

**SARIMSAKTA ÇİÇEKLENME İLE İLİŞKİLİ GENLERİN
İFADE DÜZEYİNİN ANALİZİ**

Osman KIRIKOĞLU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARIMSAKTA ÇİÇEKLENME İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYİNİN
ANALİZİ**

Osman KIRIKOĞLU
0000-0003-4414-4746

Prof. Dr. Meryem İPEK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Osman KIRIKOĞLU tarafından hazırlanan “**Sarımsakta Çiçeklenme ile İlişkili Genlerin İfade Düzeyinin Analizi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Meryem İPEK

Başkan : Prof. Dr. Meryem İPEK
000-0002-0609-3442
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
İmza

Üye : Prof. Dr. Cevriye Mert
0000-00003-3092-5023
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
İmza

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge KESİCİ
0000-0001-9533-0800
Bahçeşehir Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü
20/03/2023

**B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım
bu tez çalışmasında;**

- 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.

20/03/2023

Osman KIRIKOĞLU

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayımlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Prof. Dr. Meryem İPEK

Tarih

Osman KIRIKOĞLU

Tarih

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum anladım
yazmalı ve imzalanmalıdır.

İmza

Bu bölüme kişinin kendi el yazısı ile okudum
anladım yazmalı ve imzalanmalıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SARIMSAKTA ÇİÇEKLENME İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE DÜZEYİNİN ANALİZİ

Osman KIRIKOĞLU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Uzun yıllar boyunca klonal olarak kültürü yapılan sarımsak (*Allium sativum* L.) bitkisinde çiçeklenme mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu tez çalışmasının amacı, daha önceden çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinde farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiş XTG_MCG_13, XCT_MGT_7, XCT_MGC_6, XTG_MGA_10 kodlu EST genlerin qRT-PCR analizleri ile ifade düzeylerinin belirlenmesidir. Sarımsak başları 12 hafta süresince 4 °C ve 20 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta depolanmıştır. Ayrıca bitkilerin gelişmesi ve çiçeklenmesi için genotiplerin dişleri araziye dikilmiştir. Bitki örneği olarak dişlerin orta kısmındaki büyüme meristemi, yaprak ve çiçek sürgün dokuları kullanılmıştır. Örneklemeler depolama öncesinde ve 4 °C ve 21 °C'de 12 hafta süreyle depolama sonrasında diş meristemleri; 2-3 yaprak, 4-5 yaprak, 6 yaprak, 7-8 yaprak bitki gelişimi aşamalarında yaprak ve sürgün meristemleri ve 7-8 yaprak aşamasında çiçek sürgünü olacak şekilde yapılmıştır. qRT-PCR analizlerinde XCT_MGT_7 EST ve XTG_MCG_13 kodlu EST genlerinin çiçeklenen G2 ve G3 sarımsak genotiplerinde çiçeklenmeyen G4 ve G5 sarımsak genotiplerine göre bitki gelişim aşamalarında daha yüksek ifade olduğu belirlenmiştir. XCT_MGC_6 kodlu genin ise çiçeklenen G2 genotipinin bitki gelişim aşamalarında diğer genotiplere göre anlamlı bir şekilde yukarı doğru ifade olduğu bulunmuştur. XTG_MGA_10 kodlu EST geninde ise çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotipleri arasında anlamlı bir şekilde farklı ifade olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada analiz edilen genlerin göreceli ifade düzeyleri yönünden genotipler arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gen ifade analizi, qRT-PCR, *Allium sativum* L., Çiçeklenmeyi kontrol eden genler.

2022, viii + 30 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis
GENE EXPRESSION LEVEL ANALYSIS OF FLOWERING RELATED GENES IN
GARLIC

Osman KIRIKOĞLU

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Meryem İPEK

The flowering mechanism of garlic (*Allium sativum* L.), which is cultivated clonally for many years has not been fully elucidated. The aim of this thesis study is to determine the expression levels of XTG_MCG_13, XCT_MGT_7, XCT_MGC_6, XTG_MGA_10 coded EST genes with qRT-PCR analysis, which were previously found to be differentially expressed in flowering and non-flowering garlic genotypes. Garlic bulbs were stored at two different temperatures, 4 °C and 20 °C for 12 weeks. In addition, cloves of genotypes were planted in the field for the development and flowering of plants. Meristem of clove, leaf and inflorescence tissues were used as plant samples. The sampling was done as apical meristems of cloves before storage and after storage for 12 weeks at 4 °C and 21 °C; leaves and meristems of plants at 2-3 leaves, 4-5 leaves, 6 leaves, and 7-8 leaves stages and inflorescence at 7-8 leaves stage. In qRT-PCR analyzes, it was determined that XCT_MGT_7 EST and XTG_MCG_13 coded EST genes were expressed higher in flowering G2 and G3 garlic genotypes than non-blooming G4 and G5 garlic genotypes during plant development stages. On the other hand, the gene coded XCT_MGC_6 was significantly up-regulated in plant development stages of the flowering G2 genotype compared to other genotypes. The expression level of the EST gene with the code XTG_MGA_10 did not show a significant difference between the flowering and non-flowering garlic genotypes. As a result, significant differences were determined between genotypes in terms of relative expression levels of the genes analyzed in this study.

Keywords: Gene expression analysis, qRT-PCR, *Allium sativum* L., Genes controlling flowering

2022, viii + 30 pages.

ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR

Eğitim sürecimde bilgi birikiminden yararlandığım, üzerinde gerçek manada emeği olup yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bana destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Meryem İPEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca üzerimde ve çalışmamda maddi ve manevi desteği olan annem şükran KIRIKOğLU, babam İsmet KIRIKOğLU ve eşim Nazlı KIRIKOğLUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Osman KIRIKOğLU
20/03/2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Sarımsağın Tüketim Şekilleri.....	4
2.2. Sarımsağın Sağlık Yönünden Faydaları.....	5
2.3. Sarımsağın Morfolojik ve Çiçek Özellikleri	5
2.4. Bitkilerde ve Sarımsakta Çiçeklenme Mekanizması.....	7
2.5. qRT-PCR ve Referans Genler (“Housekeeping” Genler).....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Bitki Materyali	12
3.2. RNA İzolasyonu.....	12
3.3. RNA Miktarı Belirleme.....	14
3.4. cDNA sentezi	14
3.5. Gerçek Zamanlı PCR	15
3.6. qRT-PCR Sonuçlarının Analizi.....	15
3.7. İstatistiksel Analiz.....	16
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	17
4.1. Gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR)	17
4.2. Çiçeklenen ve Çiçeklenmeyen Sarımsak Genotipleri Arasında cDNA-AFLP EST Genlerindeki İfade Farklılıkları.....	21
5. SONUÇ	26
KAYNAKLAR	27
ÖZGEÇMİŞ	29

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°C	Sıcaklık
%	Yüzde
mM	Milimolar
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
sn	Saniye
cm	Santimetre
mm	Milimetre

Kısaltmalar	Açıklama
DÖ	Depolama öncesi
DS	Depolama sonrası
ÇS	Çiçek sürgünü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
cDNA	Komplementer DNA
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
PCR	Polimer zincir reaksiyonları
EST	İfade olmuş genler
AFLP	Çoğaltılmış polimorfik DNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4. 1.	G4 genotipine ait olan dönemlerin örneklerinin actin genine karşı olan reaksiyonlarının eğrisi.....	17
Şekil 4. 2.	Çiçeklenen (G2 ve G3) ve çiçeklenmeyen (G4 ve G5) sarımsak genotiplerinde XTG_MCG_13 EST geninin göreceli ifadesi.....	21
Şekil 4. 3.	Çiçeklenen (G2 ve G3) ve çiçeklenmeyen (G4 ve G5) sarımsak genotiplerinde XCT_MGT_7 EST genin göreceli ifadesi.....	23
Şekil 4. 4.	TÜBİTAK-TOVAG 105O551 proje kapsamında cDNA-AFLP analizleri ile belirlenen XCT_MGT_7 EST geninin çiçeklenen G1 ve G2 genotiplerin 2007 yılı ve 2008 yılı büyüme periyodundan elde edilen yaprak örneklerindeki okla işaretlenmiş band profili.....	24
Şekil 4. 5.	Çiçeklenen (G2 ve G3) ve çiçeklenmeyen (G4 ve G5) sarımsak genotiplerinde XCT_MGC_6 EST genin göreceli ifadesi.....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3. 1. Primer Dizileri.....	16
Çizelge 4.1. Gerçek zamanlı PCR analizinde çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinin farklı gelişme dönemlerinde cDNA-AFLP EST genlerinin göreceli gen ifade düzeyleri.....	18

1. GİRİŞ

Sarımsak (*Allium sativum* L.) Alliaceae familyası içerisinde olup *Allium* cinsi altında sınıflandırılmaktadır (Takhtadzhian ve Takhtajan, 1997). *Allium* cinsine ait yaklaşık 750 tür olduğu bildirilmektedir. Bu türlerden yaklaşık olarak 25 türün tüketimi ve 7 türünde yoğun olarak üretimi yapılmaktadır (Fritsch ve Friesen, 2002). Sarımsak, *Allium* türleri içinde soğandan sonra dünyada ikinci ülkemizde ise üçüncü önemli kültür bitkisidir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda sarımsağın antioksidan, antimikrobik ve antikarsinojen özelliklerinin ortaya konulmasıyla bu ürünün tüketimi artmıştır (Thomson ve Ali, 2005). Özellikle, Avrupa ve diğer gelişmiş ülkelerde işlenmiş sarımsak ürünlerinin (sarımsak yağı, sarımsak tabletleri ve diğer sarımsak özütleri) kullanımı önemli düzeyde artmıştır. 1983 yılı FAO verilerine göre dünya sarımsak üretimi yaklaşık 5 milyon ton civarında iken 2021 yılında bu rakam 27.3 milyon tonun üzerine çıkmıştır (FAO, 2021). Türkiye sarımsak üretimi ise günümüzde 47 487 ton taze ve 140 460 kuru olmak üzere toplam 187 947 tondur. Sarımsak genel olarak ülkemizin bütün bölgelerinde yetiştirilebilmektedir. Türkiye'de en çok sarımsak üretimi yapılan ilk beş il sırasıyla Gaziantep (62 455 ton), Kastamonu (33 291 ton), Kahramanmaraş (14 233 ton), Aksaray (10 418 ton) ve Tokat (8 006 ton)'tır. Bu beş ilin toplam sarımsak üretimi, Türkiye'nin toplam sarımsak üretiminin yaklaşık %68'ine karşılık gelmektedir. Diğer tüm iller ise kalan %32'lik kısmı oluşturmaktadır (TÜİK, 2022).

