

**SARIMSAKTA DÜŞÜK SICAKLIKTA
FARKLI İFADE OLAN
PROTEİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Aybüke İL



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARIMSAKTA DÜŞÜK SICAKLIKTA FARKLI İFADE OLAN
PROTEİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

AYBÜKE İL
0000-0001-9762-3703

PROF. DR. MERYEM İPEK
DANIŞMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA- 2019

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Aybüke İL tarafından hazırlanan “Sarımsakta Düşük Sıcaklıkta Farklı İfade Olan Protein Profillerinin Belirlenmesi” 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
0000-0002-0609-3442
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Murat ŞEKER
0000-0002-6886-0547
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri
Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Asuman CANSEV
0000-0002-3353-846X
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

.././....

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.

13/09/2019

Aybüke İL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SARIMSAKTA DÜŞÜK SICAKLIKTA FARKLI İFADE OLAN PROTEİN PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Aybüke İL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Sarımsağın insan sağlığı açısından önemi giderek artmasından dolayı üretimi ve tüketimi son yıllarda önemli seviyede artmıştır. Vegetatif yollarla üretimi yapılan bu bitki türü için dış dormansisi büyük önem taşımaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı, sarımsak dişlerinde düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı koşullarında farklı depolama sürelerinde farklı ifade olan protein profillerinin SDS-PAGE analizi yöntemiyle belirlenmesidir. Tez çalışmasında Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotipleri 4°C ve 21°C depolama sıcaklığında 0 (kontrol grubu), 4, 8 ve 12 hafta süre ile depolanmıştır.

SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre PI515971 genotipinde 4°C’de yaklaşık 13, 17, 19, 20, 22, 28, 30, 33, 38 ve 44 kDa ağırlığında ve 21°C’de ise yaklaşık 13, 22, 28, 30, 33, 38 kDa ağırlığında olan proteinlerin farklı ifade olduğu belirlenmiştir. Kastamonu genotipinde 4°C düşük sıcaklıkta yaklaşık 13, 22, 30, 38, 45 ve 64 kDa ağırlığında proteinlerin depolama sıcaklığına ve depolama sürelerine göre ifade düzeylerinde farklılıklar belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre sarımsakta dormansinin kırılmasında önemli rolü olan düşük sıcaklığın protein profillerini etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca denemede toplam çözünebilir protein (TÇP) içeriğindeki değişimler de belirlenmiştir. TÇP içeriği 4°C’de depolamada her iki genotipte de istatistiksel olarak önemli düzeyde artarken 21°C’de depolamada PI515971’de artmış, Kastamonu genotipinde ise değişmemiştir.

Sonuç olarak düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı koşullarında, farklı depolama sürelerinde farklı ifade olan proteinler belirlenmiştir. Bu proteinlerin daha sonra yapılacak çalışmalarla karakterize edilmesi, sarımsakta dormansi ve vernalizasyon mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

Anahtar sözcükler: *Allium sativum* L., Protein profili, SDS-PAGE, Toplam çözünebilir protein

2019, vii + 39 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEIN PROFILES AT LOW TEMPERATURE IN GARLIC

Aybüke IL

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Meryem IPEK

Production and consumption of garlic have been increased significantly in recent years because of the increasing importance of garlic for human health. Dormancy in the clove of this plant species is very important for vegetative production. The purpose of this master's thesis study is to determine differentially expressed proteins in garlic cloves during the storage at low temperature and room temperature conditions by SDS-PAGE analysis. In the thesis, garlic genotypes, Kastamonu and PI515971 were stored for 4, 8 and 12 weeks at 4°C and 21°C storage temperatures.

According to the results of SDS-PAGE analysis, the proteins that are about 13, 17, 19, 20, 22, 28, 30, 33, 38, and 44 kDa at 4°C and about 13, 22, 28, 30, 33 and 38 kDa at 21°C were found to be differentially expressed in PI515971 genotype. In the Kastamonu genotype, expression levels of 13, 22, 30, 38, 45 and 64 kDa proteins were different during the different storage periods at 4°C. According to our results, low temperature has an important role in breaking dormancy in garlic and it also affects protein profiles. In addition, changes in total soluble protein (TCP) content were determined in the experiment. The TCP content increased significantly in both genotypes at 4°C in storage and increased in PI515971 at 21°C, but not in the Kastamonu genotype.

As a result, under low temperature and room temperature conditions, differentially expressed proteins have been identified at different storage periods. Characterization of these proteins by subsequent studies could contribute to the elucidation of the dormancy and vernalization mechanism in garlic.

Key words: *Allium sativum* L., Protein profile, SDS-PAGE, Total soluble protein
2019, vii + 39 page

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimim süresince her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez çalışmamda en büyük emeğe sahip Sayın Prof. Dr. Meryem İPEK'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Doç. Dr. Asuman CANSEV'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamda yardım ve desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Ahmet İPEK'e çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı babam Doğan İL'e, annem Dilek İL'e ve ablam Şimal İL GÖRGÜN'e çok teşekkür ederim. Desteklerinden dolayı canım arkadaşım Gizem Selviler'e teşekkür ederim.

Desteklerinden ve yardımlarından dolayı Bayram Tohum'da çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Aybüke İL

13/09/2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. Vernalizasyon Mekanizması	7
2.2. Sarımsakta Dormansi Mekanizması.....	9
2.3. Düşük Sıcaklığın Proteomik İle İlişkisi	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Bitki Materyali	15
3.2. Protein Ekstraksiyonu	15
3.3. Toplam Çözünebilir Protein Analizi	16
3.4. SDS-PAGE Analizi.....	17
3.4.1. Örneklerin SDS-PAGE İçin Hazırlanması.....	17
3.4.2. SDS-PAGE İçin Jel Hazırlanması.....	18
3.4.3. Jelin Boyanması	20
3.4.4. Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi	21
3.5. İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Depolama Süresince Dişlerdeki TÇP İçeriğindeki Değişimlerin Belirlenmesi	22
4.2. SDS - PAGE Profilleri	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	39

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
B	Beta
dH ₂ O	Distile su
g	Gram
Ha	Hektar alan
kDa	Kilo Dalton
lt	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg/gTA	Miligram/ gram Taze Ağırlık
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ppm	Milyonda Bir Birim
ng	Nanogram
Nm	Nano metre
Rf	Oransal ilerleme (Relative mobility)
MW	Moleküler ağırlık standardı (Molecular weight standart)
°C	Santigrat Derece
Cm	Santimetre
V	Volt
W	Watt
%	Yüzde Oran

Kısaltmalar	Açıklama
Borax	Sodyum Tetaborat (Sodium Tetraborate)
BSA	Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
BU	Protein bandının jelin başlangıç noktasına olan uzaklığı
JB	Jel boyu (işaret boyasının ilerleme mesafesi)
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PMSF	Fenilmethilsulfonyl Florid
PVPP	Polyvinilpyrrolidon
Rpm	Dakikada Dönme Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sulfat
TA	Taze Ağırlık
TCA	Trikloro Asetik Asit
TÇP	Toplam Çözünbilir Protein
TEMED	Tetramethylethylenediamine

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Proteomiğin genel çalışma akış şeması.....	5
Şekil 3.1. Eppendorf tüp içerisinde çöktürülen protein pelleti.....	18
Şekil 3.2. Elektroforez tankı içerisinde cam kasetlere mikro pipet yardımıyla protein örneklerinin yüklenmesi.....	20
Şekil 4.1. PI515971 sarımsak genotipinde depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre TÇP içeriğinin değişimi (mg/g TA).....	25
Şekil 4.2. Kastamonu sarımsak genotipinde depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre TÇP içeriğinin değişimi (mg/g TA).....	25
Şekil 4.3. PI5159171 sarımsak genotipi dişlerinde 4°C’de farklı depolama sürelerinde SDS-PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: 0. hafta, 2: 4. hafta, 3: 8. hafta, 4: 12. hafta.	29
Şekil 4.4. PI515971 sarımsak genotipi dişlerinde 21°C’de farklı depolama sürelerinde SDS-PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: 0. hafta 2: 4. hafta, 3: 8. hafta, 4: 12. Hafta.....	30
Şekil 4.5. Kastamonu sarımsak genotipi dişlerinde 4°C’de farklı depolama sürelerinde SDS-PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: 0. hafta, 2: 4. hafta, 3: 8. hafta, 4: 12. hafta... ..	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Ekstrakte edilen çözünebilir protein miktarının ‘Bradford Protein Assay’ yöntemine göre belirlenmesi için standart ve örneklerin hazırlanması.....	17
Çizelge 4.1. PI515971 ve Kastamonu sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre TÇP miktarı (mg/g TA)	24
Çizelge 4.2. PI515971 sarımsak genotipinin TÇP miktarının (mg/g TA) depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksyonları	26
Çizelge 4.3. Kastamonu sarımsak genotipinin TÇP miktarının (mg/g TA) depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksyonları	27

1. GİRİŞ

Sarımsağın (*Allium sativum* L.) anavatanı Orta Asya olarak bilinmekle birlikte ikinci anavatanı Anadolu'dur. Türkiye, sarımsağın anavatanı arasında yer aldığından dolayı genotip olarak zengin bir ülkedir (Etoh ve Simon 2002). İnsan sağlığı ve beslenmesinde çok önemli bir yeri olan bu bitki ılıman iklimden subtropikal iklime kadar geniş bir alanda yetiştirilir (Fritsch ve Friesen 2002).

