11 <sup>a</sup>	9,08 <sup>c</sup>	2,31 <sup>a</sup>

Dikimden doksan gün sonra yapılan ölçümlere bakıldığında 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerin ortalama yalancı gövde uzunluklarının 20°C’de depolananlardan

elde edilenlere göre çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin G4 genotipi için; dikimden kırk beş gün sonra yapılan ölçümde 4°C’de depolanan dışlardan gelişen bitkilerde ortalama yalancı gövde uzunluğu 4,56 cm iken, aynı genotipin 20°C’de depolanan dışlarından gelişen bitkilerinde 1,11 cm’de kalmıştır. Dikimden doksan gün sonra yapılan ölçümlerde ise 4°C’de depolanan dışlardan gelişen bitkilerde ortalama yalancı gövde uzunluğu 9,08 cm iken, 20°C’de depolanan dışlardan gelişen bitkilerde 2,31 cm’dir.

Dikimden kırk beş ve dikimden doksan gün sonraki ölçümler karşılaştırmalı olarak incelendiğinde; dikimden doksan gün sonraki ölçümlerde ortalama yalancı gövde uzunluğunun belirgin bir şekilde daha fazla olduğu görülmektedir. Örneğin; G3 genotipinde dikimden kırk beş gün sonra, 4°C’de depolanan dışlardan elde edilen bitkilerin ortalama yalancı gövde uzunluğu 20°C’de depolanan dışlardan elde edilen bitkilerin ortalama yalancı gövde uzunluğundan 2,50 cm daha fazla iken bu fark dikimden doksan gün sonra 4,10 cm’ye yükselmiştir.

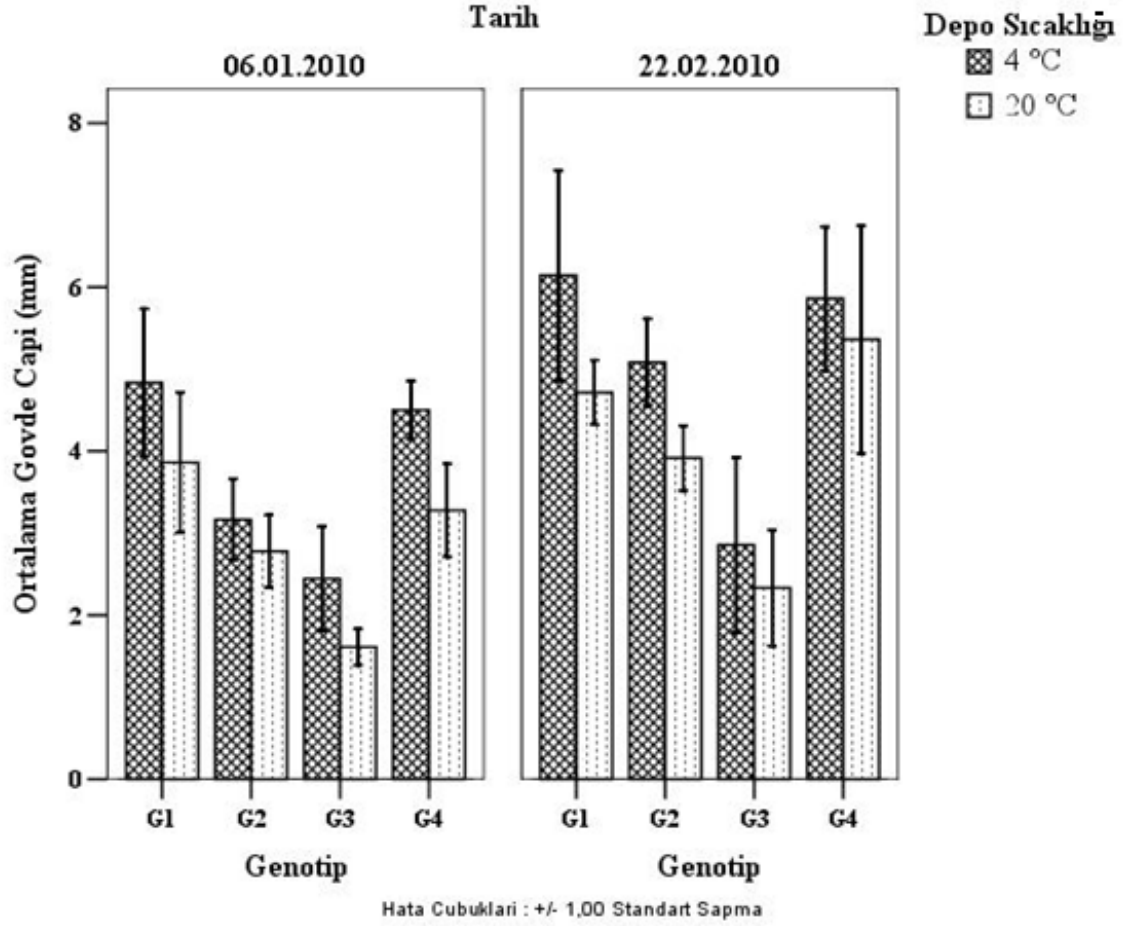
Dikimden kırk beş gün sonra 4°C uygulaması için en fazla yalancı gövde uzunluğuna sahip genotip olarak G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 6,78 cm’lik yalancı gövde uzunluğuna sahiptir. G4 genotipinin yalancı gövde uzunluğu 4,56 cm iken G2 ve G3 genotipleri arasında istatistiki bir fark görülmemiştir ve sırasıyla 3,39 cm ve 3,50 cm yalancı gövde uzunluğuna sahip oldukları belirlenmiştir. Dikimden kırk beş gün sonra 20°C uygulaması için en fazla yalancı gövde uzunluğuna sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 2,91 cm’lik yalancı gövdeye sahip olmuştur. Hemen ardından 1,66 cm ile G2 genotipi gelmiştir. En az yalancı gövde uzunluğu ise G3 ve G4 genotiplerindedir ve bunlar arasında istatistiki bir fark görülmemiştir. G3 ve G4’ün sırasıyla 1,00 cm ve 1,11 cm’lik yalancı gövdeye sahip olduğu belirlenmiştir.