Tarımsal olarak üretilen sarımsak genotipleri genellikle çiçek açmamaktadır ancak çiçek açan genotipleri de bulunmaktadır. Bazı genotipler düzenli olarak çiçeklenme gösterirken, bazı genotipler ise hiç çiçeklenme göstermeyip veya nadiren çiçeklenme özelliğine sahiptirler. Sarımsak bitkisinin çiçeğine bakıldığında da genel olarak pembe ve mor tonlarında olduğu görülmektedir (Simon ve diğerleri, 2003). Şemsiye çiçek yapısına sahip sarımsakta diğer *Allium* türlerinden farklı olarak çiçek şemsiyesinde çiçek saplarının arasında küçük dişler gelişir. Çiçek şemsiyesinin gelişmesi sırasında hücrelerin farklılaşması ile ortaya çıkan bu vejetatif dişler, şemsiyedeki çiçeklerin besin maddelerine ortak olarak gelişmelerini kısıtlamakta ve kurumalarına neden olmaktadır (İpek, 2011). Kültürü yapılan sarımsak genotiplerinde tohum üretimi olmadığından sarımsak bitkisinin klonal üretimi, klonların başta virüs olmak üzere hastalık ve zararlılarla bulaşık olmasına, bu patojenlerin taşınmasına ve dolayısıyla verim ve buna ek olarak kalitenin olumsuz

yönde etkilenmesine sebep olmaktadır. Ayrıca dişlerle üretim yapmak, sarımsağın hem depolama hem de üretim maliyetlerini yükseltmektedir. Ülkemizde son yıllarda yapılan sarımsak üretiminde, kullanılan üretim materyalinin nematotla bulaşık olmasından dolayı ekim alanları bu zararlı ile bulaşık hale gelmiştir. Nematotla bulaşık olan bu araziler de sarımsak yetiştiriciliği yapıldığında verim düşmekte ve zararlı daha da yayılmaktadır. Üretim materyali ile taşınan patojenlere karşı yapılabilecek en iyi mücadele yöntemi temiz üretim materyali kullanmaktır. Meristem kültürü kullanılarak elde edilen temiz üretim materyali, vejetatif yolla yapılan sarımsak üretimini daha da maliyetli hale getirmektedir. Bu nedenle sarımsakta tohumla üretim daha pratik ve ekonomik olabilir. Çiçeklenen ve tohum üretimi olan sarımsak genetik kaynaklarından soğan ve pırasa türlerinde olduğu gibi yeterli miktarda tohum üreten çeşitlerin geliştirilmesi sarımsağın daha pratik ve ekonomik olarak yetiştirilmesine olanak sağlayabilir (İpek, 2011).

Son yıllarda sarımsağın anavatanı olarak kabul edilen Orta Asya'da tohum üreten sarımsak tipleri bulunmuş ve bunlar Avrupa, Asya ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki gen bankalarında koruma altına alınmıştır. Bu klonların bulunması sarımsakta ıslah, melezleme ve genetik yöndeki birçok araştırmaya ağırlık verilmesini sağlamıştır (İpek ve diğerleri, 2008).

Melezleme ıslahı ile biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı, kalite ve verimi yüksek yeni sarımsak klonları ve hibrit çeşitlerinin yakın gelecekte geliştirilmesi beklenmektedir. Başka bir *Allium* türü olan ve ekonomik bir değere sahip olan soğanda (*A. cepa* L.) hibrit tohumun başarılı bir şekilde üretilmekte ve kullanılmakta olması bu beklentileri güçlendirmektedir. Ancak sarımsak koleksiyonlarındaki tohum üretimi olan sarımsak genotiplerinde tohum üretimi yeterli düzeyde değildir. Yapılacak ıslah çalışmalarında bu genotiplerden daha güçlü çiçek sapı olan, çiçek sürgününde diş sayısı az veya hiç olmayan, çiçek tozu canlılığı ve tohum üretimi yüksek hatların geliştirilmesi sarımsakta ticari hibrit tohumu üretimine olanak sağlayacaktır.

Sarımsakta çiçeklenme mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Sarımsakta çiçeklenme mekanizmasının tam olarak aydınlatılması sarımsakta çiçeklenme ve tohum üretimi ile ilgili genetik sorunların çözülmesine katkıda bulunabilir. Rotem ve diğerleri (2007) kısmen çiçeklenip tohum üretmeyen ve diğeri normal çiçeklenip tohum üreten iki

farklı sarımsak genotipinde yaptıkları bir çalışmada, düşük sıcaklığın apikal meristemin farklılaşmasını ve çiçek sapı uzamasını teşvik ettiğini fakat çiçek sürgününün morfolojisi üzerine bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada sarımsakta *LEAFY/FLO* benzeri sarımsak *gaLFY* genini araştırmışlardır. Bu genin uzun ve kısa olmak üzere iki farklı mRNA'sının olduğunu ve kısa mRNA'nın her iki sarımsak genotipinin tüm aşamalarında ifade olurken uzun mRNA'nın sadece normal çiçeklenen genotipte çiçeklenme sırasında ifade olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar sarımsakta çiçeklenme yönünden görülen bu farklılığın mRNA olgunlaşması sırasında meydana gelen alternatif modifikasyonların (alternative splicing) etkinliği ile ilişkili olabileceğini ileri sürmektedirler. Bu çalışmada *Arabidopsis* bitkisinde belirlenmiş olan *LEAFY/FLO* geninin homoloğu sarımsakta araştırılmış ancak sarımsakta çiçeklenme ile ilişkili diğer genler için gen ifadesi çalışması yapılmamıştır.

Daha önceden yürütülen TÜBİTAK-TOVAG 1050551 nolu ve "Sarımsakta (*Allium sativum* L.) Gen İfade Profili (mRNA) Analizi ve Çiçeklenmeyi Kontrol Eden Aday Genlerin Belirlenmesi" başlıklı proje kapsamında sarımsağa özgü çiçeklenme ile ilişkili farklı şekilde ifade olan 35 tane aday gene ait "expressed sequence tags" (EST)'ler cDNA-AFLP yöntemi ile ilk kez sarımsakta belirlenmiş, ancak bu EST'lere ait genlerin sarımsakta ifade düzeyleri ve çiçeklenme ile ilişkisi henüz doğrulanmamıştır.

Bu tez önerisinin amacı daha önce çalışması gerçekleştirilmiş olan TÜBİTAK-TOVAG 1050551 nolu ve "Sarımsakta (*Allium sativum* L.) Gen İfade Profili (mRNA) Analizi ve Çiçeklenmeyi Kontrol Eden Aday Genlerin Belirlenmesi" başlıklı proje kapsamında belirlenen ve sarımsak genotiplerinde farklı gelişme dönemlerinde farklı şekilde ifade olan çiçeklenme ile ilişkili bazı aday genlerin ifade düzeyinin qRT-PCR analizi ile belirlenmesi ve karakterize edilmesidir. Tez konusu TÜBİTAK-TOVAG 1190070 nolu proje ile desteklenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Sarımsağın Tüketim Şekilleri

Sarımsağın tüketim şekli taze, yarı-kuru ve kuru şeklindedir. Yeşil sarımsak olarak bilinen taze sarımsak yaprakları yeşil, gövde ve baş kısmının taze olarak karşımıza çıktığı, dişlerinin ise tam olgunluğa ermediği sarımsaktır. Diğer gruplar ise gövde ve başın tam olarak kurumadığı yarı-kuru sarımsak ve gövde ile başı oluşturan kabukların tamamen kuruduğu kuru sarımsaktır. Ülkemizin bazı bölgelerinde (Akdeniz, Marmara ve Güneydoğu Anadolu) kuru sarımsak üretimi yanında taze sarımsak üretimi de yapılmakta olup, baş henüz olgunlaşma evresine gelmeden hasat edilmektedir. Depolarda kuru sarımsağın bittiği döneme gelen Nisan-Mayıs aylarında hasat edilen taze sarımsaklar kuru sarımsak kadar yüksek getiri sağlamaktadır. Ülkemizde Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesinde yemek ve salata gibi ürünlerde değerlendirilen taze sarımsak, daha çok Akdeniz diyetlerinde kullanılmaktadır.

Ülkemizde kuru sarımsak hasattan sonra çoğunlukla adi depolarda depolanmaktadır. Ancak, kuru sarımsak başların muhafazası sırasında hastalık ve zararlıların gelişmemesi için 13-18 °C sıcaklık ve %40 ila 60 oransal nem içeren koşullarda depolanması önerilmektedir (Madhu ve diğerleri, 2019). Taze sarımsak ise 0-2 °C sıcaklıkta ve %95-100 bağıl nemde 3-4 hafta saklanabilmektedir (Akan ve diğerleri, 2019).

2.2. Sarımsağın Sağlık Yönünden Faydaları

Sarımsak allisin, flavonoid, ajoen, asidik bileşikler, alliin ve dialil sülfat gibi birden fazla kükürtlü bileşik içerir. Bu bileşikler sarımsağın tıbbi fonksiyonunu da açıklamaktadır. Bu bileşiklerin oranları genotipe, ürünün tarlada ve depolama esnasında maruz kaldığı ortama göre değişiklik göstermektedir (Akan ve diğerleri, 2019).

Sarımsak, içerisinde bulunan 200'den fazla kimyasal madde ile insan vücudunu çok çeşitli hastalıklardan koruma özelliğine sahiptir. Sarımsağın karaciğeri koruma, kan şekerini, kolesterolü ve kan basıncını düşürme, virus, mantar ve bakterileri öldürme ve anti-kanserojen bileşikler oluşturma gibi birçok faydalı özellikleri vardır. Sarımsağın çiğ olarak tüketilmesinin daha yararlı olduğu söylene de; bazı araştırmacılar, pişmiş sarımsağın ve fermente edilmiş siyah sarımsak ve yağlarının bazı durumlarda daha etkili olduğunu öne sürmektedir (Erol ve Alpsoy, 2007). Gerçekleştiren çalışmalarda sarımsağın yüksek kolestrol, yüksek kan basıncı ve trigliserit seviyelerini azaltarak kalp hastalıklarına karşı koruduğu bulunmuştur. Ayrıca araştırmalar, sarımsağın LDL kolesterol sentezini inhibe ederek ve kandaki faydalı HDL kolesterol miktarını arttırarak toplam kan kolesterolünü düşürdüğünü göstermiştir. Laboratuvar fareleri üzerinde yapılan çalışmalarda, sarımsak katkılı diyetlerle beslenen farelerden alınan örneklerde lipit içeriğinin daha az olduğu ve karaciğer değerlerinde kolesterol ve trigliserit düzeylerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sarımsak tüketimi artıkça kolesterolün daha çok düştüğü ve sarımsak tüketimi ile kardiyovasküler hastalıklar arasında ters orantı olduğu bildirilmektedir (Erol ve Alpsoy, 2007).

2.3. Sarımsağın Morfolojik ve Çiçek Özellikleri

Sarımsakta bitki, yaprak, baş ve diş özellikleri yönünden klonlar arasında geniş bir farklılık bulunmaktadır. Nitekim Tokat sarımsağın morfolojik ve moleküler olarak incelemesinin yapıldığı bir çalışmada, selekte edilen 22 lokal Tokat sarımsağı genotipinde yaprak boyu 42-50 cm, yaprak genişliği 19-33 mm, yaprak sayısı 10-17 adet, bitki boyu 64-76 cm, baş ağırlığı 17-42 g, diş sayısı 10-17 adet ve diş ağırlığı 1-4 g olarak ölçülmüştür (Geboloğlu ve diğerleri, 2017).