Sarımsak (*Allium sativum* L.) ve *Allium* cinsinin içinde yer alan diğer türler öncelikle Liliaceae familyasında yer almış olup daha sonra yapılan sınıflandırmada Alliaceae familyasında yer almışlardır (Brewster 1990). Sarımsağın botanik sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

Sınıf: Liliopsida

Altsınıf: Liliidae

Üst takım: Liliianae

Takım: Amaryllidales

Familya: Alliaceae

Altfamilya: Allioideae

Cins: *Allium*

Tür: *Allium sativum* L.

Sarımsağın insan sağlığı açısından öneminin giderek artmasından dolayı üretimi ve tüketimi son yıllarda önemli seviyede artmıştır. Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) sitesinden alınan 2016 yılı verilerine göre Dünya sarımsak üretimi 26 573 001 tondur. Dünya sarımsak üretiminde Asya 24 383 745 ton ile %91,8, Avrupa 825 187 ton ile %3,10, Amerika 703 955 ton ile %2,6, Afrika 658 236 ton ile %2.5'lük paya sahiptir. En çok sarımsak üretimi yapan ilk 5 ülke ise sırasıyla Çin (21 263 237 ton), Hindistan (1 400 000), Güney Kore Cumhuriyeti (275 549 ton), Mısır (280 216 ton) ve Rusya Federasyonu'dur (262 211 ton) (FAO 2016). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2017 verilerine göre Türkiye illerinin, kuru sarımsak ekim alanları sıralamasında 1. sırada Kastamonu (24 530 da), 2. sırada Kahramanmaraş (12

855 da), 3. sırada Aksaray (10 830 da), 4. sırada Gaziantep (10 745 da) ve 5. sırada Balıkesir (8 990 da) yer almaktadır. Toplam Türkiye sarımsak üretimi 121 805 tondur. İller bazında kuru sarımsak üretim miktarlarına göre sıralama yaptığımızda ise 25 968 ton üretimle Kastamonu ilk sırada gelmekte ve bu ili sırasıyla 20 656 ton ile Gaziantep, 13 683 ton ile Kahramanmaraş, 9 705 ton ile Aksaray, 4 231 ton ile Balıkesir illeri takip etmektedir (TÜİK 2017). Ülkemizde genellikle Kastamonu sarımsağı, Balıkesir sarımsağı, Kara sarımsak, İspanyol sarımsağı ve İtalyan sarımsağı yetiştirilmektedir (Kütevin ve ark. 1987).

Sarımsak tüketimi taze, kurutulmuş sarımsak, sarımsak tozu, sarımsak suyu, sarımsak püresi ve sarımsak yağı şeklinde gerçekleşmektedir (Akan 2014). *Allium* cinsinden olan sarımsak ve soğan (*Allium cepa* L.) tıbbi hammadde olarak da kullanılmaktadırlar. İçeriklerindeki flavonoidlerden dolayı antioksidan miktarları yüksektir. Soğan ve sarımsak türleri, kanser, kalp hastalıkları, obezite, diyabet, hipertansiyon, katarakt gibi günümüzün önemli hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadırlar (Yünlü ve ark. 2016).

Yüz g sarımsak içerdiği kimyasal bileşikler açısından çok zengindir. Yüz g taze sarımsakta 140 kcal enerji, 63,8 g su, 28,2 g karbonhidrat, 5,3 g protein, 0,2 g yağ ve 1,1 g selüloz bulunmaktadır. Yapısında 200 den fazla kimyasal bileşik içeren sarımsakta kükürt içeren uçucu yağlar (allisin, alliin, ajoene), enzimler (alinaz, peroksidaz, mirasinaz), karbonhidatlar (sakaroz, glikoz), mineraller, aminoasitler, A, B1, B2, Niasin ve C vitamini başta gelmektedir. Sarımsağın kendine has kokusu ve tadı allisin, sülfid gibi kükürtlü ve eterli yağlardan kaynaklanmaktadır (Baytop 1999, Kütevin ve ark. 1987). Ülkemizdeki sarımsak çeşitlerinin alliin, allisin ve uçucu yağ oranı yaklaşık olarak %0,4' dür (Baytop 1999, Anonim 1995).

Sarımsak 25-100 cm boylanabilen, yeşilimsi beyaz veya mor çiçekli, saçak kök, gövde, yaprak, diş ve çiçek kısımlarından oluşan bir bitkidir (Ayaz ve ark. 2007). Sarımsak genotipleri çiçeklenen ve çiçeklenmeyen genotipler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Çiçek renkleri pembe ve mor tonlarındadır (Simon ve Jenderek 2003). Erkek fertil sarımsak genotiplerinde mor anterler önemli bir morfolojik markıdır (Etoh ve Simon 2002). Fertil

çiçeklerin polenlerinin %50 'den fazlası canlı olduğu gibi sarı renkli antere sahip çiçekler ise polen oluşturmazlar (Hong ve Etoh 1996). Her bitkide olduğu gibi sarımsakta da tohum üretiminde çiçek en önemli organdır. Erkek fertil sarımsak genotipinde tohum tutumundaki olumsuzluklar incelendiğinde, çiçeklenmenin başlamasını engelleyen genetik yapı ve çevresel koşullar, polen veya ovul ölümlerine neden olan kromozomal anormallikler ve patojenler gibi faktörler dikkat çekmektedir (Etoh ve Simon 2002). *Allium* türlerinden farklı olarak sarımsakta çiçekler arasında küçük dişler meydana gelmektedir. Vegetatif dişler çiçek taslaklarının farklılaşmasıyla meydana gelmekte ve çiçek gelişimini engelleyerek besin maddelerine ortak olmaktadır. Vegetatif dişler sarımsağın kısır olmasının sebepleri arasında sayılmaktadır (İpek 2011).

Sarımsağın diploid genomu $2n = 16$ kromozomlu ve $2C$ genom büyüklüğü yaklaşık 3×10^{10} baz çifti (30 milyar baz çifti)'dir. Genomun büyük olması ve tohum üretememesinden dolayı genetik ve moleküler çalışmalar sarımsakta sınırlı kalmıştır. Sarımsak genomunun büyük olmasının nedenleri arasında protein üretmeyen DNA dizilimlerindeki ardışık tekrarlanmalar gösterilmektedir (İpek ve ark. 2005).

Sarımsak için önemli miktarlara sahip üretim alanları deniz iklim bölgesi, karasal iklim bölgesi ve geçiş bölgeleridir. $15-25^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %60-80 nem sarımsak yetiştiriciliği için optimum değerlerdir (Vural ve ark. 2000). Sarımsak yetiştiriciliğinde gün ışığı ve sıcaklık değerleri çok önemli iki faktördür. Düşük sıcaklık ve kısa gün koşullarında yeşil aksam gelişirken, yüksek sıcaklık ve uzun gün koşullarında baş gelişimi gerçekleşir (Subrata ve ark. 2010, Mathew ve ark. 2011). Kısa gün koşullarındaki güçlü yeşil aksam gelişimi baş gelişimini ve verimi etkiler (Youssef ve Tony 2014). Sarımsağı düşük sıcaklıkta depolamanın ya da soğuk dönemde dikim yapılmasının sebepleri fizyolojik gelişim ve baş gelişimiyle birlikte verimi arttırmaktır (Ade-Ademilua ve ark. 2009).

Kültürü yapılan sarımsak genotipleri kısır olduğundan dolayı üretimi dişlerle yapılmaktadır (Bandara ve ark. 1999). Sarımsak dişleri hasattan sonra dormansi göstermektedir ve bu dormansi süresi çevre şartlarına ve genotiplere göre değişmektedir. Dormansi 4-6 hafta sürmekte ve zamanla azalmaktadır (Rahman ve ark. 2003, 2006). Düşük sıcaklıkta

depolanan sarımsaklarda dormansinin kırıldığı bilinmektedir (Youssef 2013). Soğanda dormansi kontrolünün ABA ve GA₃ 'ün arasındaki ilişkiye bağlı olduğu belirtilmektedir. Dormant soğan başlarında dormant olmayan başlara göre GA₃ miktarının daha düşük olduğu belirlenmiştir (Rahman ve ark. 2003, 2006).