Dikimden doksan gün sonra 4°C uygulaması için en fazla yalancı gövde uzunluğuna sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 11,11 cm’dir. Ardından G4 ve G2 genotipleri sırasıyla 9,08 cm ve 7,55 cm’lik yalancı gövdeye sahip oldukları ölçülmüştür. En az yalancı gövde uzunluğu ise 6,66 ile G3 genotipinde olduğu belirlenmiştir ve istatistiki olarak diğerlerinden farklıdır. Dikimden doksan gün sonra

20°C uygulaması için en fazla yalancı gövde uzunluğuna sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 4,06 cm yalancı gövde uzunluğuna sahiptir. Ardından G2, G3 ve G4 genotipleri sırasıyla 2,56 cm, 2,56 cm ve 2,31 cm'lik yalancı gövde uzunluğuna sahip oldukları görölmüştür ve bu üçünün arasında istatistiki olarak bir fark yoktur.

#### **4.1.3. Yalancı gövde çapı**

Ortalama yalancı gövde çapı bütün genotiplerde, 4°C'de üç ay süre ile depolama yapılan dişlerden elde edilen bitkilerde 20°C'de depolama yapılan dişlerden elde edilen bitkilere oranla daha fazladır. Genotipler arasındaki farklılık 'Duncan' testi ile 0,05 önem seviyesinde SPSS 17.0 bilgisayar programı kullanılarak ortaya konulmuştur. Duncan testine göre yapılan analizlerde, dikimden kırk beş ve dikimden doksan gün sonra ölçölen gövde çapında, 4°C'de ve 20°C'de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde gövde çapları bakımından genotipler arasında istatistiki olarak fark görölmüştür (şekil 4.10, Çizelge 4.5).



**Şekil 4.10.** Dikim öncesi depolama sıcaklığına bağlı olarak, dikimden kırk beş gün (06.01.2010) ve dikimden doksan gün sonra (22.02.2010) sarımsak genotiplerindeki yalancı gövde çaplarının (mm) karşılaştırılması

**Çizelge 4.5.** Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonra 4°C’de ve 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde yalancı gövde çapındaki (mm) farklılıklar

Genotip	Dikimden kırk beş gün sonra		Dikimden doksan gün sonra	
	4°C	20°C	4°C	20°C
G1	4,83 <sup>c</sup>	3,86 <sup>d</sup>	6,56 <sup>c</sup>	4,78 <sup>c</sup>
G2	3,17 <sup>b</sup>	2,78 <sup>b</sup>	5,08 <sup>b</sup>	3,92 <sup>b</sup>
G3	2,44 <sup>a</sup>	1,61 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>
G4	4,50 <sup>c</sup>	3,28 <sup>c</sup>	5,86 <sup>c</sup>	5,36 <sup>c</sup>

Dikimden kırk beş ve dikimden doksan gün sonra yapılan ölçümlere bakıldığında 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerin ortalama yalancı gövde çaplarının 20°C’de depolananlardan elde edilen bitkilere oranla daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. Örneğin; G4 genotipi için dikimden kırk beş gün sonraki ölçümde 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yalancı gövde çapı 4,50 mm olarak belirlenmiştir. Fakat oda sıcaklığında depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde 3,28 mm’de kalmıştır. Aynı genotip için dikimden doksan gün sonra yapılan ölçümlerde, düşük sıcaklıkta depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yalancı gövde çapı 5,86 mm iken oda sıcaklığında depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde 5,36 mm’dir.