Sarımsak baş bağlama ve çiçeklenme yönünden uzun gün bitkisi olup ılıman ve subtropik iklim kuşaklarında sorunsuz yetişir. Optimum gelişme sıcaklığı 15-25°C ve nem %60-80

civarındadır (Vural ve diğeri, 2000). Sıcaklık 25 °C'yi geçtiğinde ise gelişme yavaşlar ve baş oluşumu olumsuz yönde etkilenir. Kısa gün koşullarında vejetatif aksam gelişimi artar ve baş oluşumu geç olur.

Sarımsak klonları çiçeklenme özelliğine göre genel olarak iki grup altında incelenmektedir: “çiçek sapı üretenler” (bolting/hardneck) ve “çiçek sapı üretmeyenler” (non-bolting/softneck). Çiçek sapı üreten sarımsak klonları, (sapa kalkan/düzenli çiçeklenen) uygun ekolojik koşullar sağlandığında güçlü bir çiçek sapı oluşturmaktadır. Çiçeklenme için üretim materyali olan dişlerin belli bir süre soğuklama ihtiyacının karşılanması gerekir. Gerekli iklim koşulları sağlandığında dişten gelişen bitkilerde aynı yıl içinde çiçeklenme görülür. Tohumdan gelişen bitkilerde ise genelde ilk yıl baş gelişimi ve ikinci yıl ise çiçek gelişimi görülür. Dikimin geç yapıldığı ve soğuklama ihtiyacının karşılanmadığı durumlarda çiçeklenme görülmemekte veya zayıf bir çiçek sapı gelişimi olmaktadır. Çiçek sapı oluşturmayan sarımsak klonlarında (sapa kalkmayan/çiçeklenmeyen) ise ekolojik koşullar sağlansa bile genelde çiçeklenme görülmemekte veya nadiren görülmektedir (İpek, 2011).

Çiçeklenen genotiplerde her bitki bir tane çiçek sapı ve çiçek sürgünü meydana getirir. Sarımsakta çiçek sürgünü diğer *Allium* türlerinde olduğu gibi şemsiye çiçek yapısındadır. Başlangıçta çiçek sürgünündeki çiçekler bir zar içindedir. Çiçeklenmenin ilerlemesiyle bu zar yırtılarak çiçekler görülür. Çiçek sapı üzerinde genotipe bağlı olarak 1-300 tane çiçek meydana gelebilir. Bir çiçekte altı adet çanak yaprak, altı adet taç yaprak, altı adet erkek organ ve üç karpelli bir adet diş organı bulunur. Çiçekler pembe veya açık mor renklidir. Çiçeklerde yabancı dölleme hâkimdir ve dölleme arı, sinek ve diğer böceklerle gerçekleşmektedir. Çiçek şemsiyesinde, daha önce bahsettiğimiz gibi, diğer *Allium* türlerinden farklı olarak çiçeklerin arasında vejetatif küçük dişler meydana gelmektedir. Çiçek şemsiyesinin gelişmesi sırasında çiçek taslakları arasındaki bazı hücreler çiçek taslakları yerine vejetatif dişlere farklılaşmaktadır. Gelişen bu dişlerin sayısı ve büyüklüğü yönünden genotipler arasında büyük farklılıklar vardır. Çiçek şemsiyesinde meydana gelen bu dişler çiçeklerin besin maddelerine ortak olarak onların gelişmesini engellemekte ve sarımsakta meydana gelen kısırılık nedenlerinden biri olarak düşünülmektedir. Nitekim bu dişlerin çiçek sürgünü gelişiminin ilk aşamalarında uzaklaştırılmasıyla bazı sarımsak genotiplerinde tohum üretiminin arttığı görülmüştür

(İpek, 2011). Bu çiçeklenen klonlar içinde tohum üretimi açısından da geniş bir çeşitlilik bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar üçüncü bir grubu sınıflandırmaya dâhil etmektedir (Takagi, 1990). Düzenli olarak çiçeklenmemesi ve ekolojik koşullara bağlı olarak klon içinde çiçek sapı üretimi ve çiçek sapı uzunluğunda bir varyasyon göstermesi nedeniyle bu üçüncü gruptaki klonlar “kısmen çiçeklenen” klonlar olarak tanımlanmıştır. Morfolojik olarak “kısmen çiçeklenen” klonları bazen düzenli çiçek sapı üreten klonlardan ayırt etmek mümkün olamamaktadır. Ancak moleküler markırlar kullanılarak genetik olarak birbirlerinden kolayca ayırt edilmekte ve genetik olarak çiçeklenmeyen klonlara daha yakın olduğu görülmektedir (İpek ve diğerleri, 2003).

Bazı çiçeklenen genotiplerde morfolojik olarak çiçekler tam gelişmesine rağmen tohum üretimi ya çok düşük düzeyde (1-50 adet) veya hiç bulunmamaktadır. Çiçekler incelendiğinde anterlerde mikrosprogenesesin gerçekleştiği ancak mikrosporların tetrat aşamasında veya daha sonraki aşamalarda dejenere oldukları görülmektedir (Simon ve diğerleri, 2003). Çiçeklerde oluşan vegetatif dişlerin sarımsakta görülen kısırlığın sonucumu yoksa kısırlığın bir sebebimi olduğu konusunda kesin bir görüş bulunmamaktadır. Bazı genotiplerde çiçeklenme sırasında bu dişlerin uzaklaştırılması ile tohum üretimi artarken bazılarında tohum miktarına etkisinin olmadığı belirtilmiştir (İpek, 2011).

2.4. Bitkilerde ve Sarımsakta Çiçeklenme Mekanizması

Bitkilerde çiçeklenme göz önüne alındığında sıcaklık ve ışık olmak üzere iki temel faktör karşımıza çıkmaktadır. Öncelikli olarak bitkilerde sıcaklığı incelediğimizde düşük sıcaklıklar ve yüksek sıcaklıklar olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Düşük sıcaklıklar bitkilerde vernalizasyon dediğimiz olayı meydana getirir. Vernalizasyon geçiren bitkilerin çiçeklenme mekanizmasında *FLC* (FLOWERING LOCUS C) geni aktive olur. Böylece bitkiler soğuklama ihtiyacını karşılayarak çiçeklenmesi mümkün olur. Yüksek sıcaklıklarda ise bitkilerin çiçeklenme mekanizmasında bir değişiklik meydana gelmez. Bu nedenle soğuklama ihtiyacını karşılamamış bitkiler çiçek açamazlar (Licolin ve Eduardo, 2008).

Işığın etkisine baktığımızda ise gördüğümüz olay bitkiler arasında çok farklılık olduğu ve bitkiden bitkiye ışık ihtiyacının değiştiğidir. Ayrıca ışığın dalga boyu da bitkiler arasında

farklı boyutlarda emilerek bir çeşitlilik ortaya koymaktadır. Bu olaya fotoperiyodizm de denir. Bitkiler ışıklanma ihtiyacına göre kendi aralarında uzun ve kısa gün bitkileri olarak ikiye ayrılmaktadır. Uzun gün bitkilerinde ışık kaynağı optimum seviyede olduğunda ve yeterli süreyi yakaladığında, bitki bünyesinde *FT* (FLOWERING LOCUS T) enzimi sentezlenir. Bunun sonucu olarak ta bitkide çiçeklenme gözlenir. Kısa gün bitkilerinde ise durum biraz farklıdır. Uzun gün bitkilerinin aksine karanlıkta bahsedilen *FT* geni aktif hale gelir. Bunun için ise karanlık süresinin de optimum seviyeye ulaşması lazımdır (Licolin ve Eduardo, 2008).

Sarımsakta çiçeklenme mekanizmasının aydınlatılması konusunda yapılan çalışmalarda çiçeklenmede ilk önemli aşamanın apikal meristemin vegetatif meristemden generatif meristeme dönüşmesi olduğu belirtilmektedir (Ben Michael ve diğerleri, 2020). Bu aşamada çiçeklenmeyi teşvik eden genlerin ifadeleri artarken çiçeklenmeyi baskılayan genlerin ifadesi azalmaktadır. Bu genlerden *APETALA1* (AP1), *LEAFY* (LFY), ve *CAULIFLOWER* (CAL) genlerin homologları sarımsakta meristem belirleyici genler olarak karakterize edilmiş ve bu genlerin sarımsakta nasıl düzenlendiği belirlenmiştir (Shemesh-Mayer ve diğerleri, 2022). Apikal meristemin generatif faza dönüşmesinden sonra hücrelerin çiçeklere farklılaşması ve çiçek sapı uzaması gerçekleşmektedir. Ancak bunun için bir karbonhidrat enerjisine ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Chaturvedi ve diğerleri, 2018)

Rotem ve diğerleri (2007), birisi kısmen çiçeklenip tohum üretmeyen ve diğeri normal çiçeklenip tohum üreten iki farklı sarımsak genotipinde yaptıkları bir araştırmada düşük sıcaklığın apikal meristemin farklılaşmasını ve çiçek sapı uzamasını teşvik ettiğini fakat çiçek sürgününün morfolojisi üzerine bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı araştırmada sarımsakta *LEAFY/FLO* benzeri sarımsak *gaLFY* genini karakterize etmişlerdir. Bu genin uzun ve kısa olmak üzere iki farklı mRNA'sını olduğunu ve kısa mRNA'nın her iki sarımsak genotipinin tüm aşamalarında ifade olurken uzun mRNA'nın sadece normal çiçeklenen genotipte çiçeklenme sırasında ifade olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar sarımsakta çiçeklenme yönünden görülen bu farklılığın mRNA olgunlaşması sırasında meydana gelen alternatif modifikasyonların (alternative splicing) etkinliği ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Sarımsakta vernalizasyon ve fotoperiyodun çiçeklenme üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 4 °C’de uzun süre karanlıkta vernalizasyonun sarımsakta farklı moleküler mekanizmaları tetikleyerek apikal meristemin generatif meristeme dönüşmesini teşvik ettiği ve baş gelişmesini sağladığı belirlenmiştir. Biyolojik saatin apikal meristemin vegetatif aşamadan generatif aşamaya geçişte temel görev yaptığı ve düşük sıcaklık sinyallerini algılayıp vernalizasyon, fotoperiyod ve meristem dönüşümü ile ilişkili genlerin ifade olmasını sağladığı ileri sürülmektedir. Fotoperiyod yolağın ise daha ileriki aşamalarda aynı reseptörlerin aracılığıyla devreye girdiği düşünülmektedir (Ben Michael ve diğerleri, 2020).

Shemesh-Mayer ve diğerleri (2022), sarımsakta çiçeklenme mekanizmasını genomik ve transkriptomik verilerin karşılaştırılması ile aydınlatmaya çalışmışlardır. Genom analizlerinde “*phosphatidylethanolamine-binding proteins*” (PEBP) ve *LEAFY* (LFY) genleri belirlenirken transkriptom verilerinde bu genlerin bulunmadığı belirtilmektedir. Ayrıca *TERMINAL FLOWER1* (TFL) benzeri genlerin fonksiyonlarının azaldığı ve bunların yerini *FT*-benzeri genlerin aldığı ancak *MOTHER OF FT AND TFL1* (MFT) benzeri homologların bulunmadığı tespit edilmiştir. Sarımsak genomunda *LFY* benzeri üç gen belirlenmiş ve *LFY* benzeri genlerin “alternative splicing” olayı ile çiçeklenmeyi kontrol ettiği ileri sürülmektedir. Ancak *AsLFY1* geninin çiçeklenmede görev alan temel transkripsiyon faktörü mü yoksa *AsLFY2* genin de mi bu görevi yaptığı tam açık bir şekilde belirlenmemiştir. Sonuç olarak, sarımsak çeşitlerinde kısırılığın bazı spesifik genlerin transkripsiyon fonksiyonlarının bu çeşitlerde kaybetmesinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler.