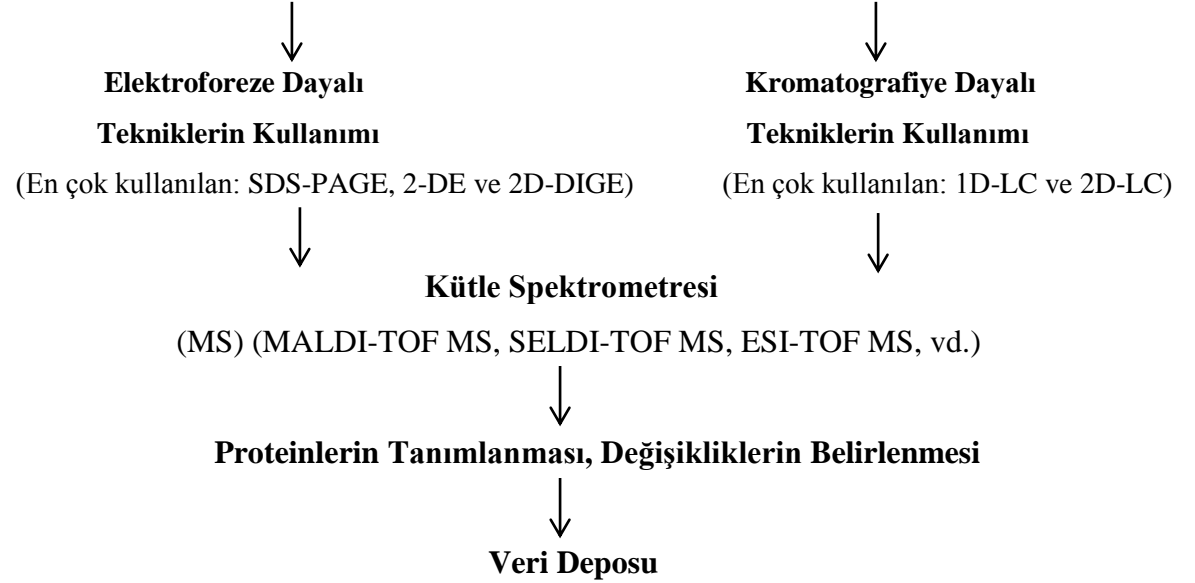
Bitkiler sağlıklı ve güçlü vegetatif ve generatif büyüme gösterebilmeleri için belli bir süre düşük sıcaklığa ihtiyaç duyarlar. Düşük sıcaklık isteklerini karşılayamamış bitkilerde sağlıklı büyüme ve gelişme görülmediği gibi verim ve kalite de kayıplar yaşanır. Bitkiler düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında çiçeklenme teşvik edilir ve bu olaya vernalizasyon denir (Nadaroğlu ve ark. 2016). Bitkilerde yapılan moleküler çalışmalarda vernalizasyon ve soğuğa adaptasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır. Vernalizasyon ve soğuğa adaptasyonun moleküler mekanizmaları farklılık göstermektedir. Vernalizasyon bitkilerin gelişimleri için gerekli bir aşama iken soğuğa adaptasyon ise soğuk zararlanmalarını önleyen fizyolojik bir tepkidir. Bu durumda gen faaliyetlerinde oluşan farklılıktan dolayı her iki olayda da farklı genlerin rol oynadığı ortaya çıkmaktadır (Chong ve ark. 1994). Soğuğa adaptasyonda proteinlerin oluşması 7. günde, vernalizasyon da ise proteinlerinin oluşması 14-21. günlerde olduğu bildirilmektedir (Acar 2006). Bitkilerin düşük sıcaklıkla doğru orantılı olarak bünyelerindeki çözünebilir protein miktarının arttığı ifade edilmektedir. Protein miktarı dona dayanıklı tür ve çeşitlerde daha fazla, dayanıksız çeşitlerde ise daha az olduğu bildirilmektedir (Ertürk ve Güteryüz 2007). Guy (1990), dona dayanıklı çeşitlerde çözünebilir proteinlerdeki artışın düşük sıcaklıkla uyarılan enzim artışından kaynaklanabileceğini belirtmiştir.

Dokulardan genom tarafından sentezlenen proteinlerin analiz edilmesine, proteomun tanımlanmasına, yapı ve fonksiyonlarının çok detaylı olarak incelenmesine proteomik denir (Kurban ve ark. 2010). Mark Wilkins tarafından ilk defa 1994 yılında tanımlanan proteomik, organizma, doku ve hücrelerde bulunan proteinlerin geniş ölçekli analizi ve tanımlaması işlemine dayanmaktadır (Özenoğlu ve ark. 2016). Proteomik analizler, örnekteki proteinlerin analizi ve bu proteinlerin tanımlanması işlemiyle yürütülmektedir. Proteinlerin analizi Şekil 1.1'de belirtilen ayırma metodları ile yapılır. Elde edilen veriler

için kütle spektrometresi (MS) yöntemi kullanılarak proteinlerin ağırlıkları belirlenir ve proteinlerin tanımlanması işlemi yapılır (Del ve ark. 2005, Graham ve ark. 2005).

Protein Örneğinin Hazırlanması

(Protein ekstraksiyonu, çözünürleştirilmesi, DNA örneğinin uzaklaştırılması vd.)



Şekil 1.1. Proteomiğin genel çalışma akış şeması (Kurban ve Mehmetoğlu 2010).

Elektroforez, proteinlerin elektrik akımı içerisinde molekül ağırlıklarına, büyüklüklerine ve yüklerine bağlı olarak hareket etmesi olarak tanımlanmaktadır. 2-DE ayırma metodu kompleks proteinlerin ayrılmasında kullanılan en önemli yöntemdir. 2-DE yöntemiyle binlerce proteinin tek seferde ayrılması sağlanır. İlk seferde IEF (izoelektrik odaklama) elektroforezi ile pH gradientinde yük bağımlı ayırma ve ikinci seferde SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile molekül ağırlığına göre ayırma metodları uygulanır. İyi bir boyama yöntemi ile örneklerdeki 1 ng'a kadar küçük proteinler belirlenmektedir (Kurban ve ark. 2010).

Transkriptom ve proteom analizleri, kantitatif PCR ile yapılan moleküler morfofizyolojik çalışmalar, fertil ve erkek-steril sarımsak genotiplerinde gametogenezde yer alan genlerin spesifik olarak tanımlanmasını sağlamıştır. Fertil ve erkek-kısır çiçeklerde transkriptom

analizi ve global gen ekspresyonu sonucu >16.000 genin farklı ifade olduğu belirlenmiştir. Proteom analizi ve 2D jel protein haritalarının kantitatif olarak karşılaştırılması sonucu 9'u sadece erkek-streril genotipte bulunan 36 farklı protein noktası ortaya çıkmıştır (Mayer ve ark. 2015). Ancak sarımsakta hasattan sonra ekime kadar ya da tüketim için kullanılacaksa tüketim zamanına kadar başlardaki protein içeriğindeki değişimler ve farklı ifade olan proteinler konusunda çok fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Sarımsakta özellikle düşük sıcaklıkta farklı depolama sürelerinde farklı ifade olan proteinlerin belirlenmesi, sarımsakta dinlenme ve vernalizasyon mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

Bu yüksek lisans tez konusunun amacı sarımsak dişlerinde düşük sıcaklık (4°C) ve oda sıcaklığı (21°C) koşullarında farklı depolama sürelerinde (0, 4, 8, 12 hafta) TÇP içeriğinin ve farklı ifade olan protein profillerinin SDS-PAGE elektroforez yöntemiyle belirlenmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Vernalizasyon Mekanizması

Vernalizasyon ve soğuklama ihtiyacı birbiriyle karıştırılan iki tanımdır. Vernalizasyon vegetatif devredeki bitkilerin generatif devreye geçmesi için ihtiyaç duydukları düşük sıcaklıktır. Soğuklama isteği ise odunsu bitkilerde tomurcuk dormansisinin kırılması için ihtiyaç duyduğu düşük sıcaklık isteğidir (Doğru ve Balkaya 2015).

Lahana, karnabahar, turp, havuç, kereviz, soğan, pırasa gibi bazı kışlık sebze türleri bitki gelişim döneminde 4 – 10 °C civarında 4 - 8 hafta geçirmeden çiçeklenemez, meyve ve tohum oluşturamazlar. Bu yüzden bitkiler vernalizasyona ihtiyaç duyarlar. Lahana çeşit ıslahında, çiçeklenme zamanının kontrolü ve tohum üretimi için gereken sürenin kısaltılması önemlidir. Lahanalarda tohum üretimini doğrudan etkileyen sapa kalkma ve çiçeklenme, birçok faktörün etkileri sonucunda oluşmaktadır. Vernalizasyon ihtiyacının karşılanması, lahanalarda sapa kalkmayı teşvik eden önemli bir faktördür (Doğru ve ark. 2015).