Dikimden kırk beş gün sonra yapılan ölçümler için, dikim öncesi 4°C ve 20°C depolama uygulamalarının her ikisinde elde edilen bitkilerde en fazla ortalama yalancı gövde çapı G1 genotipinde varken; dikimden doksan gün sonraki ölçümde 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkiler için G1, 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkiler için ise G4 genotiplerinde en fazla ortalama yalancı gövde çapına rastlanmıştır. En az ortalama yalancı gövde çapı her iki tarihte her iki uygulamadan elde edilen bitkiler için G3 genotipinde görülmüştür.

Dikimden kırk beş gün ve dikimden doksan gün sonraki ölçümler karşılaştırmalı olarak incelendiğinde; dikimden doksan gün sonra ortalama yalancı gövde çapının belirgin bir şekilde daha fazla olduğu görülmektedir. Örneğin; G2 genotipinde 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yalancı gövde çapı dikimden kırk beş gün sonra 3,17 mm iken dikimden doksan gün sonra 5,08 mm’ e yükselmiştir. Aynı genotip için 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ortalama yalancı gövde çapı dikimden kırk beş gün sonra 2,78 mm iken dikimden doksan gün sonra 3,92 mm’ e yükselmiştir.

Dikimden kırk beş gün sonra 4°C uygulaması için en fazla yalancı gövde çapına sahip genotip olarak G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 4,83 mm yalancı gövde çapına sahiptir. G4 genotipi ortalama 4,50 mm yalancı gövde çapına sahiptir ve G1 ile arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir. G2 için yalancı gövde çapı 3,17 mm’dir. En az yalancı

gövde çapı ise 2,44 mm ile G3 genotipinde belirtilmiştir. Dikimden kırk beş gün sonra 20°C uygulaması için en fazla yalancı gövde çapına sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 3,86 mm gövde çapına sahiptir. Ardından 3,28 mm ile G4 ve 2,78 mm ile G2 gelir. En az yalancı gövde çapının ise 1,61 ile G3 genotipinde olduğu belirlenmiştir. İstatistiki olarak diğerlerinden farklıdır.

Dikimden doksan gün sonra 4°C uygulaması için en fazla yalancı gövde çapına sahip genotip olarak yine G1 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 6,56 mm yalancı gövde çapına sahip olmuştur. Ardından 5,86 mm ile G4 ve 5,08 mm ile G2 gelmektedir. En az yalancı gövde çapına sahip genotip ise 3,33 ile G3 genotipidir ve istatistiki olarak diğerlerinden farklıdır. Dikimden doksan gün sonra 20°C uygulaması için en fazla yalancı gövde çapına sahip genotip olarak G4 genotipi belirlenmiştir ve ortalama 5,36 mm'dir. G4 genotipini 4,78 ile G1, 3,92 ile G2 ve 2,33 ile G3 izlemektedir.

#### **4.2. cDNA-AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) Analizleri**

cDNA-AFLP analizleri için G1, G2, G3 ve G4 olmak üzere dört farklı sarımsak genotipi kullanılmıştır. Bunlardan G1 ve G2 çiçeklenen, G3 ve G4 ise çiçeklenmeyen genotiptir. Analizler için, bu genotiplerin dışlarından büyüme meristemi örnekleri hem depolamadan önce hem de 4°C'de ve 20°C'de doksan gün depolandıktan sonra (dikim öncesi) alınmıştır. Dikimden sonra üç-dört yaprak aşamasında büyüme meristemi ve yaprak örnekleri alınmıştır. Yedi-dokuz yaprak aşamasında ise çiçeklenmeyen genotiplerde büyüme meristemi ve yaprak örnekleri; çiçeklenen genotiplerde ise yaprak, çiçek sapı ve çiçek sürgünü örnekleri alınmıştır. Toplam olarak alınan kırk dört örnekte, yirmi farklı primer kombinasyonu denenerek farklı ifade olan genler cDNA-AFLP yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yirmi primer kombinasyonundan elde edilen bulgular Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de özetlenmiştir. Değerlendirilen dört yüz elli bir banttın üç yüz elli iki tanesi polimorfik, doksan dokuz tanesi ise dört genotipte dört farklı örnekleme aşamasında sürekli olarak ifade olan genleri göstermektedir. Çizelge 4.6'ya baktığımızda değerlendirilebilen bant sayısı en fazla XabICC- MseICTG primer kombinasyonundan (39 bant) elde edilmiş en az bant ise XabITT- MseICCT primer kombinasyonundan (11 bant) değerlendirilmiştir.