Sarımsakta çiçeklenmeyi kontrol eden genler başka bir çalışmada cDNA-AFLP tekniği kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Bir TÜBİTAK projesi kapsamında yapılan bu çalışmada sarımsakta çiçeklenme ile ilişkili 39 aday gen belirlenmiştir (İpek, 2011). Belirlenen bu genler çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinde farklı şekilde ifade olmuştur. Ancak genlerin ifade düzeyi bu proje kapsamında ortaya çıkarılmamış ve çiçeklenme ile ilişkili olup olmadığı doğrulanmamıştır. Bu yüksek lisans tezinde TÜBİTAK-TOVAG-1050551 nolu proje araştırması kapsamında belirlenen bu aday genlerden bazılarının ifade düzeylerini çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinin farklı gelişme dönemlerinde belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.5. qRT-PCR ve Referans Genler (“Housekeeping” Genler)

Gen ifadesi, hücre içerisindeki genetik bilginin mRNA'ya ve daha sonra da proteine aktarılmasıyla hücre içinde fonksiyonel hale getirilmesi olayıdır (Koçat, 2016). Bitkilerde genlerin ifade düzeyinin belirlenmesinde de çeşitli analiz yaklaşımları ve teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; hibridizasyon temelli, dizileme temelli, PCR temelli ve kombine yöntemler olarak çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde PCR temelli olan uygulamalar daha avantajlı olmaktadır. PCR temelli yöntemler içerisinde de qRT-PCR kullanılarak gen ifadesinin belirlenmesi diğerlerine göre daha kısa süreli ve direk sonuç odaklı olarak belirlenebilmektedir. Bu yöntemin genel araştırma prensibi, mRNA'dan ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA'nın, florokrom prob veya sybergreen varlığında araştırılan gene özgü primerler kullanılarak RT-PCR cihazı ile amplifiye edilmesi ve ortaya çıkan sinyalin qRT-PCR işlemi sırasında ölçülmesidir. Bundan dolayı bu yöntemin gen ifadesinin belirlenmesinde kullanılması diğer yöntemlerine göre daha avantajlıdır (Kömürcü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna, 2011).

qRT-PCR çalışmalarında bir genin ifade düzeyi, çalışılan canlı türünün tüm gelişme aşamalarında ve hücrelerinde sabit ifadesi olan bir referans genle (housekeeping gene) karşılaştırmalı olarak (normalizasyon) hesaplanmaktadır. qRT-PCR analizlerinin sonuçlarının doğruluğu için stabil referans genlerin belirlenmesi ve seçimi önemlidir. Uygun referans genlerin kullanılması, RNA kalitesinden ve transkripsiyon esnasında oluşacak farklılıklardan kaynaklanan sorunları azaltabilir. İdeal referans genler, RNA içeriğindeki ve ters transkripsiyon etkinliğindeki çeşitliliklerden kaynaklanan farklılıkları azaltmak için kullanılabilir.

İdeal referans genler şu koşulları sağlamalıdır; farklı hücre tiplerinde, organlarında ve safhalarında ifadeleri stabil olmalı, ekspresyon endojen faktörlerden etkilenmemeli, çeşitli biyotik veya abiyotik stres gibi dışsal faktörler dahil olsa da ekspresyon seviyeleri aynı düzeyde olmalıdır. Ekspresyon ifadesini değiştirmeyen temel genler genellikle referans gen olarak kullanılır. Ancak, yakın zamanda yapılan araştırmalar bu genlerin belirli sınırları ve kusurları olduğunu göstermiştir. Bazı temel genlerin ifadesi, farklı genotiplere sahip tüm örneklerde sürekli değildir. Bu nedenle, referans genlerin kullanılmasından önce stabilitesi doğrulanmalıdır. Araştırmacılar, *Arabidopsis*, çeltik,

buğday, patates, pamuk, soya fasulyesi, palmiye ve çin lahanası gibi çeşitli türlerde aday referans genlerinin stabilitesini doğrulamışlardır (Liu ve diğerleri, 2015).

Evrensel referans genlerin eksikliği temel olarak iki faktörden kaynaklanmaktadır. İlk olarak, bir türdeki kararlı bir referans geni diğer türlerde uygun olmayabilir. Örneğin, *GAPDH* farklı kültür ortamlarında yetiştirilen üzümde stabil olarak ifade edilir, ancak buğdayda kararsızdır ve *ACT* farklı domates dokuları içinde kararlı bir şekilde ifade edilirken buğdayda kararsızdır. İkincisi, referans genlerin farklı deney koşulları altında farklı ifade olmasıdır. Spesifik olan veya olmayan her türün belirli referans genlere sahip olduğu bilinmektedir (Liu ve diğerleri, 2015).

Sarımsaktaki gen ifadesi ile ilgili yapılan çalışmalarda genelde “actin” referans gen olarak kullanılmıştır (Erşahin, 2020; Koççat, 2016). Ayrıca tuz stresi altındaki sarımsak bitkilerinde yapılan qRT-PCR analizinde en uygun referans geni belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada “*TAP42-interacting protein (TIP41)*”, “*eukaryotic translation initiation factor 4a (eIF-4a)*”, “*actin (ACTIN)*”, “*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*”, “*tubulin β -7 (TUB7)*”, “*elongation factor 1 alpha (EF-1 α)*”, “*protein phosphatase 2A (PP2A)*” ve “*SAND family protein (SAND)*” genleri test edilmiştir. Test edilen tüm genlerin tuz stresi altında sarımsakta değişken ifadeler gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte sarımsak kök ve yapraklarında en iyi sonucun *actin* geninden elde edildiği, diğerde ise *actin* ve *SAND* genlerinin en stabil ifadeyi gösterdiği belirlenmiştir (Wang ve diğerleri, 2019). Bu nedenlerle bu tez çalışmasında *actin* geni referans gen olarak seçilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez araştırması 2019-2020 yıllarında Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Bu tez araştırmasında sarımsakta çiçeklenme ile ilişkili aday genlerin gen ifade düzeyinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG-119O070 nolu projenin bir parçasıdır.

3.1. Bitki Materyali

Araştırmada bitki materyali olarak Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ndeki sarımsak koleksiyonunda muhafaza edilen 4 sarımsak klonu kullanılmıştır. Bu klonlardan iki tanesi (G2 ve G3 kodlu genotipler) uygun çevre koşullarında çiçeklenirken 2 klon (G4 ve G5 kodlu genotipler) aynı çevre koşullarında çiçeklenmemektedir. Sarımsak genotiplerinin yetiştiriciliği Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazisinde yapılmıştır. Genotiplerin ekimi 2019 yılının kasım ayında yapılmıştır. Ayrıca depolama sıcaklığının çiçeklenme ilişkili genlerin ifadeleri üzerine etkisini belirlemek için sarımsak genotiplerinin dışları 4 °C ve 21 °C'de olmak üzere iki farklı sıcaklıkta 12 hafta süre ile depolanmıştır. Genotiplerin her birinden başların depolanma denemesi öncesinde, 4 °C ve 21 °C'de yapılan depolama denemesi sonrasında ve yetiştirme dönemi içerisinde 2-3 yaprak, 4-5 yaprak, 6 yaprak ve 7-8 yaprak aşamalarında örnekler alınmıştır. Depolama öncesi ve sonrasında başlardaki örneklemeler, meristemi içeren sürgün taslaklarının dış ortasından bistüri ile izole edilmesi şeklinde yapılmıştır. Yetiştirme döneminde ise her yaprak gelişme aşamasında sökülen bitkilerden en genç yaprak ve uç meristeminin bulunduğu dokular (genel olarak meristem olarak belirtilmiştir), ve çiçeklenen genotiplerde 7-8 yaprak aşamasında çiçek sürgünü örneklenmiştir. Alınan tüm örnekler -85 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Tüm örneklemeler üç biyolojik tekrür olacak şekilde yapılmıştır.

3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için -85°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilen örnekler hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde havanda ezilmiştir. RNA izolasyonunda NucleoSpin RNA Plant Mini Kit (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılmıştır. Kit içerisinde gelen protokolda yer alan adımlar takip edilerek toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzolasyonu tamamlanan örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüpler içerisinde -85 °C'lik dondurucuda saklanmıştır.

RNA izolasyonunda kullanılan adımlar;

- 1) Bitki materyali 100 mg olacak şekilde sıvı azot içerisinde havanda öğütülmüştür.
- 2) 1,5 ml'lik tüpler her bir tüpte 35 µl RA1 veya RAP solüsyonu ile 3,5 µl mercaptoethanol olacak şekilde hazırlanmıştır.
- 3) Öğütülen örnekten içerisinde solüsyon hazırlanmış tüplere 100 mg konulmuş ve iyice homojen olana kadar vortekslenmiştir.
- 4) Kitin içerisinden çıkan mor tüplerdeki kolonların üzerine örnekler transfer edildikten sonra 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 5) Santrifüj edilen örneklerin sıvı kısmı 1,5 ml'lik tüplere aktarılmış ve üzerine 350 µl %70'lik etil alkol eklenmiştir.
- 6) Homojen olana kadar pipetle karıştırdıktan sonra kitin içerisinden çıkan mavi tüplerdeki kolonların üzerine aktarılmış ve 11000 g de 30 sn santrifüj edilmiş ve alta geçen sıvı kısım dökülmüştür.
- 7) Her kolonlu tüpe 350 µl MDB çözeltisi konulmuş ve 11000 g de 1dk santrifüj edilmiştir.
- 8) DNase karışımı her bir örnek için 10 µl DNase ve 90 µl tampon çözelti olacak şekilde hazırlanmış ve kolonlu tüplerde bulunan her bir örneğe 95 µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
- 9) Tüm tüplere solüsyon dağıtıldıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 10) 200 µl RAW2 solüsyonu eklendikten sonra 11000 g' de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- 11) Kolondaki RNA örneklerinin üzerine RA3 solüsyonundan 600 ml konulduktan sonra 11000 g de 30 sn santrifüj edilmiştir.
- 12) 250 µl RA3 solüsyonu ile tekrar yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 11000 g de 2 dk santrifüj edilmiştir.
- 13) Santrifüj bittikten sonra tüpün kapakları açık şekilde etil alkolün uçması için 1-2 dakika beklenmiştir.
- 14) 70 µl RNase içermeyen su eklenip 1-2 dk bekledikten sonra 11000 g de 1 dk santrifüj edilmiş ve RNA örnekleri -85 °C'lik derin dondurucuda analiz edilmek üzere saklanmıştır.

3.3. RNA Miktarı Belirleme

RNA miktarları Qubit RNA BR Assay kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

Bunun için;

- 1) 199 tampon çözelti ve 1 ml RNA boyası ile karışım hazırlanmış, vorteksle karıştırılmış ve 2 dakika beklenmiştir.
- 2) Her örnek için 0,5 ml'lik Thinwall ependorf tüplere (Axygen, ABD) 197 µl hazırlanmış karışım ve 3 µl RNA örneği koyup vorteksle kısaca karıştırılmıştır.
- 3) 2 dk bekledikten sonra Qubit Fluorometer cihazında (Invitrogen, ABD) okumalar gerçekleştirilmiştir.