Kaymak ve Güvenç (2009), vernalizasyon ve gün uzunluğunun turp (*Raphanus sativus* L.)'un çiçeklenmesi üzerine etkisini ve ülkemizde yaygın yetiştiriciliği yapılan çeşitler arasından vernalizasyon çalışmaları için alternatif model bir çeşit belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırma sonunda, kullanılan çeşitlerden Siyah turpun çiçeklenmesi için gün uzunluğunun etkili olmadığı, vernalizasyon ihtiyacının zorunlu olduğu; Antep, Beyaz, İri Kırmızı, Red Cherry F1 ve Cherry Belle çeşitlerinin ise uzun güne bağlı olarak çiçeklendiği, vernalizasyonun çiçeklenmeyi hızlandırdığı ve vernalizasyon ihtiyaçlarının fakültatif olduğu tespit edilmiştir.

Wu ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada dikimden önce sarımsak başlarını soğuk uygulaması için, farklı sürelerde (20, 40, 60 gün), düşük sıcaklıkta (5°C, 10°C, 15°C) bekletmişlerdir. Kontrol uygulamasında başlar 20-22°C' de depolanmıştır. Tarla yetiştiriciliğinde bitki büyümesi, sürgün ve sarımsak verimi açısından değerlendirme yapılmıştır. Sarımsak bitkilerinde 10°C'de 20-40 gün ve 5°C'de 20 günlük uygulamalarda

daha yüksek sürgün gelişimi görülmüştür. Bununla birlikte üşütme sıcaklıklarında artan periyotlarda sarımsak baş verimi ve baş ağırlığı kontrol grubuna göre giderek azalmıştır. Tüm uygulamalar arasında en yüksek verim 5°C’de 20 gün depolama uygulamasında alınmıştır.

Tohum üretiminde çiçeklenme önemli bir faktördür. *Allium* türlerinde çiçeklenme fotoperiyod ve sıcaklıktan etkilenmektedir. Yerel şalot çeşitlerinden Bima Brebes ve Sumenep ile gerçekleştirilmiş bir çalışmada doğal ışık (kontrol), 2 saat karanlık, 4 saat ilave ışıkla aydınlıkta soğan fideleri vernalizasyon için oda sıcaklığında ve soğukta (10°C) 1 ay boyunca depolanmıştır. Vernalizasyon sonucunda çiçeklenmede Bima Brebes çeşidinde % 11,68, Sumenep çeşidinde ise %2,85 artış sağlanmıştır. Vernalizasyon çiçeklenmeyi teşvik ederken fotoperiyot baş oluşumunu teşvik etmiştir (Kusumadewi ve ark. 2016).

Wu ve ark. (2016), sarımsak da dahil olmak üzere bütün soğanlı bitkilerde vernalizasyonun tamamlanması için bitkinin yaşının ve düşük sıcaklık süresinin önemliliğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada vernalizasyon ve bitki yaşının sarımsakta büyüme ve gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çin’de yaygın olarak yetiştirilen çiçeklenen sarımsak genotipi olan G064 kullanılmıştır. Üç farklı zamanda hasat edilen sarımsaklar (A25, A45, A65: 25, 45, 65 gün) büyüme odalarında 40 gün 4 farklı sıcaklık uygulamasına (T5–0: 5°C / 0°C, T10–5: 10°C / 5°C, T15–10: 15°C / 10°C, T20–15: 20°C / 15°C) (gündüz/ gece) maruz bırakılmıştır. Sonuçta vernalizasyon uygulaması her yaş grubundaki bitkilerde sürgün oranını belirgin şekilde arttırmıştır. En genç bitkiler 10°C / 5°C ‘de en yüksek sürgün oranına (%28.6, %40.1 ve %50.0 sırasıyla A65, A45 ve A25 bitkileri) sahiptirler.

Lucena ve ark. (2016), sarımsakta vernalizasyon mekanizmasının araştırılması için $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ‘de 0, 10, 20, 30 gün uygulaması yapmışlardır. Değerlendirmelerinde baş çapı, pH, titre edilebilir asitlik, toplam çözünebilir şeker, SÇKM gibi parametreler yer almıştır. Sonuçta 10 günlük vernalizasyon süresi sarımsaklarda verim ve kaliteyi arttırmıştır.

2.2. Sarımsakta Dormansi Mekanizması

Soğanda dormansinin fizyolojisini inceleyen birçok araştırma yapılmıştır fakat sarımsakta yapılan araştırma sayısı daha azdır. Sarımsak dormansisi ve depolaması soğan ile benzerlik göstermektedir. Yenilenebilir *Allium* türlerinin başları, büyümeye elverişsiz dönemde canlılığını korumak için doğal dormant organlardır. Kaliforniya ve Japon sarımsak çeşitlerinde yapılan dormansi çalışmasında, her iki ılıman bölgede incelenen çeşitler, soğan dormansi fizyolojisi ile benzerlik göstermiştir. Soğanda olduğu gibi sarımsakta farklı sıcaklıklara farklı tepkiler vermiştir. Sarımsak için sürme sıcaklığı (5 - 10°C) soğana göre 5°C daha düşüktür (Takagi 1990).

Egzotik ve yerel çeşitlerde dikim öncesi sarımsak dişlerine farklı sıcaklık uygulamaları yapılarak sürgün gelişimi ve büyümeye olan etkisini Rahman ve ark. (2003) araştırmıştır. Dormansi mekanizması fizyolojik çalışmalarda ve doku kültürü çalışmalarında problem oluşturmaktadır. Üç farklı sıcaklıkta yürütülen çalışmada, sarımsak dişleri düşük sıcaklık (8-10°C), oda sıcaklığı (27°C), yüksek sıcaklık (40°C)'ta, yüksek-düşük ya da düşük-yüksek sıcaklıkta 14 gün depolanmıştır. Yerel çeşitlerde düşük sıcaklıkta, yüksek-düşük sıcaklığa göre daha fazla sürgün gelişimi görülmüştür. Sonuçta sarımsak başlarına yapılan farklı sıcaklık uygulamalarının dormansinin kırılmasında ve sürgün gelişimini hızlandırmada etkili olduğu görülmüştür.

Dört farklı sarımsak genotipleri hasattan sonra -3, 0 ve 5°C 'de 6 ay süreyle depolanmıştır. Daha sonra ilkbaharda dikilen sarımsakların gelişimleri inceleyen Volk ve ark. (2004) -3°C'de depolanan başlardan olumlu sonuç almışlardır. Sarımsak başları -3°C'de depolanabileceği ve Colorado Front Range koşullarında ilkbahar ekiminin yapılabileceği belirtilmiştir.

Yanmaz ve Ermiş (2005), yaptıkları çalışmada Tunceli sarımsağı çeşidine ait tohumların çimlenme problemini araştırmışlardır. 100 adet tohum 4 tekerrür olarak 0, 5, 1 ve 2 ppm GA₃ + nemli - soğuk (0 - 5°C) (1, 2, 3 ay) uygulaması yapılmıştır. Uygulama yapılan tohumlar optimum koşullarda çimlendirmeye tabi tutulmuştur. Nemli - soğuk uygulamaları GA₃ uygulamalarına göre olumlu sonuç vermiştir. Uygulamalar arasında Tunceli sarımsağı

çeşidinde en iyi çimlenme sonucunu 0°C 'de 3 ay süreyle nemli-soğuk uygulaması vermiştir.

Rahman ve ark. (2006), sarımsakta dormansi mekanizmasının kırılmasına yönelik araştırma yapmışlardır. Yerel ve egzotik sarımsak çeşitlerinde filizlenme ve erken dönem gelişimi üzerine GA₃ ile araştırma yapılmıştır. Denemenin amacı sarımsak dormansisinin kırılması için farklı yolları araştırmaktır. 250 ppm GA₃ konsantrasyonunda en yüksek sürgün gelişimi gözlenirken (%31,67), 500 ppm GA₃ konsantrasyonunda %10'luk en düşük sürgün gelişimi gözlenmiştir. Egzotik çeşitlerde sürgün gelişimi gözlenmemiştir. Sonuç olarak GA₃'ün dormansiyi kırmada ve sürgün gelişimini arttırmada olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir.

Youssef (2013), Klon17 ve Egaseed1 sarımsak genotiplerini kullanarak, dikimden 15, 21, 30 gün önce oda sıcaklığında (27°C) ve düşük sıcaklıkta (10°C, 15°C) depolanan örnekleri karşılaştırmıştır. Depolamadan sonra sıcaklık ve depolama süresinin sarımsak dişlerinin filizlenmesi ve meristem büyümesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Egaseed1 ve Klon17 genotiplerinde en yüksek diş sürgün uzunluğu 10°C 30 gün koşullarında belirlenmiştir. Klon17 genotipi arazi çalışmalarında en iyi çimlenme sonucunu 15°C 30 gün depolama uygulaması vermiştir. Depolama sıcaklığı ve depolama süresi uygulamalarında çeşitler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Egaseed1 genotipinde 15°C'de 15 günde en yüksek yaş verim, kuru verim, ortalama baş ağırlığı baş çapı, diş sayısı elde edilirken, Klon17 genotipinde en yüksek verimler 10°C'de 21 günde elde edilmiştir. Sonuçta düşük sıcaklığın sarımsağın filizlenme yüzdesi, verim, baş ağırlığı, baş çapı ve diş ağırlığına etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır.