**Çizelge 4.6.** cDNA-AFLP analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve bu primer kombinasyonlarından değerlendirilen bant sayısı

<b>Primer Kombinasyonu</b>	<b>Toplam Bant Sayısı</b>	<b>Polimorfik Bant Sayısı</b>	<b>Agaroz Jelden İzole Edilen Bant Sayısı</b>
1- XabICC- MseICAT	33	23	38
2- XabICC- MseICTG	39	36	62
3- XabICT- MseICCT	24	15	25
4- XabICT- MseICTA	27	19	40
5- XabICG- MseICAT	12	9	16
6- XabICG- MseICTA	14	8	15
7- XabICT- MseIGT	31	17	42
8- XabICT- MseIGC	27	18	33
9- XabITT- MseICAC	15	9	23
10- XabITT- MseICTG	12	9	12
11- XabITT- MseICCT	11	7	5
12- XabITC- MseIGT	26	23	30
13- XabICC- MseIGT	26	24	41
14- XabICC- MseICGT	19	13	18
15- XabITC- MseIAGC	21	18	32
16- XabITA- MseIAGC	14	10	17
17- XabICA- MseIAGC	23	15	27
18- XabICG- MseIGA	13	11	18
19- XabITG- MseICG	28	25	47
20- XabITG- MseIGA	36	32	49
<b>Toplam</b>	<b>451</b>	<b>352</b>	<b>590</b>

**Çizelge 4.7.** cDNA-AFLP analizinde yirmi primer kombinasyonundan yaprakta, mersitemde ve iki farklı depolama uygulamasında elde edilen veriler

Primer	POLİMORFİK BAND SAYISI															
	Yaprak							Meristem							Depolama	
	G1	G2	G3	G4	Çiçeklenen	Çiçeklenmeyen	Tüm genotiplerin yaprağında ifade olan	G1	G2	G3	G4	Çiçeklenen	Çiçeklenmeyen	Tüm genotiplerin meristeminde ifade olan	4°C	20°C
XCT-MGT	1	1			1		4							1		
XTG-MCG						1	1			1						
XCA-MAGC							1							1		
XTC-MAGC														2		
XCG-MGA																
XCC-MCGT																
XCC-MCAT															1	
XCC-MCAT-2		3				1	1								1	
XTG-MGA					2		6									1
XTT-MCAC		1			1											
XCG-MCAT							1									
XTC-MGT	2						3	1						1		
XCT-MGC																
XCC-MGT							4							1		
XTT-MCCT							1									
XCT-MCTA							2								1	
XTT-MCTG			1												1	
XTA-MAGC							3									
XCC-MCTG							2								1	
XCG-MCTA																
XCT-MCCT							1								1	
Toplam	3	5	1		4	2	30	1		1				6	6	1

cDNA-AFLP analizlerinde kullanılan 20 primer kombinasyonu içinde, yaprakta farklı ifade olan en fazla gen, toplamda sekiz bant ile XTG-MGA primer kombinasyonunun olduğu belirlenmiştir. XTC-MAGC, XCG-MGA, XCC-MCGT, XCC-MCAT, XCT-MGC, XCG-MCTA primer kombinasyonları ile yapılan analizlerde, tüm genotiplerin herhangi bir gelişim safhasında, yaprakta farklı ifade olan bir cDNA-AFLP bandı görülmemiştir (bkz. Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi üç farklı primer kombinasyonunda yaprakta sadece G2 genotipinde ifade olan fakat diğer genotiplerde görülmeyen beş farklı cDNA-AFLP bantı belirlenmiştir. Aynı şekilde sadece G1 genotipinin yapraklarında ifade olan üç, sadece G3 genotipinin yapraklarında ifade olan 1 band görülmüştür. Ancak örnekleme yapılan dönemlerde yalnız G4 genotipine özgü yaprakta ifade olan bir banta rastlanmamıştır. Çiçeklenen G1 ve G2 genotiplerinde genotipe özgü ifade olan band sayısı dört iken çiçeklenmeyen G3 ve G4 genotiplerinde bu genotiplere özgü ifade olan band sayısı ikidir. Tüm genotiplerin yapraklarında toplamda otuz band farklı ifade olmuştur.

Meristemde ise farklı ifade olan en fazla gen, iki bant ile XTC-MAGC ve XTC-MGT primer kombinasyonlarının olduğu belirlenmiştir. XCG- MGA, XCC- MCGT, XCC-MCAT, XTG-MGA, XTT-MCAC, XCG-MCAT, XCT-MGC, XTT-MCCT, XCT-MCTA, XTT-MCTG, XTA-MAGC, XCC-MCTG, XCG-MCTA ve XCT-MCCT primer kombinasyonları ile yapılan analizlerde, tüm genotiplerin herhangi bir gelişim safhasında, meristemde farklı ifade olan bir cDNA-AFLP bandı görülmemiştir (bkz. Çizelge 4.7).