3.4. cDNA sentezi

cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kiti (Bio-Rad) ve kit protokolü kullanılarak yapılmıştır. Bunun için;

- 1) RNA'ların bulunduğu tüpler buz içerisinde tutularak RNA'ların çözünmesi sağlanmıştır.
- 2) Kitin içerisinden çıkan reaksiyon mix, reverse transkriptaz ve su buzun içerisinde çözdürülmüştür.
- 3) Her RNA örneği için RNA konsantrasyonu 800 ng/ml'ye göre hesaplanmıştır.
- 4) Her bir örnek için kitede bulunan Reaction mix'den 4 µl ve Reverse Transkriptaz'dan 1 µl olacak şekilde karışım hazırlanıp 5 µl PCR plate kuyucuklarına dağıtılmıştır.
- 5) Her bir örneğe hesaplanan RNA miktarını ve karışımı 20 µl'yi tamamlayacak şekilde nuclease-free su miktarı hesaplanıp eklenmiştir.
- 6) cDNA sentezi PCR cihazının programı; 25 °C'de 4 dk, 46 °C'de 20dk, 95 °C 1 dk, 4 °C ∞ olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Reverz-transkripsiyon reaksiyonları DNase veya RNase enzimi içermeyen su ile 20 kat seyreltildikten sonra buza yerleştirilmiştir ve gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizi ile devam edilmiştir.

3.5. Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonları (qRT-PCR) referans olarak *actin* geni (gi|56159166|gb|AY821677.1) ve daha önceki TÜBİTAK-TOVAG 1050551 numaralı proje kapsamında belirlenen XTG_MCG_13, XCT_MGT_7, XCT_MGC_6, XCT_MGC_10 kodlu cDNA-AFLP bantlarının dizilerinden Primer3 programı ile geliştirilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Analiz için GoTaq® qPCR ve RT-qPCR Systems kiti (Promega, ABD) kullanılmıştır. Her primer kombinasyonu için ayrı olarak hazırlanan SYBR Green karışımı her bir örnek için; 5 µl Mastermix, 0,5 µl primer ileri, 0,5 µl primer geri, 0,1 µl DYE ve 1 µl ultra saf su kullanarak hazırlanmış ve 3 µl cDNA bulunan PCR platteki her bir kuyucuğa 7 µl karışımdan dağıtılmıştır. qRT-PCR reaksiyonları LightCycler® 480 II (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. LightCycler® 480 RT-PCR cihazında qRT-PCR döngüleri 95 °C’de 3 dakika 1 döngü inkübasyon; 95 °C’de 10 sn, 60 °C’de 10 sn, 72 °C’de 20 sn 45 döngü amplifikasyon; 95 °C’de 1 sn, 60 °C’de 1 sn erime noktası ve 40 °C’de 30 sn soğutma olacak şekilde yapılacaktır.

3.6. qRT-PCR Sonuçlarının Analizi

qRT-PCR reaksiyon sonuçlarının analizi için PCR platteki örnek ve primer sırası cihazda tanımlanmıştır. Daha sonra analiz bölümünden “Advanced Relative Quantification” seçeneği seçilerek tanımlatılmış olan örnek ve primer yerleri verilerini kullanarak yüksek duyarlılıkta (High Sensitivity), birebir (one to one) seçenekleri ile karşılaştırma yapılmıştır. Hesaplama seçeneği ile her bir örneğin CT değerleri (threshold cycle, eşik döngü değeri) ve $\Delta\Delta CT$ metoduna göre hesaplanmış normalleştirme değerleri elde edilmiştir.

LightCycler 480 II cihazının kullandığı $\Delta\Delta CT$ metodu formülü;

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

Çizelge 3. 1. Primer dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Tm (°C)
XCT_MGT_7_F	TGTACGAAGTGGGCTTTCCGA	65
XCT_MGT_7_R	AAGGTTGAGGTAGCACCGACA	65
XCT_MGC_6_F	TCTTCGTGAAGGACTGAAGC	61
XCT_MGC_6_R	CCTGCTTGAACCTGATTAAGC	61
XTG_MGA_10_F	GTACGTTCTTTGGTGGTGGC	63
XTG_MGA_10_R	TCTCTCCAGACCTTAAGAGAACC	63
XTG_MCG_13_F	GGACCAGCACCAGAGAGAATC	64
XTG_MCG_13_F	GTGACGCTGCAGTGAACAAAG	64
Actin-F	AATTGTGAGCAACTGGGATGAC	63
Actin-R	CCTGGATAGCAACATACATGGC	63

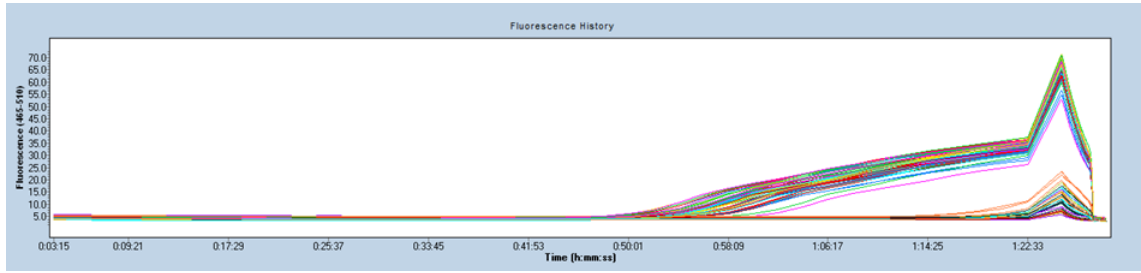
3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizleri için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. Örnekleme dönemleri arasındaki farklılık Duncan testi ile $p < 0.05$ önem düzeyinde belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR)

Gerçek zamanlı PCR analizinde zamana karşı floresan ışığın yoğunluğunda oluşan değişimi gösteren örnek eğriler Şekil 4.1 verilmektedir. G4 genotipinin depolama öncesi, 4 °C’de depolama sonrası, 21 °C depolama sonrası, 2-3 yaprak, 4-5 yaprak, 6 yaprak ve 7-8 yaprak gelişme aşamalarına ait örneklerinde *actin* genine karşı olan reaksiyonlardaki eğriler bu genotipteki göreceli gen ifadesinde değişim olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 1. G4 genotipine ait olan dönemlerin örneklerinin *actin* genine karşı olan reaksiyonlarının eğrisi.

qRT-PCR analizinde G2, G3, G4 ve G5 kodlu sarımsak genotiplerinin farklı örnekleme zamanlarındaki cDNA-AFLP EST genlerinin göreceli gen ifade düzeyleri Çizelge 4.1.’de verilmektedir.

Çizelge 4.1.’de G2 çiçeklenen sarımsak genotipi verilerine bakıldığında XTG_MCG_13 genin yaprak örneklerindeki göreceli gen ifade düzeyi; 2-3 yaprak aşamasında en yüksek iken (164,61) daha sonraki yaprak aşamalarında azalan bir gen ifadesi göstererek 7-8 yaprak aşamasında en düşük düzeyde (18,98) gerçekleşmiştir. Aynı genotipinin meristem örneklerine bakıldığında gen ifadesinin depolama örneklerinde ve gelişme dönemi örneklerinde, yaprak örneklerine göre çok düşük düzeyde gerçekleşmiş ve istatistiksel olarak tüm aşamalardaki meristem örnekleri arasında bir fark olmamıştır.

G2 genotipinde XCT_MGT_7 genin ifade düzeyi 2-3 yaprak, 4-5 yaprak ve 7-8 yaprak aşamalarındaki yaprak örneklerinde en yüksek belirlenmiştir. 6 yaprak aşamasında ise 2-3 yaprak, 4-5 yaprak ve 7-8 yaprak aşamalarına göre daha düşük gerçekleşmiştir. 7-8 yaprak çiçek sürgünü, 6 yaprak meristem, 4-5 yaprak meristem, 2-3 yaprak meristem,

Çizelge 4.1. Gerçek zamanlı PCR analizinde çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinin farklı gelişme dönemlerinde cDNA-AFLP EST genlerinin göreceli gen ifade düzeyleri.

Genotip	Gelişme Dönemi*	cDNA-AFLP EST Genleri			
		XTG-MCG-13	XCT-MGT-7	XCT-MGC-6	XTG-MGA-10
G2	DÖ (Meristem)	0,40±0,02 ^d	0,01±0,00 ^c	0,03±0,00 ^d	0,95±0,36 ^b
	DS-4°C (Meristem)	0,47±0,14 ^d	0,01±0,00 ^c	0,01±0,00 ^d	1,08±0,26 ^b
	DS-21°C (Meristem)	0,36±0,06 ^d	0,06±0,01 ^c	0,02±0,00 ^d	1,75±0,28 ^a
	2-3 Yaprak	164,61±28,6 ^a	2,72±0,41 ^a	28,07±1,68 ^b	0,66±0,11 ^b ^c
	2-3 Yaprak (Meristem)	0,96±0,15 ^d	0,02±0,00 ^c	0,26±0,19 ^d	1,79±0,06 ^a
	4-5 Yaprak	29,55±4,36 ^c	2,47±0,43 ^a	17,69±1,04 ^c	0,90±0,07 ^b
	4-5 Yaprak (Meristem)	0,13±0,02 ^d	0,04±0,01 ^c	0,01±0,00 ^d	0,39±0,10 ^{de}
	6 Yaprak	116,76±1,4 ^b	1,54±0,02 ^b	50,42±12,9 ^a	0,42±0,27 ^{cd}
	6 Yaprak (Meristem)	0,47±0,08 ^d	0,05±0,03 ^c	0,00±0,00 ^d	0,08±0,00 ^e
	7-8 Yaprak	18,98±0,04 ^d	2,41±0,11 ^a	52,02±4,22 ^a	0,65±0,01 ^{bc}
7-8 Yaprak (ÇS)	0,59±0,04 ^d	0,02±0,00 ^c	0,74±0,10 ^d	0,62±0,43 ^{bc}	
G3	DÖ (Meristem)	0,47±0,07 ^c	0,04±0,00 ^c	1,76±0,31 ^c	1,31±0,48 ^c
	DS-4°C (Meristem)	0,63±0,15 ^c	0,05±0,05 ^c	3,50±0,30 ^a	1,57±0,52 ^{bc}
	2-3 Yaprak	259,85±45 ^a	2,22±0,34 ^a	1,46±0,09 ^c	2,27±0,54 ^{ab}
	4-5 Yaprak	44,46±7,58 ^b	1,91±0,08 ^a	2,08±0,40 ^b ^c	1,48±0,14 ^{bc}
	6 Yaprak	24,82±5,91 ^{bc}	2,15±0,40 ^a	2,06±0,46 ^b ^c	1,78±0,55 ^{bc}
	7-8 Yaprak	14,99±0,03 ^{bc}	1,30±0,07 ^b	1,58±0,33 ^c	1,41±0,39 ^{bc}
7-8 Yaprak (ÇS)	53,32±0,17 ^b	1,34±0,10 ^b	2,39±0,25 ^b	2,87±0,27 ^a	
G4	DÖ (Meristem)	0,44±0,05 ^d	0,02±0,01	1,00±0,02 ^{de}	1,28±0,11 ^c
	DS-4°C (Meristem)	0,37±0,07 ^d	0,02±0,02	8,10±0,05 ^a	7,02±0,88 ^a
	DS-21°C (Meristem)	0,40±0,01 ^d	0,00±0,00	3,18±0,07 ^c	2,08±0,13 ^b
	2-3 Yaprak	24,04±4,23 ^a	0,01±0,01	1,23±0,17 ^d	0,95±0,12 ^c
	2-3 Yaprak (Meristem)	0,13±0,01 ^d	0,00±0,00	3,16±0,11 ^c	0,86±0,16 ^c
	4-5 Yaprak	17,79±1,07 ^b	0,01±0,01	0,81±0,06 ^e	1,02±0,11 ^c
	6 Yaprak	5,82±0,40 ^c	0,01±0,00	1,26±0,18 ^d	0,74±0,07 ^c
	6 Yaprak (Meristem)	0,06±0,00 ^d	0,00±0,00	4,20±0,07 ^b	1,17±0,21 ^c
G5	DÖ (Meristem)	0,23±0,067 ^c	0,00±0,00 ^d	3,85±0,38 ^b	1,33±0,29 ^a
	DS-4°C (Meristem)	0,21±0,02 ^c	0,00±0,01 ^d	6,45±0,12 ^a	1,22±0,09 ^{ab}
	2-3 Yaprak	60,64±6,23 ^a	0,30±0,04 ^a	1,99±0,13 ^c	0,98±0,21 ^b
	4-5 Yaprak	33,45±7,40 ^b	0,21±0,00 ^b	0,90±0,12 ^d	0,56±0,06 ^c
	6 Yaprak	4,60±0,13 ^c	0,09±0,00 ^c	2,48±0,40 ^c	0,59±0,03 ^c