Woldeyes ve ark. (2017), yerel sarımsak çeşitlerinde önemli bir sorun olan dormansinin kırılmasıyla ilgili çalışmışlardır. Yerel sarımsak çeşitlerinde dormansinin kırılması, sarımsak dişlerine dikimden önce GA₃ hormonu uygulanması ve soğukta depolama süresi ile ilgilidir. Yerel sarımsak çeşidine 2013 bahar sezonunda GA₃ (0, 125, 250, 375 ppm) ve düşük sıcaklık (7°C) ile 10, 20, 30 gün süreyle uygulama yapılmıştır. Sonuç olarak, Haramaya Doğu Etiyopya yerel sarımsak çeşidinde en iyi filizlenme sonucunu elde etmek

için düşük sıcaklıkta 20 gün depolamak ve 125 ppm GA₃ uygulanması gerektiği sonucuna varmışlardır.

Haramaya Üniversitesi'nde sera koşullarında yürütülen çalışmada, düşük sıcaklıkta (7°C) depolanan (10, 20, 30 gün ve oda sıcaklığında 21°C'de 30 gün) sarımsak dişlerine (kesilmiş ve bütün) distile su ve giberellik asit konsantrasyonları (0, 125, 250, 375 mg/lt) uygulanarak filizlenme üzerine etkisi incelenmiştir. Ortam sıcaklığında depolanan (0 gün) sarımsak dişlerine 250 ve 375 mg/lt GA₃ uygulaması sonucunda filizlenme yüzdesi, çimlenme hızı ve kuru madde miktarı, 125 mg/lt GA₃ ve kontrol grubuna göre önemli bir artış göstermiştir. Sera koşullarında test edilen sarımsak çeşidinde 30 gün düşük sıcaklıkta depolamanın filizlenmeyi hızlandırdığı sonucuna varılmıştır (Bizuayehu 2018).

2.3. Düşük Sıcaklığın Proteomik İle İlişkisi

Siminovitch ve Briggs (1949), akasya bitkisi ile yürüttükleri çalışmaları sonucu çözünebilir proteinler ile dona dayanıklılık arasındaki ilişkiyi ilk olarak ortaya koymuşlardır. Bu bitkide kabuk dokularında sonbahar ayından itibaren çözünebilir proteinlerin artışının dona dayanıklılığın artışı ile paralel olduğu ifade edilmiştir. Kış ayları süresince protein seviyesi yüksek seviyelerde olmasına rağmen bahar aylarından itibaren azaldığı da bildirilmektedir (Sakai ve ark. 1968; Pomeroy ve ark. 1970).

Bae ve ark. (2003), yaptıkları çalışmada Arabidopsis bitkisinin çekirdek proteomunu karakterize etmişlerdir. Bu çalışma Arabidopsisin çekirdek proteomunun ve Arabidopsisin soğuk stresine tepkisini araştırmak amacıyla yürütülmüştür. Çekirdek proteinleri izole edilerek, iki boyutlu (2D) jel elektroforezi ve kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. 2D jelde yaklaşık olarak 500 - 700 adet protein noktası belirlenmiştir. Soğuk strese tepki olarak çekirdek proteomundaki değişiklikler analiz edilmiştir. Soğuk strese yanıt olarak 184 adet proteinden 54 adet protein farklı şekilde ifade olmuştur ve bunlardan 6 tanesi karakterize edilmek üzere seçilmiştir. Bu proteinlerin gen ifadelerinin soğuk stresle değiştiği ortaya konmuştur.

İmin ve ark. (2004), pirinç anterlerine 4 gün boyunca 12°C 'de soğuk uygulaması yapmışlardır. MALDI-TOF ve 2-DE analizleri sonucunda genç mikrospor evresinde 70

farklı protein noktası belirlenmiştir. Soğuk uygulaması sonucunda 18 yeni protein noktası tanımlanmıştır.

Taylor ve ark. (2005), bezelyede düşük sıcaklık uygulaması için bitkilerin normal gece / gündüz ışık sürelerini korurken, hasattan önce 36 saat 4°C'ye maruz bırakmışlardır. Mitokondride yapılan proteomik çalışmalar sonucunda 33 farklı protein noktası farklılık göstermiştir ve bunlardan 20 tanesi düşük sıcaklığa tepki göstermiştir.

Lee ve ark. (2009), pirinç fidelerine uyguladıkları soğuk stresine yanıt olarak köklerdeki protein ifadelerini kütle spektrometresi ve iki boyutlu jel elektroforezi yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmada pirinç fidelerine 10°C'de 24 ve 72 saatlik uygulama yapılmıştır. Sonuçta kütle spektrometresi ile ifadesi artan 27 adet protein ortaya çıkmıştır. Soğuk strese duyarlı proteinlerle birlikte bir grup yeni protein belirlenmiştir.

Zheng ve ark. (2012), düşük sıcaklık stresinde pamukta lif uzamasının adaptasyon mekanizmasını ve bu sırada protein ifadelerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Araştırmada 2 çeşit pamuk kullanılmıştır; bunlardan düşük sıcaklığa toleranslı olan Kemian 1 ve düşük sıcaklığa duyarlı olan Sumian 15'dir. Düşük sıcaklık stresinin sonucunda Sumian 15'de lif uzamasının azalması Kemian 1'e göre daha fazladır. Proteomik analizler sonucunda 37 farklı ifade olan protein, kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır.

Donmaya dayanıklı Samanta buğday çeşidi ile donmaya hassas Sandra buğday çeşidinin kısa süreli (3 gün) ve uzun süreli (21 gün) soğuk uygulamasına (4°C) karşı proteomik tepkileri araştırılmıştır. 2-D ve 2D- DIGE jellerinden çıkan sonuçlara göre 386 farklı ifade olan protein noktası belirlenmiştir. Kütle spektrometresi ile tanımlanması için 58 temsilci protein noktası seçilmiş ve 36 protein tespit edilmiştir. Kışlık çeşitte soğuk uygulaması sonucu artış gösteren proteinler arasında stres tepkisinin ve gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan (Germin E, Lectin, Ver2) proteinler bulunmuştur. Yazlık çeşitte ise hücre bölünmesinde ve bitki büyümesinde rol oynayan (eIF5A2, Glycine- rich RNA-binding protein) proteinler bulunmuştur (Kosova ve ark. 2013).

Tropikal bölgelerde yetişen muz, soğuga hassas olup ticari muz üretiminde ciddi kayıplara neden olmaktadır. Feng ve ark. (2015), muzun soğuk stres koşullarına tepkisini araştırmak için protein ekspresyonundaki değişiklikleri karşılaştırarak proteomik analizi yapmışlardır. Brezilya muz fideleri 24 saat 5°C'ye maruz bırakılmış ve daha sonra ham protein, uygulama ve kontrol yapraklarından fenol ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiştir. İki boyutlu jel elektroforezi ile proteinler ayrılmış ve daha sonra kütle spektrometresi (MS) ile tanımlanmıştır. Yaklaşık 400 protein noktası belirlenmiş ve bunlardan sadece 28 tanesi farklı ifade olmuştur. Antioksidan, patojen direnci ve enerji metabolizması ile ilgili olan proteinlerin ifadesi artarken etilen sentezi, protein sentezi, epigenetik modifikasyonla ilgili olan proteinlerin ifadesi azalmıştır. Soğuk stres koşullarında muzda antioksidan seviyesinde artış keşfedilmiştir.

Düşük sıcaklık petunyanın büyüme ve gelişmesi için önemli bir olumsuz çevre faktörüdür. Petunyanın soğuk stres adaptasyonunun moleküler mekanizmasını anlamak için 2°C'de 5 gün tutulan petunya tohumlarının ITRAQ teknolojisi kullanılarak protein profili belirlenmiştir. Belirlenen 2430 protein noktasından 117 tanesi düşük sıcaklık stresi sonucunda farklı ifade olmuştur. Soğuga duyarlı 44 farklı protein noktası tespit edilmiştir. Bulunan protein gruplarının % 40,2'si kloroplastta ifade olmuştur. Bu sonuca göre kloroplastın soğuk stresinden daha çok etkilendiği öne sürülmüştür (Zhang ve ark. 2016).

Hurtado ve arkadaşları (2015), 'Coreano' sarımsak çeşidinden elde edilen başlara soğuk uygulaması yapmışlardır. Bu çalışmanın amacı düşük sıcaklık uygulayarak sarımsak dişlerindeki protein profilinde ki değişiklikleri incelemektir.