Yukarıda da açıklandığı gibi bazı bantlar genotipe özgü olarak farklı ifade olurken bazı bantlar ise örnekleme zamanına ve bitki dokusuna (yaprak, mersitem gibi) özgü olarak farklı ifade olduğu saptanmıştır (bkz. Çizelge 4.7). Gen ifade yönünden en fazla farklılık meristem örnekleri ile yaprak örnekleri arasında görülmüştür. Oda sıcaklığında depolanmış ve düşük sıcaklıkta depolanmış bitkiler arasında gelişme hızı ve morfolojik karakterler yönünden belirgin farklılıklar görülmüş ve bu farklılıklar gen ifade düzeyinde de belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.7). 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen

bitkilerde ifade olan fakat 20°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ifade olduğu belirlenemeyen altı band belirlenirken 20°C’de depolanan dişlerden ifade olan fakat 4°C’de depolanan dişlerden elde edilen bitkilerde ifade olmayan bir band belirlenmiştir. Böylece toplam olarak dişlerin depolanmasına bağlı olarak toplam yedi polimorfik band belirlenmiştir. XabICC-MseICAT primer kombinasyonundan belirlenen bir bant, dişleri 4°C’de depolanan bütün genotiplerin meristemlerinde ifade olurken aynı genotiplerin oda sıcaklığında (20°C) depolanmış dişlerden elde edilen meristemlerde görülmemiştir (Şekil 4.11). Bu bantın dizi analizi yapılmış ve NCBI gen bankasında yapılan BLAST analizinde thiamin biyosentezinde görev yapan bir protein olduğu belirlenmiştir. Thiamin aynı zamanda B1 vitamini olarakta bilinmektedir. Bu vitamin karbonhidrat metabolizmasındaki ve amino asit sentezinde rol oynayan enzimlerin kofaktörüdür. Dolayısıyla bitki gelişimi üzerine önemli etkileri olan bir vitamindir. Ayrıca bu vitamin, doku kültürü ortamlarında da kullanılmaktadır.



**Şekil 4.11.** 4°C’de ve 20°C’de depolanan sarımsak genotiplerinde depolamaya bağlı olarak farklı ifade olan gen. A, C, E ve G oda sıcaklığında depolanan sırasıyla G4, G3, G2 ve G1 sarımsak genotipleri. B, D, F ve H düşük sıcaklıkta depolanan sırasıyla G4, G3, G2 ve G1 sarımsak genotipleri

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilere göre hem daha çok yaprak hem de daha büyük bitkiler oluşturmuşlardır. Bunun nedeni olarak 4°C’de depolanan dişlerin daha önce sürdüğü söylenebilir. Ancak 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerin aksine 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerin görünümünün zayıf olması ayrıca yaprakların virüs hastalıklarının semptomlarına benzeyen bir fenotipe sahip olması 20°C’de depolanan dişlerden gelişen küçük bitkilerin oluşmasının sadece geç sürmeyle açıklanamayacağını göstermektedir (bkz. Şekil 4.6). Bu da dişler sürdükten sonra da dişlerin dikim öncesi farklı sıcaklıklarda depolanmasının etkisinin bitki düzeyinde devam ettiğini göstermektedir.

Shemesh ve ark. (2008) çeşitlilik gösteren bir sarımsak popülasyonu içindeki olgunlaşmış başları dikim öncesi 4°C veya 20°C’de depolamıştır. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmada 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerin 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerden daha erken diş oluşturmaya başladıklarını belirtmişlerdir. Shemesh ve ark. (2008)’nin yaptığı çalışmaya benzer olarak bu çalışmada da 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerden daha önce diş oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir. Örneğin G1 genotipinin 4°C’de depolanan dişlerinden gelişen bitkilerde dikimden yüz on beş gün sonra sekiz yaprak aşamasında diş oluşumu gözlemlenmişken aynı genotipin 20°C’de depolanan dişlerinden gelişen bitkilerde diş oluşumu görülmemektedir (bkz. Şekil 4.5). Bu bulgu sarımsak dişlerinin dikim öncesi düşük sıcaklıkta depolanmasının diş oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bütün genotiplerde 4°C’de depolanan dişlerin 20°C’de depolanan dişlerden daha önce sürdüğü saptanmıştır. Bu bulgu dişlerin dikim öncesi 4°C’de depolanmasının sürmeyi hızlandırdığını göstermektedir. Ancak Shemesh ve ark. (2008) sarımsak dişlerinin dikim öncesi düşük sıcaklıkta depolanmasının sarımsak genotiplerinin dikim sonrası sürmelerini etkilemediğini rapor etmişlerdir.