*DÖ: Depolama öncesi, DS: Depolama sonrası, ÇS: Çiçek sürgünü.

21 °C depolama sonrası meristem, 4 °C depolama sonrası meristem ve depolama öncesi meristem örneklerinde ise gen ifadesi çok düşük düzeyde tespit edilmiştir.

G2 genotipinde, XCT_MGC_6 geninin ifade düzeyi, 6 yaprak ve 7-8 yaprak aşamalarında en yüksek belirlenmiştir. Genin ifade düzeyi 2-3 yaprak aşamasında, 6 yaprak ve 7-8 yaprak aşamasına göre daha düşük, 4-5 yaprak aşamasında ise 7-8 yaprak, 6 yaprak ve 2-3 yaprak aşamalarına göre daha da düşük gerçekleşmiştir. 7-8 yaprak çiçek sürgünü, 6 yaprak meristem, 4-5 yaprak meristem, 2-3 yaprak meristem, 21 °C depolama sonrası, 4 °C depolama sonrası ve depolama öncesi aşamalarında ise genin ifade düzeyi en düşük olarak saptanmıştır.

G2 genotipinde, XTG_MGA_10 genin ifade düzeyi genel olarak tüm aşamalardaki yaprak ve meristem örneklerinde düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Bu genin G2 genotipindeki en yüksek ifadesi 2-3 yaprak meristem ve 21°C’de depolama sonrası örneklerinde belirlenirken en düşük ifade ise 6 yaprak meristem örneğinde belirlenmiştir.

Çiçeklenen G3 genotipinde XTG_MCG_13 genin ifade düzeyi bitki gelişiminin farklı aşamalarında farklı şekilde olmuştur. Genin en yüksek ifadesi 2-3 yaprak aşamasındaki yaprak örneklerinde (259,85), en düşük ise 7-8 yaprak aşamasındaki yaprak örneklerinde (14,99) saptanmıştır. Depolama öncesi ve 4 °C’de depolama sonrası aşamalarındaki meristem örneklerinde ise genin ifade düzeyinin çok düşük düzeyde olduğu ve 12 haftalık 4 °C depolama süresince gen ifadesinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. G3 genotipinde XCT_MGT_7 geninin ifade düzeyi yaprak örneklerinde en yüksek 2-3 yaprak, 4-5 yaprak ve 6 yaprak aşamalarında saptanırken en düşük ise 7-8 yaprak aşamasında belirlenmiştir. Depolama öncesi ve 4 °C’de depolama sonrası aşamalardaki meristem örneklerinde ise gen ifadesi çok düşük olarak tespit edilmiştir. Aynı genotipte XCT_MGC_6 geni en yüksek 4 °C’de depolama sonrası meristem örneğinde ifade olmuş bunu, 7-8 yaprak aşamasındaki çiçek sürgünü örneği izlemiştir. Bitki gelişimi diğer aşamalarındaki yaprak örnekleri ve depolama öncesi meristem örneği arasında ise gen ifadesi değişimi yönünden istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir. G3 genotipinde son olarak XTG_MGA_10 genin ifade düzeyine bakıldığında istatistiksel olarak önemli farklılıklar belirlenmiştir. En yüksek gen ifadesi 7-8 yaprak aşaması çiçek sürgünde elde

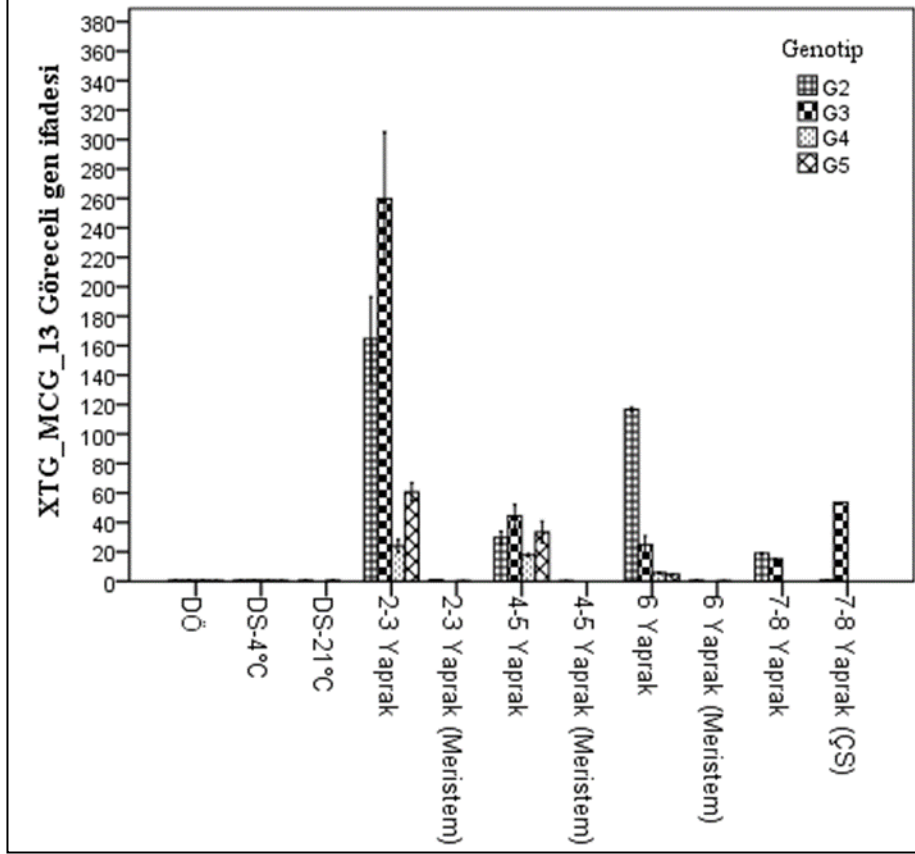
edilmiş bu aşamayı 2-3 yaprak aşaması yaprak örneği izlemiştir. Diğer yaprak aşamaları örnekleri arasında ise istatistiksel olarak bir fark belirlenmemiştir.

Çiçeklenmeyen G4 genotipinde XTG_MCG_13 geni bitki gelişimi aşamasında en yüksek 2-3 yaprak aşamasındaki yaprak örneğinde 24,04 düzeyinde ifade olmuş ve bitki gelişimin daha sonraki aşamalarında azalan bir ifade göstererek 6 yaprak aşamasında 5.82 düzeyine düşmüştür. Farklı dönemlerdeki meristem örneklerinde ise gen ifadesi çok düşük düzeyde olmuş ve bu örnekler arasında istatistiksel olarak fark belirlenmemiştir. Aynı genotipte XCT_MGT_7 geni ise tüm gelişme dönemlerindeki örneklerde ifade olmamıştır. XCT_MGC_6 geninde en yüksek ifade düzeyi depolama öncesi meristem örneğinde saptanmış ve diğer gelişme dönemlerinin meristem örneklerinde ise genin göreceli ifade düzeyi %50'den fazla azaldığı belirlenmiştir. Aynı genotipte XTG_MGA_10 genin ifade düzeyi XCT_MGC_6 genin ifade düzeyine benzer şekilde gerçekleşmiştir.

Çiçeklenmeyen G5 genotipinde, XTG_MCG_13 geni en fazla 2-3 yaprak aşamasında ifade olmuştur (60,64) ve 4-5 yaprak aşamasında 33,45'e ve 6 yarak aşmasında ise 13 kat azalarak 4.60 düzeyine düşmüştür. Bu genin ifadesi depolama öncesi ve depolama sonrası meristem örneklerinde ise en düşük düzeyde belirlenmiştir. G5 genotipinde XCT_MGT_7 genin ifade düzeyi ise en yüksek 2-3 yaprak aşamasında 0,30 düzeyinde gerçekleşmiş depolama öncesi ve sonrası meristem örneklerinde ise gen ifadesi tespit edilmemiştir. G5 genotipinde XCT_MGC_6 genin en yüksek ifade düzeyi 4 °C'de depolama sonrası meristem örneğinde (6,45) ve XTG_MGA_10 genin ise en yüksek ifade düzeyi depolama öncesi meristem örneğinde (1.33) belirlenmiştir.

4.2. Çiçeklenen ve Çiçeklenmeyen Sarımsak Genotipleri Arasında cDNA-AFLP EST Genlerindeki İfade Farklılıkları

XTG_MCG_13 genin çiçeklenen G2 ve G3 ve çiçeklenmeyen G4 ve G5 genotiplerindeki ifade düzeyindeki farklılıklar Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4. 2. Çiçeklenen (G2 ve G3) ve çiçeklenmeyen (G4 ve G5) sarımsak genotiplerinde XTG_MCG_13 EST geninin göreceli ifadesi.

Şekil 4.2’de ki grafiğe bakıldığında XTG_MCG_13 genin tüm sarımsak genotiplerinde farklı şekilde ifade olduğu ancak 4-5 yaprak gelişme dönemi dışında çiçeklenen G2 ve G3 genotiplerinin yaprak örneklerinde çiçeklenmeyen G4 ve G5 genotiplerine göre daha fazla ifade olduğu görülmektedir. Çiçeklenen genotiplerin (G2 ve G3) 2-3 yaprak aşamasında belirlenen en yüksek göreceli gen ifadesi, çiçeklenmeyen genotiplerin (G4 ve G5) aynı dönemdeki göreceli gen ifadesinden 5 kat daha yüksek gerçekleşmiştir. Gen ifadesinin regülasyonu hem çiçeklenen hemde çiçeklenmeyen genotiplerin diğer gelişme aşamalarında aşağıya doğru (down regulation) olmuştur.