Çalışmada 2 uygulama yapılmıştır;

1.uygulama oda sıcaklığında (23 °C)

2.uygulama 5 °C'de 5 hafta süre ile depolanmıştır.

Dişlerin meristemlerinden çıkartılan çözünebilir protein 2D jel elektroforezi ile ayrılmıştır. Düşük sıcaklık koşullarında 22 proteinin ifadesi artarken, 37 proteinin ifade düzeyi

azalmıştır. Sonuç olarak, sarımsak başlarına düşük sıcaklık uygulamasının protein profilinde değişikliğe neden olduğu ortaya konmuştur.

Çeşitli bitkilerde çözünebilir proteinler ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Fakat sarımsakta düşük sıcaklık, dinlenme mekanizması ve çözünebilir proteinle olan ilişkileri konularında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu konuda özellikle spesifik proteinlerin dinlenmenin kırılmasındaki rolleri yönünden daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma 2016 - 2018 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Bitki Materyali

Yaptığımız çalışmada materyal olarak Kastamonu sarımsağı ve PI515971 kodlu (Pulman (Washington, ABD) şehrindeki Batı Bölgesel Bitki Gen Bankası WRPIS-Western Regional Plant Introduction Station'dan temin edilmiştir) sarımsak genotipi kullanılmıştır. Daha önce projede kullanılmak üzere 2015 yılında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazisinde yetiştiriciliği yapılmıştır. Genotip başları soğukta (4°C) ve oda sıcaklığında (21°C) 4, 8 ve 12 hafta depolama süresiyle muhafaza edilmiştir. Örneklemeler sıcaklık uygulamasından önce (0 hafta), 4, 8 ve 12 hafta depolama sonunda yapılmıştır. Analizlerin gerçekleştirileceği zamana kadar örnekler -85°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2. Protein Ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyon işlemleri daha önceden belirlenen protokole göre yapılmıştır (Gülen 2000). Kullandığımız kimyasalların bozulmaması ve proteinlerin parçalanmaması için işlemler 4°C'de yapılmıştır.

Protein ekstraksiyonu işleminde kullanılan ekstraksiyon bufferı hazırlamak için ilk olarak 100 ml borate buffer hazırlanmıştır. Borate buffer içerisinde 50 mM Borax (Sodium tetraborate) ve 50 mM Askorbik asit bulunduğu için kullanmadan önce taze hazırlanması gerekmektedir. Bunun için 1908 g Borax, 0,88 g Askorbik Asit, 50 ml dH₂O ile çözülmüş ve 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra içerisine 1000 µl PMSF ve 1000 µl β-mercaptaethanol eklenerek buz içerisinde kullanılmıştır.

Her örnek için hazırlanan santrifüj tüplerinin içerisine 0,35 g PVPP (polyvinylpolyprolydon) eklenmiştir. -85°C'lik derin dondurucudan çıkartılan örneklerin seramik havan yardımıyla 1 g örnek: 5 ml ekstraksiyon buffer kullanarak iyice ezilmesi

sağlamıştır. Santrifüj tüpleri 4 sn vortekslenerek iyice karışmaları sağlanmıştır. Daha sonra örnekler 26 000 g devirde 4°C’de 1.5 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üstteki sıvı kısım 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek alınmış, dipte kalan tortu kısım ise atılmıştır.

3.3. Toplam Çözünabilir Protein Analizi

TÇP miktarının belirlenmesinde Gülen (2000) tarafından belirtilen ‘Bradford Protein Assay’ yöntemi kullanılmıştır. Protein standardı olarak BSA (Bovine Serum Albumine) kullanılmıştır. Renk değişimi için, boya maddesi olarak ‘Protein Assay Dye’ (BioRad, 500-0006) bütün örnekler ve standartlara eklenmiştir. Spektrofotometredeki (UVDU 530 model, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, ABD) absorbans okumalar ise 595 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.1’de örneklerin ve standartların hazırlanması gösterilmiştir. TÇP miktarı standartlar esas alınarak mg/g TA olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. Ekstrakte edilen çözünebilir protein miktarının ‘Bradford Protein Assay’ yöntemine göre belirlenmesi için standart ve örneklerin hazırlanması (Gülen 2000)

Örnek ve Standart	Konsantrasyon (µg/µl)	BSA (µl)	Ekstraksiyon Buffer (µl)	HCl (µl)	dH ₂ O (µl)	Dye (ml)
A	0	0	10	10	80	3.5
B	10	2	8	10	80	3.5
C	20	4	6	10	80	3.5
D	30	6	4	10	80	3.5
E	40	8	2	10	80	3.5
F	50	10	0	10	80	3.5
Örnek1	10	-	-	10	80	3.5
	20	-	-	10	70	3.5

3.4. SDS-PAGE Analizi

3.4.1. Örneklerin SDS-PAGE İçin Hazırlanması

Ekstraksiyon işlemi sonucunda santrifüjden alınan protein solüsyonu 1 ml’lik eppendorf tüplere eklenmiştir. Üzerine %10’luk TCA (trichloro acetic asit) ‘dan 110 µl eklenmiştir. İyiçe vortekslenerek 30 dk buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi bittikten sonra 4°C’de 16 000 rpm devirde 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı kısım dökülerek dipteki protein pelleti (Şekil 3.1) 3 kez -20°C’de ki asetonla yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra 4°C’de 16 000 rpm devirde 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi bittikten sonra ucu yakılarak kapatılan mikro pipet yardımıyla protein pelleti fiziksel olarak parçalanmıştır. Ağzı açık olarak bırakılan eppendorf tüpler karanlıkta, oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat süreyle asetonun uçması için bekletilmiştir. Kuruyan protein çözeltisi SDS-PAGE örnek yükleme solüsyonunu hazırlamada kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Eppendorf tüp içerisinde çöktürülen protein pelleti

Yükleme buffer'ı için 6,5 ml Tris, 10 ml Glycerol, 2 g SDS 100 ml dH₂O ile çözünerek hazırlanmış ve stok solüsyon olarak buzdolabında 4°C'de saklanmıştır. Her örnek için 100 µl yükleme solüsyonuna %5 β-mercaptoethanol ve eser miktarda Bromphenol Blue Dye eklenerek vortekslenmiştir. Her bir örnek üzerine hazırladığımız bufferdan 100 µl eklenmiştir. Örnek tüpleri kaynar suda 5 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra 16 000 g devirde oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edilerek proteinler yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Jel kasetler hazır hale gelince her bir örnek için 30 µg protein olacak şekilde jel kuyucuklarına yükleme işlemi yapılmıştır.

3.4.2. SDS-PAGE İçin Jel Hazırlanması

SDS-PAGE hazırlanmasında Mini Protean III dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad, CA, ABD) kullanılmıştır. SDS-PAGE için %12,5'lük ayırma jeli ve %4'lük örnek yükleme jeli olmak üzere iki farklı jel hazırlanmıştır.

%12,5'luk ayırma jeli için aşağıdaki kimyasallar kullanılmıştır;

- dH ₂ O	2000 µl
- 1 M Tris- HCl Buffer pH 8.8	4400 µl
- %1 SDS	1200 µl
- %36 Acrylamid/ Bis	4200 µl
- %3 Amonyum Persülfat	200 µl
- TEMED	8 µl

Kimyasallar sırayla karıştırılmış en son amonyum persülfat ve TEMED eklenmiştir. Pipet yardımıyla iyice karışması sağlanmıştır. Kurulmuş olan cam kasetlerin içerisine 3,5 ml bu karışımdan eklenmiştir. Üzerine 200 µl dH₂O eklenerek 45 - 60 dakika polimerizasyona bırakılmıştır. Polimere olan jelin üzerine eklediğimiz saf su bir peçete yardımıyla çekilmiştir. Jelin üzerine taraklar yerleştirilmiştir.

%4'lük yükleme jeli ise aşağıdaki kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır;

- dH ₂ O	3325 µl
- 1 M Tris Buffer pH 6.8	620 µl
- %36 Acrylamid/ Bis	500 µl
- %3 Amonyum Persülfat	50 µl
- TEMED	8 µl

Kimyasallar karıştırıldıktan sonra tarakların üzerinden 1 ml yükleme jeli eklenmiştir. Polimerizasyon işlemi için 45 - 50 dakika beklenmiştir. Daha sonra taraklar çıkartılarak cam kasetler elektroforez işlemi için tank içerisine yerleştirilmiştir.