Ayrıca Shemesh ve ark. (2008), büyümekte olan bitkilerin vejetatif aşamadan generatif aşamaya geçişleri dikim öncesi depolama sıcaklıklarından etkilendiğini ifade etmişlerdir. Yaptığımız bu tez çalışmasında da generatif faza geçişin 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerden daha erken olduğu saptanmıştır. Çiçeklenen G1 ve G2 genotiplerinde görülebilir çiçek sapı sekiz-on yaprak aşamasında gözlemlenmiştir. Benzer olarak Kamenetsky ve Rabinowitch (2002) 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerin ortalama yedi-dokuz yaprak aşamasında iken görülebilir çiçek sapı oluşturulmuşken 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerde bu on bir-on dört yaprak aşamasına kadar uzadığını rapor etmişlerdir. Shemesh ve ark. (2008)’da 4°C’de sekiz hafta depolanan dişlerden gelişen bitkilerin 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerden daha erken çiçek sapı oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Takagi (1990) ile Kamenetsky ve Rabinowitch (2001)’te dikim öncesi dişlerin düşük sıcaklıkta depolanmasının (-2°C’den 9°C’ye) ve dikim sonrası bitkileri 17-23°C gündüz ve 9-15°C gece sıcaklık rejiminde büyütülmesi erken çiçek sapı oluşumunu ve uzamasını teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Dikim öncesi sarımsak dişlerinin düşük sıcaklıkta depolanması bitki boyunun üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilere nazaran daha uzun bitki boyuna sahip olduğu saptanmıştır (bkz. Şekil 4.9, Çizelge 4.4). Benzer sonuç Kamenetsky ve Rabinowitch (2004) tarafından da rapor edilmiştir. Araştırmacılar düşük sıcaklıkta depolanan dişlerden gelişen bitkiler 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerden daha uzun olduğunu belirtmişlerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışma, dikim öncesi sarımsak dişlerinin düşük sıcaklıkta depolanmasının dikimden sonra büyüyen bitkilerin gen ifade profilini etkilediğini göstermektedir. Bu nedenle 4°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler ve 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkiler arasındaki gen ifade farklılığını belirlemek için yaptığımız cDNA-AFLP analizinde yedi adet farklı ifade olan DNA parçası belirlenmiştir. Bu bantlardan bir tanesinin DNA dizi analizi yapılmış ve NCBI gen bankasında yapılan BLAST analizinde thiamin biyosentezinde görev yapan bir enzim olduğu görülmüştür.

Bu çalışma ile sarımsak genotiplerinde, sarımsağın farklı dönemlerinde ve farklı sıcaklıkta depolanan dişlerden gelişen bitkiler arasında farklı ifade olan genler cDNA-AFLP yöntemi ile analiz edilmiştir. Toplamda altmış adet polimorfik cDNA-AFLP DNA parçası belirlenmiştir ve bunlardan yedi tanesi tez kapsamında önemlidir. Ancak bu bantlardan sadece bir tanesinin DNA dizisi bu yüksek lisans tezi kapsamında tamamlanabilmiştir. Bu polimorfik bantların sarımsak bitkisinde ne gibi bir işlevlerinin olduğu kalan bantların DNA dizisinin belirlenip gen bankasındaki diğer DNA dizileri ile karşılaştırılmasıyla belirlenebilecektir. Daha sonra polimorfik olduğu belirlenen bantların DNA dizilerinin Northern Blot ya da Realtime PCR Analizleri kullanılarak teyidinin yapılması gereklidir. Böylece 4°C’de ve 20°C’de depolanan dişlerden gelişen bitkilerdeki farklı fenotipe neden olan genler belirlenebilecektir.

Sonuç olarak, cDNA-AFLP analiz yöntemi kullanılarak farklı ifade olan genlerin sarımsakta belirlendiği bu çalışmada; sarımsak genomunda ifade olan genler yönünden oldukça fazla polimorfizm olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sarımsakta dikim öncesi depolamanın iki farklı sıcaklık uygulaması ile araştırıldığı temel bir çalışma olması ve gelecekte sarımsak ile ilgili yapılacak moleküler biyolojik çalışmalara ışık tutması bakımından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2008.** Food And Agricultural Organization of United Nations (FAO), Economic and Social Department: The Statistical Division (Erişim tarihi: 15.09.2010).
- Anonim, 2009.** Türkiye İstatistik Kurumu Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı.
- Ayres, N.M., McClung, A.M., Larkin, P.D., Bligh, H.F.J., Jones, C.A., Park, W.D. 1997.** Microsatellite and a Single Nucleotide Polymorphism Differentiate Apparent Amylose Classes in an Extended Pedigree of US Rice Germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94:773- 781.
- Bachem, C.W., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G. 1996.** Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development, *Plant J.* 9 (1996), pp. 745–753.
- Barcaccia, G., Meneghetti, S., Albertini, E., Triest, L., Lucchin, M. 2001.** Linkage mapping in tetraploid willows: segregation of molecular markers and estimation of linkage phases support an allotetraploid structure for *Salix alba* x *Salix fragilis* interspecific hybrids. *Heredity* 90: 169–180.
- Beşirli , G., Yanmaz, R., 2007.** Klon Seleksiyon Yöntemi ile Sarımsakta Çeşit Geliştirme. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, 19-22 EYLÜL 2006, KSÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Kahramanmaraş. s.39-43.
- Beşirli, G., Göçmen, M., Yanmaz, R., Kantoğlu, K.Y., 2007.** Bazı Sarımsak Genotiplerinin (*Allium sativum* L.) ve Mutantlarının RAPD Belirleyicileri ile Tanımlanması. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, 19-22 EYLÜL 2006, KSÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Kahramanmaraş. s 49-54.
- Breyne, P., Dreesen, R., Vandepoele, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., Rombauts, S., Raes, J., Cannoot, B., Engler, G., Inze, D., Zabeau, M. 2002.** Analysis of the transcriptome during cell division in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14825–14830.
- Cnudde, F., Moretti, C., Porceddu, A., Pezzotti, M., Gerats, T. 2003.** Transcript profiling on developing *Petunia hybrida* floral organs. *Sexual Plant Reproduction*. 16:77-85.
- Etoh, T. 1983a.** Accomplishment of microsporogenesis in garlic clone. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University* 19: 55- 63.
- Etoh, T. 1983b.** Germination of seed obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. *Proceedings of the Japan Academy* 59 (Series B),83- 87.
- Etoh, T. 1985.** Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, 21: 77– 132.