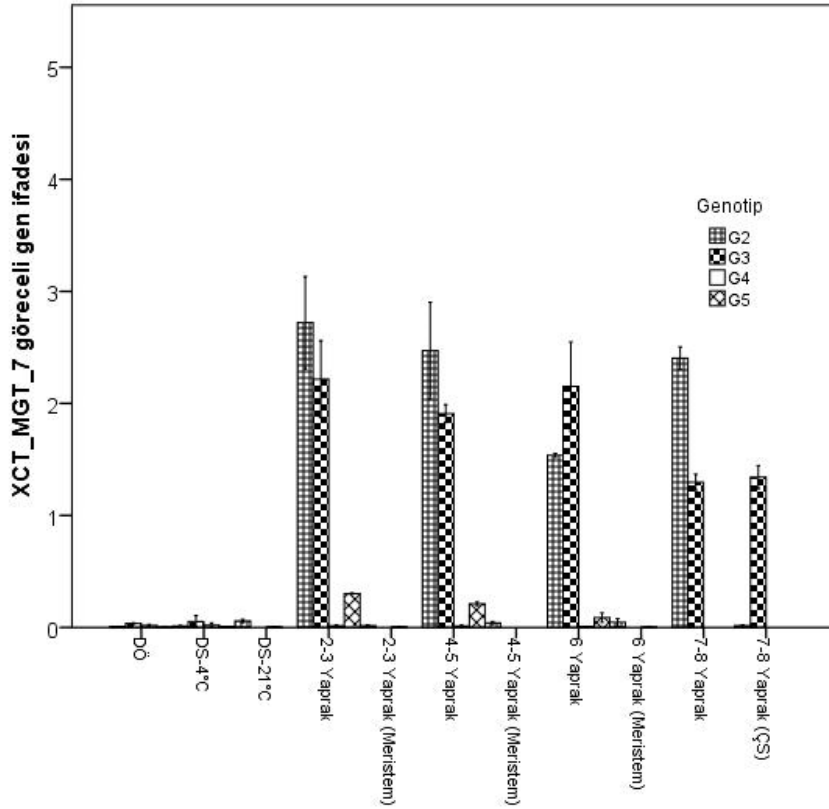
Bu tez çalışmasındaki elde edilen sonuçlar daha önceki TÜBİTAK-TOVAG 1050551 projesinde yapılan cDNA-AFLP analizlerindeki sonuçlarla uyumludur. TÜBİTAK-TOVAG 1050551 projesinde cDNA-AFLP analizleri ile belirlenen XTG-MCG-13 EST genine ait bant çiçeklenen G1 ve G2 olarak genotiplerin farklı gelişme dönemlerinden elde edilen yaprak örneklerinde gözlemlenirken depolama aşaması örneklerinde ise gözlenmemiştir. Yine aynı projede çiçeklenmeyen G3 genotipinin (bu tezde G4 olarak kodlanmıştır) yaprak ve depolama örneklerinde de cDNA-AFLP bandı gözlenmemiştir (Şekil 4.3). XTG-MCG-13 EST geni dizileri NCBI gen bankasındaki sarımsak EST verileri ile BLAST edildiğinde bu genin sarımsakta iki kopyası olduğu görülmüştür. Bu kopyalardan bir tanesinin DNA dizileri NCBI gen bankasındaki başka bitki türlerine ait 'glycosyltransferase' geni dizileri ile benzerlik gösterdiği diğer kopyanın ise hiçbir genle benzerlik göstermediği görülmüştür. Bu durum XTG-MCG-13 EST geninin sarımsağa özgü bir gen olduğuna ve çiçeklenen genotiplerde bitki gelişimin ilk aşamalarında çiçeklenmeyen genotiplere göre ifadesinin yukarıya doğru (upregulation) olduğuna işaret etmektedir. Daha sonraki çalışmalarda bu genin her iki kopyasının çiçeklenen ve çiçeklenmeyen genotiplerde sekanslanarak kodlayan bölgelerdeki ifade düzeyinde farklılığa neden olan mutasyonlar ortaya çıkarılabilir.



Şekil 4.3. TÜBİTAK-TOVAG 1050551 proje kapsamında cDNA-AFLP analizleri ile belirlenen XTG-MCG-13 EST geninin çiçeklenen G1 ve G2 genotiplerin 2007 yılı ve 2008 yılı büyüme periyodundan elde edilen yaprak örneklerindeki okla işaretlenmiş band profili. Çiçeklenmeyen G3 (bu projede G4 olarak kodludur) sarımsak ve depolama denemesindeki meristem örneklerinde band elde edilmemiştir.

XCT_MGT_7 genin çiçeklenen G2, G3 ve çiçeklenmeyen G4 ve G5 genotiplerindeki ifade düzeyi Şekil 4.4'de karşılaştırılmıştır. XCT_MGT_7 geni çiçeklenen G2 ve G3 ve çiçeklenmeyen G4 ve G5 genotiplerinde farklı şekilde ifade olmuştur. XCT_MGT_7 EST geni çiçeklenen G2 ve G3 genotiplerin bitki gelişim aşamalarında ki yaprak örneklerinde ifade olduğu ancak çiçeklenmeyen G4 ve G5 sarımsak genotiplerinde ise ifade olmadığı belirlenmiştir. Buna ek olarak tüm genotiplerin depolama öncesi ve depolamadan sonra

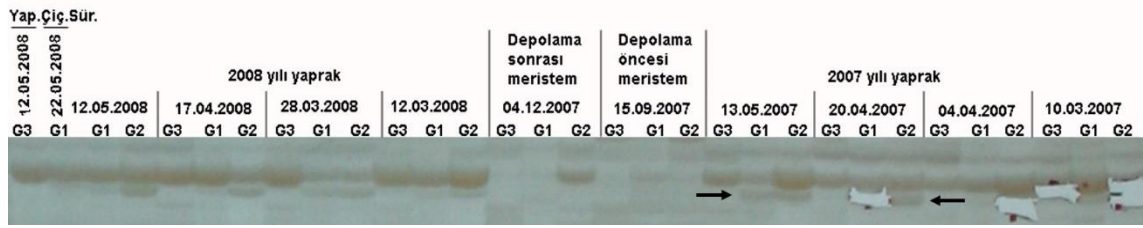
alınan meristem örneklerinde ve bitki gelişim aşamalarındaki meristem örneklerinde gen ifadesi tespit edilmemiştir (Şekil 4.3). XCT_MGT_7 EST geninin en yüksek ifade düzeyi çiçeklenen genotiplerden G2 genotipinin 2-3 yaprak (2,72), 4-5 yaprak (2,47) ve 7-8 yaprak (2,41) dönemlerinde alınan yaprak örneklerinde olmuş ancak istatistiksel olarak bu üç dönem arasında fark bulunmamıştır. Çiçeklenen G3 genotipinde gen ifade düzeyi G2 genotipine yakın düzeyde gerçekleşmiştir.



Şekil 4. 3. Çiçeklenen (G2 ve G3) ve çiçeklenmeyen (G4 ve G5) sarımsak genotiplerinde XCT_MGT_7 EST genin göreceli ifadesi

Bu tez çalışmasında XCT_MGT_7 EST geni ifade düzeyi daha önceden tamamlanan TÜBİTAK-TOVAG 1050551 projesinde cDNA-AFLP analizi ile belirlenen bant profili ile uyumludur. TÜBİTAK-TOVAG 1050551 projesinde XCT-MGT-7 EST genine ait bant çiçeklenen G1 ve G2 genotiplerin farklı gelişme dönemlerinden elde edilen yaprak örneklerinde belirlenmiş ancak çiçeklenmeyen G3 genotipinin (bu projede G4 olarak kodlanmıştır) yaprak örneklerinde tespit edilmemiştir (Şekil 4.5). Buna ek olarak tüm genotiplerin depolama aşaması meristem örneklerinde de bu gene ait bant profili belirlenmemiştir. AFLP (çoğaltılmış parça uzunluğu farklılığı) moleküler markır

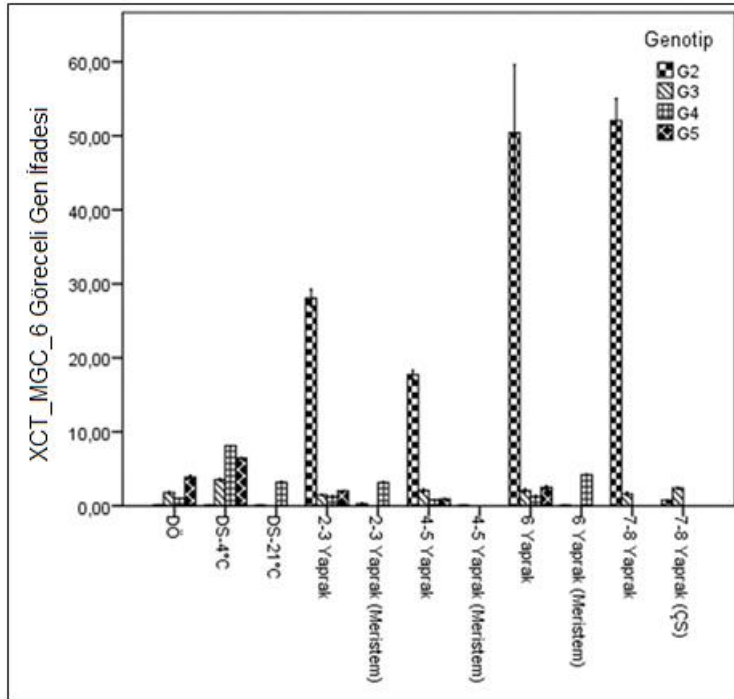
teknolojisinde bant profili yönünden örnekler arasındaki farklılık; kesim enzimi tabanı, primer bölgesi veya DNA uzunluğundaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Ancak DNA yerine mRNA'dan sentezlenmiş cDNA kullanılarak yapılan cDNA-AFLP tekniğinde aynı genotipte dönemler arasındaki farklılık ise genin ifade olması ya da olmamasından dolayı da ortaya çıkabilmektedir.



Şekil 4. 4. TÜBİTAK-TOVAG 105O551 proje kapsamında cDNA-AFLP analizleri ile belirlenen XCT_MGT_7 EST geninin çiçeklenen G1 ve G2 genotiplerin 2007 yılı ve 2008 yılı büyüme periyodundan elde edilen yaprak örneklerindeki okla işaretlenmiş band profili.