Elektroforez 10x Running Buffer için 30 g 250 mM Tris Base, 144 g 1.92 Glycine ve 5 g %5 SDS 1000 ml dH₂O ile çözdürülmüştür. Kullanılacağı zaman 40 ml stok solüsyondan alınarak 400 ml' ye saf su ile tamamlanmıştır. Tankın içerisine kasetlerin üzerine gelecek şekilde doldurulmuştur. Daha sonra örnekler tarakların kuyucuklarına mikro pipet yardımıyla dikkatlice yüklenmiştir (Şekil 3.2). Jelin ilk kuyucuğuna 5 µg protein moleküler standardı yüklenmiştir.



Şekil 3.2. Elektroforez tankı içerisinde cam kasetlere mikro pipet yardımıyla protein örneklerinin yüklenmesi

Thermo EC 1000–90 güç kaynağı kullanılarak 250 V ve 40 mA'lık elektrik akımıyla 1 – 1.5 saat örneklerin jelin üzerinde yürütülmesi sağlanmıştır.

3.4.3. Jelin Boyanması

Jeller 'Coomassie Brilliant Blue G–250' sistemine göre boyanmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra cam kasetler birbirinden dikkatlice ayrılarak jeller %12'lik TCA'nın içerisine konmuştur. İki saat boyunca yavaş modda çalkalayıcıda bekletilerek proteinlerin fiksasyonu sağlanmıştır. Daha sonra saf su yardımı ile 2 - 3 defa yıkanan jeller TCA'dan arındırılmıştır. Metanolde seyreltilmiş Coomassie Blue G–250 (Coomassie blue G-250:metanol; 4:1) solüsyonuna alınan jellerin yavaş modda çalışan çalkalayıcıda gece boyunca boyama işlemine devam edilmiştir. Protein bantları mavi renkle boyanmıştır. Boya solüsyonundan çıkarılan jeller %25'lik metanol içerisinde 5 dakika çalkalayıcıda bekletilerek fazla boyadan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra jeller 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Protein bantları floresan ışık altında incelenmiştir ve saf su içerisinde ağzı kapalı olarak 4°C de muhafaza edilmiştir.

3.4.4. Protein Bantlarının Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

Molekül ağırlığı bilinen standart bantlar esas alınmıştır. Jel boyu ve bantların başlangıç noktasına olan uzaklıkları ölçülerek 3.1’de gösterilen formüle göre Rf değerleri hesaplanmıştır.

$$Rf = BU \div JB \quad (3.1)$$

BU = Protein bandının jelin başlangıç noktasına olan uzaklığı

JB = Jel boyu

Protein standartlarından bulunan Rf değerleri ile protein eğrisi elde edilmiştir. Bulunan bantların molekül ağırlıkları excel programında logaritma hesaplamalarıyla belirlenmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları arasındaki fark %5 önem seviyesinde SPSS 22.0 programında analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Depolama Süresince Dişlerdeki TÇP İçeriğindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, PI515971 ve Kastamonu sarımsak genotiplerinin 4°C ve 21°C’de (kontrol grubu) 4 hafta, 8 hafta ve 12 hafta süre ile depolanması sonucunda elde edilen örneklerdeki protein profilleri SDS - PAGE yöntemiyle incelenmiştir. PI515971 ve Kastamonu genotiplerinin sıcaklık ve depolama sürelerine göre TÇP miktarındaki değişimin istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.1., Şekil 4.2., Çizelge 4.1., Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.’de verilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda PI515971 genotipinde 4°C sıcaklık uygulamasında depolama süreleri arasında TÇP içeriğinde önemli bir artış söz konusudur. 21°C sıcaklık uygulamasında ise önemli bir farklılık belirlenmemiştir. Depolama sürelerine göre en yüksek TÇP miktarı 4°C’de 12 hafta depolama uygulamasında belirlenmiş ve bu değişim istatistiksel olarak %5 önem seviyesinde anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1., Çizelge 4.1.). Bu sonuç, PI515971 genotipinde farklı sıcaklık ve farklı depolama sürelerinde örneklerden elde edilmiş olan TÇP miktarlarına göre, hem de Kastamonu genotipinde farklı sıcaklık ve farklı depolama sürelerinde depolanan örneklerden elde edilen TÇP miktarlarına göre belirlemiş olan en yüksek (15,09 mg/g TA) protein içeriğidir (Çizelge 4.1., Şekil 4.2.). Başlangıç miktarına göre (9,72 mg/g TA) yaklaşık 1.55 kat artmıştır. 4. ve 8. hafta sonunda ise TÇP içerikleri sırasıyla 11,95 mg/g TA ve 12,83 mg/g TA olarak belirlenmiştir.

PI515971 genotipinde 21°C sıcaklık uygulamasına bakıldığı zaman, başlangıç TÇP miktarına göre (9,72 mg/g TA) depolama süreleri bazında bir artış söz konusudur. Ancak bu artış 4 hafta depolama sonunda başlangıç TÇP miktarına göre istatistiksel olarak önemli iken, 4, 8 ve 12 hafta depolama değerleri arasında ise önemli bulunmamıştır. On iki hafta depolama sonunda TÇP içeriği (12,25 mg/g TA) başlangıca göre 1.26 kat artmıştır. PI515971 genotipinde 4°C ve 21°C sıcaklık uygulamaları ve farklı depolama süreleri sonuçları karşılaştırıldığında Çizelge 4.1. ‘den de görüldüğü gibi en yüksek TÇP miktarı 4°C’de 12 hafta depolama uygulamasından elde edilmiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı gibi PI515971 genotipinde düşük sıcaklık uygulaması TÇP miktarını olumlu derecede

etkilemiştir. Sarımsak dişlerinin düşük sıcaklık ve uzun depolama uygulamaları sonucunda TÇP içerikleri yükselmiştir.

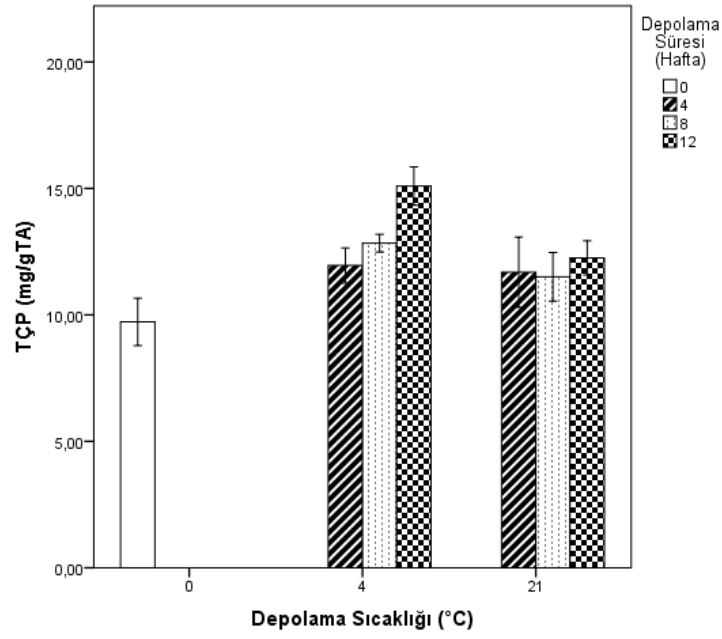
Analiz sonuçlarına göre Kastamonu genotipinde 4°C’de depolama süreleri arasında protein içeriklerinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur. Başlangıç TÇP değerine göre (10,44 mg/g TA) 8. hafta TÇP değeri (13,85 mg/g TA) 1.32 kat artış göstermiştir. 4 ve 8.haftada artış gösteren TÇP değeri 12. haftada (12,61 mg/g TA) azalma göstermiştir. Kastamonu genotipinde en yüksek TÇP miktarı 4°C’de 8 hafta depolama sonunda gözlenmiştir.

Kastamonu genotipinin 21°C sıcaklık uygulamasında ise 4, 8 ve 12 hafta depolama sonundaki TÇP miktarındaki değişim başlangıç değerine (10,44 mg/g TA) göre istatistiksel olarak %5 önem seviyesinde anlamlı bulunmamıştır. 4°C ve 21°C sıcaklık uygulamaları incelendiğinde Şekil 4.2.’den de görüldüğü gibi en yüksek değerler 4°C uygulamasında elde edilmiştir.