- Etoh, T., Noma, Y., Nishitarumizu, Y., Wakamoto, T. 1988.** Seed productivity and germinability of various garlic clones collected in Soviet Central Asia. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, 24:129–139.
- Etoh, T., Simon, P.W., 2002.** Diversity, Fertility and Seed Production of Garlic. In Rabinowitch HD and Currah L (Eds.). *Allium crop sciences: recent advances*. Wallingford, UK: CAB International; 101-118.
- Fritsch, R.M., Friesen N. 2002.** Evolution, Domestication and Taxonomy. In Rabinowitch HD and Currah L (Eds.). *Allium crop sciences: recent advances*. Wallingford, UK: CAB International; p.5-30.
- Gvaladze, G.E. 1961.** The embryology of the genus *Allium L.* *Bulletin of the Academy of Sciences of the Georgian SSR* 26:193-200 (in Russian).
- Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D. 2001.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol Biotechnol.* 57: 282-286.
- Hong, C.J., Etoh, T. 1996.** Fertile clones of garlic (*Allium sativum* L.) abundant around the Tien Shan Mountains. *Breeding Science* 46, 349-353.
- Hong, C.J., Etoh, T. Iwai, S. 2000.** An attempt of crossbreeding in garlic. *Mem Fac Agric Kagoshima Univ* 36:17 / 28.
- Hughes, J., Collin, H.A., Tregova, A., Tomsett, A.B., Cosstick, R., Jones, M.G. 2006.** Effect of Low Storage Temperature on Some of the Flavour Precursors in Garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Foods for Human Nutrition.* 61, 78: 82.
- İpek M, İpek A, Simon PW. 2003.** Comparison of AFLPs, RAPD Markers, and Isozymes for Diversity Assessment of Garlic and Detection of Putative Duplicates in Germplasm Collections. *Journal of American Society for Horticultural Sciences.* 128:246-252 (2003). (SCI-A grubu).
- İpek, M. 2003.** Comparative Analysis of Genetic Diversity in Garlic (*Allium sativum* L.) Using AFLP, RAPD, and Isozyme Markers and Characterization of a Cytoplasmic Marker Associated with the Bolting Phenotype. PhD Thesis, University of Wisconsin-Madison .
- Ipek, M., Ipek, A., Almquist, S.G., Simon, P.W. 2005.** Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic based on AFLP markers, *Theor. Appl. Genet.* 110 (2005), pp. 228–236.
- İpek, M., İpek, A., Simon, P.W. 2008.** Genetic characterization of *Allium tuncelianum*: An endemic edible *Allium* species with garlic odor. *Scientia Horticulturae.* 115: 409- 415.
- Jones, H.A., Mann, L.K. 1963.** Onions and their Allies. Leonard Hill Books, London.
- Kamenetsky R, Rabinowitch H.D. 2001.** Floral development in bolting garlic. *Sexual Plant Reproduction* 13, 235–241.