XCT_MGT_7 EST geni DNA dizisi ile NCBI gen bankasında yapılan BLAST analizlerinde, veri tabanındaki diğer türlerde tanımlanan genlerle bir benzerlik bulunmamıştır. NCBI veri tabanında bulunan sarımsak ve diğer *Allium* türlerine ait EST'ler ile yapılan BLAST analizlerinde ise XCT_MGT_7 EST geni için 1502 nükleotid uzunluğunda bir cDNA dizisi tespit edilmiştir. Bu dizi Zhu ve diğerleri, (2017) tarafından NCBI gen bankasına yüklenmiştir. Araştırmacılar transkriptom dizisini *Allium* türleri arasında yaprak şeklinde farklılaşmaya neden olan genlerin belirlenmesi amacıyla yaptıkları bir çalışmada belirlemişlerdir. TÜBİTAK-TOVAG 105O551 nolu proje ve Zhu ve diğerleri (2017), sonuçları ile bu tez çalışması sonuçları XCT_MGT_7 EST geninin çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinin yapraklarında, depolama aşamalarında ve meristem dokularında farklı ifade olan bir gen olduğunu göstermektedir. İleride yapılacak çalışmalarda bu genin daha erken yaprak aşamalarındaki ifade düzeyi belirlenerek çiçeklenen genotiplerde tam olarak hangi aşamada ifade olmaya başladığı tespit edilebilir. Buna ek olarak çiçeklenen ve çiçeklenmeyen genotiplerin genomlarından genin daha uzun bölgesinin dizi analizleri yapılarak kodlayan bölgelerdeki farklılıklar belirlenmelidir.

qRT-PCR analizlerinde XCT_MGC_6 EST geninin çiçeklenen G2 genotipinin yaprak aşamalarından elde edilen yaprak örneklerinde diğer genotiplere daha yüksek düzeyde ifade olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). G2 genotipinde en yüksek gen ifadesi 6 yaprak (50.42) ve 7-8 yaprak (52.02) aşamalarında belirlenmiş ve aynı genotipin 2-3 yaprak ve 4-5 yaprak dönemlerinden 2-3 kat daha yüksek, diğer genotiplerin ise yaprak aşamalarından 12-58 kat kadar daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Diğer genotipler arasında ise gen ifadesinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu gen için NCBI gen bankasında sarımsak EST verileri analizleri ile gerçekleştirilen BLAST analizleri sonucunda 1460 nükleotid uzunluğunda cDNA dizisi belirlenmiştir. Ayrıca NCBI gen bankasında BLAST analizlerinde kloroplast benzeri MET1 ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 5. Çiçeklenen (G2 ve G3) ve çiçeklenmeyen (G4 ve G5) sarımsak genotiplerinde XCT_MGC_6 EST genin göreceli ifadesi

XTG_MGA_10 EST geni ile yapılan qRT-PCR analizlerinde çiçeklenen ve çiçeklenmeyen genotipler arasında ve farklı gelişme dönemlerinde anlamlı bir ifade farklılığı belirlenmemiştir. Gen ifadesi analiz edilen tüm örneklerde düşük düzeyde olmuş ve en yüksek olarak G4 genotipinin 4 °C'de 12 hafta depolama sonunda elde edilen meristem örneklerinde saptanmıştır.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında daha önceden yürütülen TÜBİTAK-TOVAG 105O551 nolu projede çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotiplerinde farklı şekilde ifade olduğu belirlenmiş genlerden XTG_MCG_13, XCT_MGT_7, XCT_MGC_6, XTG_MGA_10 kodlu EST genlerin qRT-PCR analizleri ile ifade düzeyleri araştırılmıştır. qRT-PCR analizlerinde XCT_MGT_7 EST ve XTG_MCG_13 kodlu EST genlerinin çiçeklenen G2 ve G3 sarımsak genotiplerinde çiçeklenmeyen G4 ve G5 sarımsak genotiplerine göre bitki gelişim aşamalarında daha yüksek ifade olduğu belirlenmiştir. XC_MGC_6 kodlu genin ise çiçeklenen G2 genotipinin bitki gelişim aşamalarında diğer genotiplere göre anlamlı bir şekilde yukarı doğru ifade olduğu bulunmuştur. XTG_MGA_10 kodlu EST geninde ise çiçeklenen ve çiçeklenmeyen sarımsak genotipleri arasında anlamlı bir ifade düzeyi belirlenmemiştir.

Sarımsakta çiçeklenme üzerine hem gün uzunluğu hem de sıcaklık etkili olmaktadır. Ayrıca farklı sarımsak genotipleri arasında çiçeklenme özelliği yönünden geniş bir çeşitlilik bulunmaktadır. Genotipler arasındaki bu farklılığın sarımsakta çiçeklenme mekanizmasının oldukça karmaşık olduğuna ve çiçeklenmede birçok genin görev aldığına işaret etmektedir. Bu tez çalışmasında da çiçeklenen ve çiçeklenmeyen genotipler arasında olduğu gibi çiçeklenen genotipler arasında da analiz edilen genlerin ifade düzeylerinde farklılıklar görülmüştür. Bu tez çalışmasında analiz edilen genler sarımsakta çiçeklenme ile ilişkisi ilk kez belirlenen genlerdir. İleride yapılacak çalışmalarda son yıllarda moleküler biyoloji ve bitki ıslahında çığır açan CRISPR/CAS9 genom düzenleme teknoloji kullanılarak çiçeklenen sarımsak genotiplerinde XTG_MCG_13 ve XCT_MGT_7 aday genlerinde mutasyonlar yapılabilir. Elde edilen mutant bitkilerde çiçeklenme yönünden ortaya çıkacak değişiklikler bu genlerin çiçeklenmede rol aldığı sonucuna varılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akan, S., Horzum, Ö., & Tuna Güneş, N. (2019). Taze sarımsak (*Allium sativum* L.) başlarının modifiye atmosferli paketlerde depolanma performansı. *Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi*, 1, 424-432.
- Ben Michael, T. E., Faigenboim, A., Shemesh-Mayer, E., Forer, I., Gershberg, C., Shafran, H., & Kamenetsky-Goldstein, R. (2020). Crosstalk in the darkness: bulb vernalization activates meristem transition via circadian rhythm and photoperiodic pathway. *BMC plant biology*, 20(1), 1-16.
- Chaturvedi, A. K., Shalom, S. R., Faigenboim-Doron, A., Teper-Bamnlker, P., Salam, B. B., Daus, A., & Eshel, D. (2018). Differential carbohydrate gene expression during preplanting temperature treatments controls meristem termination and bulbing in garlic. *Environmental and Experimental Botany*, 150, 280-291.
- Erol, A. Y. A. Z., & Alpsoy, H. C. (2007). Sarımsak (*Allium sativum*) ve geleneksel tedavide kullanımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31, 145-149.
- Erşahin, R. (2020). *Sarımsakta depolama süresince allinaz geni ifadesindeki değişikliğin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)).
- FAO. (2021). Sarımsak üretimi. The State of Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>
- Fritsch, R. M., & Friesen, N. (2002). Evolution, domestication and taxonomy. In *Allium crop science: recent advances* (pp. 5-30). Wallingford UK: CABI publishing.
- Geboloğlu, N., Karabekiroğlu, D. S., & Doksöz, S. (2017). Tokat sarımsağının morfolojik ve moleküler karakterizasyonu. *Akademik Ziraat Dergisi*, 6, 131-136.
- Ipek, M., Ipek, A., & Simon, P. W. (2003). Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 246-252.
- Ipek, M., Ipek, A., & Simon, P. W. (2008). Molecular characterization of Kastamonu garlic: an economically important garlic clone in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 115(2), 203-208.
- İpek, M. (2011). Sarımsak yetiştiriciliği (*Allium sativum* L.): *Bahçe tarımı II* (V. Şeniz & V. Erdoğan, Eds.). Anadolu Üniversitesi.
- Koççat, S. (2016). *Sarımsakta depolama süresince tiamin biyosentezinde görev alan THIC geninin ifade düzeyindeki değişiminin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)).
- Kömürcü-Bayrak, E., & Erginel-Ünaltuna, N. (2011). Gen anlatımı analiz yöntemlerine genel bakış. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 28-35.
- Licolln, T., & Eduardo, Z. (2008). *Bitki Fizyolojisi* (İsmail T., Ed.). Palme Yayıncılık, Vol. 3.
- Liu, M., Wu, Z., & Jiang, F. (2015). Selection and validation of garlic reference genes for quantitative real-time PCR normalization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122, 435-444.

- Madhu, B., Mudgal, V. D., & Champawat, P. S. (2019). Storage of garlic bulbs (*Allium sativum* L.): A review. *Journal of Food Process Engineering*, 42(6), e13177.
- Pooler, M. R., & Simon, P. W. (1994). True seed production in garlic. *Sexual Plant Reproduction*, 7, 282-286.
- Rotem, N., Shemesh, E., Peretz, Y., Akad, F., Edelbaum, O., Rabinowitch, H. D., ... & Kamenetsky, R. (2007). Reproductive development and phenotypic differences in garlic are associated with expression and splicing of LEAFY homologue gaLFY. *Journal of Experimental Botany*, 1133-1141.
- Shemesh-Mayer, E., Faigenboim, A., Ben Michael, T. E., & Kamenetsky-Goldstein, R. (2022). Integrated genomic and transcriptomic elucidation of flowering in garlic. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13876.
- Simon, P. W., Honan, R. M., Jenderek, M. M., & Voss, R. E. (2003). Environmental and genetic effects on garlic growth, flowering, and bulb characters. *Horticulturea Scientia*, 38, 783-790.
- Takagi, H. (1990). Effect of nutrient, growth regulator and temperature for in vitro growth and organogenesis of excised buds from garlic (*Allium sativum* L.) cloves. *Bulletin of the Yamagata University. Agricultural Science (Japan)*.
- Takhtadzhian, A. L., & Takhtajan A. (1997). Diversity and classification of flowering plants. *Columbia University Press*
- Thomson, M., & Ali, M. (2005). Garlic (*Allium sativum*): A Review of its Potential Use as an Anti-Cancer Agent. *Current Cancer Drug Targets*, 3(1), 67–81. <https://doi.org/10.2174/15680090333333736>
- TÜİK. (2022). Türkiye sarımsak üretimi. Türkiye İstatistik Kurumu <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>
- Vural, H., Eşiyok, D., & Duman, İ. (2000). Kültür sebzeleri: *Sebze yetiştirme*. Ege Üniversitesi
- Wang, G., Tian, C., Wang, Y., Wan, F., Hu, L., Xiong, A., & Tian, J. (2019). Selection of reliable reference genes for quantitative RT-PCR in garlic under salt stress. *Peer Journal*, 7, e7319.
- Zhu, Z., Wang, Y. M., Yang, J., & Luo, X. S. (2017). Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plastic and Aesthetic Research*, 4, 219-227.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı : Osman KIRIKOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Osmangazi, 21/04/1995
Yabancı Dil : İngilizce
Eğitim Durumu
Lise : Ali Karasu Anadolu Lisesi
Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Marmarabirlik
İletişim (e-posta) : kirikogluosman@gmail.com
Yayımları
• Duran, S. T., Aghayeva, S., Akparov, Z., Mammadov, A., Asgarova, R., Uslu, O. Y., ... & Ipek, A. (2021). Genetic variation and relationships between Azerbaijani and Turkish olive genetic resources. *Molecular Biology Reports*, 1-9.
• Kırıkoğlu, O., & Hanife, G. E. N. Ç. Zeytin Bahçelerinde Zeytin Güvesi Prays oleae Bernard (Lepidoptera: Yponomeutidae)'nin Mücadelesi Hakkında Çiftçilerin Bilinç Düzeylerinin Belirlenmesi. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6, 107-114.