- Kamenetsky, R., London Shafir, I., Zemah, H., Barzilay, A., Rabinowitch, H. D. 2004.** Environmental Control of Garlic Growth and Florogenesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129: 144-151.
- Kamenetsky, R., Rabinowitch, H.D. 2002.** Florogenesis. In Rabinowitch HD and Currah L (Eds.). *Allium crop sciences: recent advances*. Wallingford, UK: CAB International; 2002. p. 31-58.
- Katayama, Y. 1936.** Chromosome studies in some *Alliums*. *J. coll. Agr. Imp. Univ., Tokyo*. 13, 431-441.
- Koul, A.K., Gohil, R.N. 1970.** Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum*. *Linn. Cytologia* 35:197–202.
- Koul, A.K., Gohil R.N., Langer, A.1979.** Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding systems, *Euphytica* 28 , pp. 457–464.
- Lowe, A.J., Hanotte, O., Guarino, L. 1996.** Standardization of Molecular Genetic Techniques for the Characterization of Germplasm Collections: the Case of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*.107:50-54.
- Melchior, H. 1964.** 3. Reihe *Liliiflorae (Liliales)*. In: Melchior, H. (ed.) *A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. 12 Auflage*. Gebrüder Borntraeger, Berlin-Nikolassee, pp. 513-543.
- Novak, F. J. 1972.** Tapetal development in the anthers of *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis* Regel. *Experientia* 28, 1380- 1381.
- Novak, F.J. 1990.** *Allium* tissue culture. In: Rabinowitch HD. & Brewster JL (Eds) *Onions and Allied Crops, Vol 1* (pp. 233-250). CRC press, Boca Raton, Florida, USA.
- Pooler, M.R., Simon, P.W. 1993.** Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. *HortScience* 28:1085-1086.
- Pooler, M.R., Simon, P.W. 1994.** True seed production in garlic, *Sex. Plant Reprod.* 7 (1994), pp. 282–286.
- Rubatzky, V.E., Yamaguchi, M. 1997.** *World Vegetables: Principles, Production and Nutritive Values*(2nd edn.). Chapman& Hall, NY.
- Sabuncu, A. B. 2005.** Çinkonun Sarımsak (*Allium Sativum* L.)’Ta Verim Ve Bazı Kalite Parametrelerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Sayari, A.H., Costa, A., Leone, A., Jaoua, S., Bouzid, R.G. 2005.** “Identification of salt stress induced transcripts in potato leaves by cDNA AFLP”, *Molecular Biotechnology*, 30 (2005) 31-40.
- Shemesh, E., Scholten, O., Rabinowitch, H.D., Kamenetsky, R. 2008.** Unlocking variability: inherent variation and developmental traits of garlic plants originated from sexual reproduction, *Planta* 227 , pp. 1013–1024.

- Shindo, C., Sasakuma, T. 2002.** Genes Responding to Vernalization in Hexaploid Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7):1003-1010.
- Simon, P.W., Jenderek, M.M. 2003.** Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. In: J. Janick (Ed.) *Plant Breeding Reviews*, John Wiley & Sons, Inc., NY, pp. In press .
- Simoës-Araujo, J. L., Alves-Ferreira, M., Rumjanek, N. G., Margis-Pinheiro, M. 2008.** VuNIP1 (NOD26-like) and VuHSP17.7 Gene Expression are Regulated in Response to Heat Stress in Cowpea Nodule. *Env. and Exp. Botany* 63(1-3):256-265.
- Takagi, H., 1990.** Garlic *Allium sativum* L. In: J.L. Brewster & H.D. Rabinowitch (Eds.), *Onions and Allied Crops*, III, pp. 109–146. Biochemistry, Food Science and Minor Crops. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.
- Takenaka, Y. 1931.** Further reports of the cytological investigations on the sterile plants. *J Chosen Natur Histor Soc* 12: 25 41 (In Japanese).
- Takhtajan, A. 1997.** Diversity and Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, 643 pp.
- Taner, Y., Beşirli, G., Kunter, B., Yanmaz, R. 2004.** Sarımsakta (*Allium sativum* L.) Radyasyonla Mutasyon İslahına Yönelik Olarak “Etkili Mutasyon Dozunun” Belirlenmesi, *Bahçe* 33 (1-2), sa: 95-99-Yalova.
- Titarenko, E., Rojo, E., Leon, J., Sanchez-Serrano, J. J. 1997.** Jasmonic Acid-Dependent and -Independent Signaling Pathways Control Wound-Induced Gene Activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 817–826.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kupier, M., Zabeau, M. 1995.** “AFLP: A new technique for DNA fingerprinting”, *Nucleic Acid Research*, 23 (1995) 4407-4414.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. 2000.** Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bornova, İzmir, 440 s.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., Özcan, S., Gürel, E., Babaloğlu, M. 2001.** Genetik Markörler ve Analiz Metodları. *Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, s:334-336.
- Yumurtacı, Y. 2009.** *Aegilops tauschii*'de TUZ Stresine Dayanıklılığı Sağlayacak Yeni Genlerin cDNA -AFLP Yöntemi İle Belirlenmesi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Biyoloji Programı, İstanbul.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem GÜNAYDIN  
Doğum Yeri ve Tarihi :Bulgaristan, 09. 11. 1982  
Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Mezuniyet Yılı)

Lise : Bursa Kız Lisesi/2001  
Lisans : Uludağ Üniversitesi/2007  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/2011

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