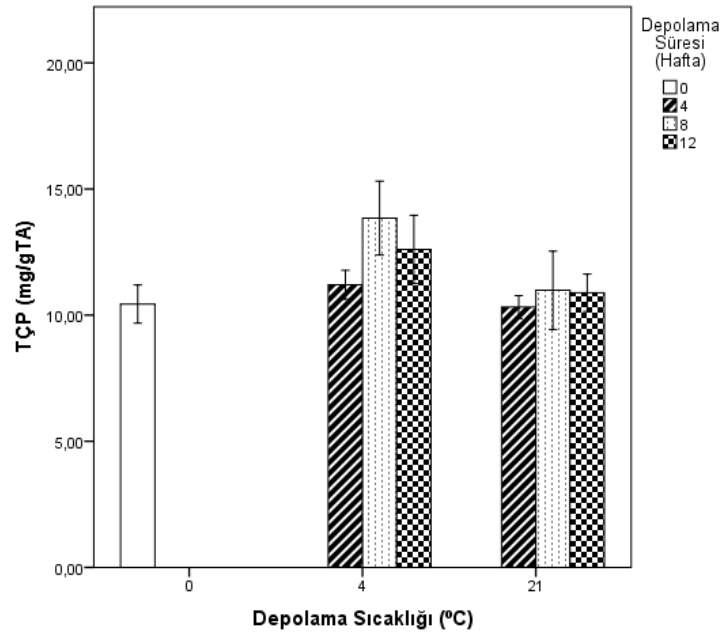
Elde edilen veriler incelendiğinde, PI515971 ve Kastamonu genotiplerine ait sarımsak dişlerine düşük sıcaklık (4°C) uygulaması sonucunda dişlerin TÇP miktarı artmıştır. 21°C’de depolama sonucunda PI515971 genotipinde TÇP içeriğinde artış görülürken Kastamonu genotipindeki değişiklik istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 4.2.).

Çizelge 4.1. PI515971 ve Kastamonu sarımsak genotiplerinde depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre TÇP miktarı (mg/g TA)

Genotip	Depolama Sıcaklığı (°C)	Depolama Süresi	TÇP (mg/gTA)
PI515971	4	0 hafta	9,72±0,84
		4 hafta	11,95±0,69
		8 hafta	12,83±0,35
		12 hafta	15,09±0,76
	21	0 hafta	9,72±0,84
		4 hafta	11,69±1,39
		8 hafta	11,51±0,97
		12 hafta	12,25±0,68
Kastamonu	4	0 hafta	10,44±0,28
		4 hafta	11,21±0,23
		8 hafta	13,85±0,6
		12 hafta	12,61±0,55
	21	0 hafta	10,44±0,27
		4 hafta	10,32±0,18
		8 hafta	10,99±0,63
		12 hafta	10,89±0,3



Şekil 4.1. PI515971 sarımsak genotipinde depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre TÇP içeriğinin değişimi (mg/g TA)



Şekil 4.2. Kastamonu sarımsak genotipinde depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre TÇP içeriğinin değişimi (mg/g TA)

PI515971 ve Kastamonu genotiplerine ait depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre toplam TÇP değişimleri ve interaksyonları Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3. de verilmiştir. PI515971 genotipinde 4°C’de depolanan örneklerde (13,29 mg/g TA) 21°C’de depolanan örneklere (11,82 mg/g TA) göre daha yüksek TÇP miktarı elde edilmiştir. Bununla birlikte her iki sıcaklıkta da protein miktarları kontrol grubuna (9,72 mg/g TA) göre artmıştır. Depolama sürelerine göre protein miktarları incelendiğinde en yüksek protein miktarı 12 hafta depolama uygulamasında belirlenmiştir (13,67 mg/g TA). Kontrol grubuna göre her iki sıcaklık uygulamasında da depolama süreleri boyunca protein miktarları artış göstermiştir. PI515971 genotipinde TÇP miktarı için depolama sıcaklığı ve depolama süresi arasındaki interaksiyon ise önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. PI515971 sarımsak genotipinin TÇP miktarının (mg/g TA) depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksyonları

Değişkenler	TÇP Miktarı (mg/g TA)
Depolama Sıcaklığı(°C)	
0	9,72 a ^z
4	13,29 b
21	11,82 c
Depolama Süresi	
0 Hafta	9,72 a
4 Hafta	11,82 b
8 Hafta	12,17 b
12 Hafta	13,67 c
ANOVA	
Depolama Sıcaklığı * Süre	Ö.D

^z; Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

ÖD; %5 düzeyinde önemli değil.

Kastamonu genotipinde 4°C’de depolanan örneklerde (12,56 mg/g TA) 21°C’de depolanan örneklerde (10,73 mg/g TA) göre daha yüksek TÇP miktarı elde edilmiştir. Fakat 21°C’de depolanan örneklerden elde protein miktarı ile başlangıç protein miktarı arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Depolama sürelerine göre en yüksek protein miktarı 8. haftada belirlenmiştir (12,42 mg/g TA). 8 ve 12 hafta depolama süreleri sonucunda elde edilen protein miktarları kontrol grubuna göre artış göstermiştir. 4 hafta depolama sonucunda bulunan protein miktarı ile başlangıç protein miktarı arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Kastamonu genotipinde TÇP miktarının depolama sıcaklığı ve depolama süresi arasındaki interaksiyon %1 önem seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Kastamonu sarımsak genotipinin TÇP miktarının (mg/g TA) depolama sıcaklığı ve depolama sürelerine göre karşılaştırmalı analizleri ve interaksiyonları

Değişkenler	TÇP Miktarı (mg/g TA)
Depolama Sıcaklığı (°C)	
0	10,44 a ^z
4	12,56 b
21	10,73 a
Depolama Süresi	
0 Hafta	10,44 a
4 Hafta	10,76 a
8 Hafta	12,42 b
12 Hafta	11,75 c
ANOVA	
Depolama Sıcaklığı * Süre	**

^z; Aynı sütun ve değişkenlerde farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında %5 düzeyinde farklılık vardır (Duncan).

**; %1 düzeyinde önemli.

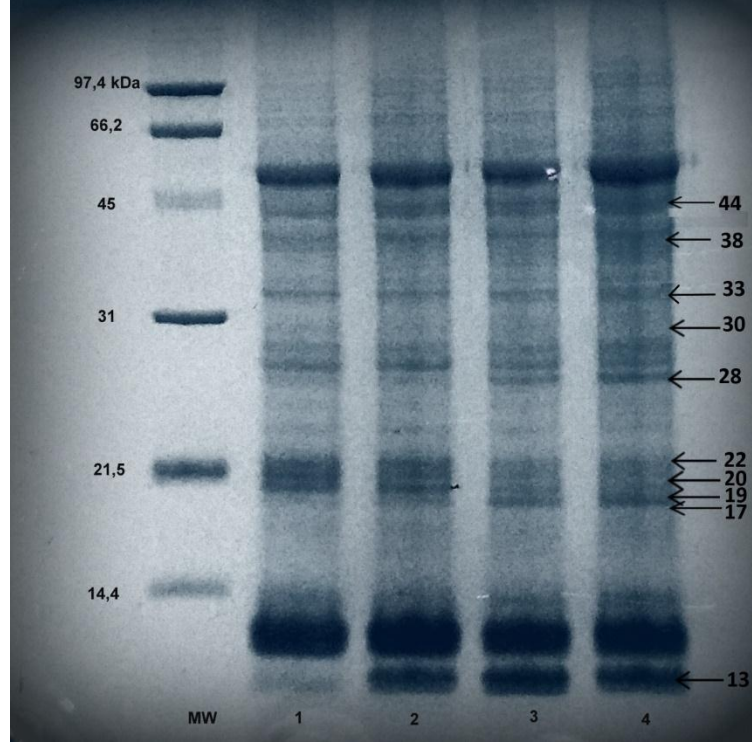
PI515971 ve Kastamonu genotiplerinde 4°C sıcaklıkta TÇP miktarları incelendiğinde PI515971 genotipinde depolama süresi arttıkça kontrol grubuna göre protein içeriğinde istatistiksel olarak önemli artışlar belirlenmiş ve en yüksek artış 12 hafta depolama süresinde bulunmuştur. Kastamonu genotipinde ise 4°C 8 hafta depolama süresinde en yüksek protein içeriği belirlenmiştir. Kastamonu genotipinde 21°C sıcaklıkta depolama sürelerinin artmasına rağmen protein içeriklerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde değişiklik olmamıştır (Çizelge 4.1.).

4.2. SDS - PAGE Profilleri

Araştırmada Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerine ait sarımsak dişlerinde düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı uygulamalarında protein profillerinde ki değişimlerin belirlenmesi için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bütün örneklerin SDS-PAGE analizleri en az 3 kez tekrarlanmıştır. Bütün sonuçlar birbirine benzer çıkmıştır.

PI515971 genotipinde farklı sıcaklık ve depolama süreleri bazında yapılan SDS-PAGE jellerinin görüntüleri incelendiğinde 10 tane belirgin şekilde farklı ifade olan protein bandı belirlenmiştir (Şekil 4.3.). SDS-PAGE jel görüntüsünü en aşağıdan yukarıya doğru incelendiğinde kontrol grubunda belirgin olmayıp ancak 4°C sıcaklıkta depolama sonucu ifade düzeyi artan yaklaşık 13 kDa ağırlığında bir protein bandı görülmektedir. Bu proteinin ifade düzeyi 4. haftadan itibaren artış göstermiş ve depolama süresince aynı kalmıştır. Yaklaşık 17 kDa ağırlığında olduğu tahmin edilen diğer bir proteinin ifade düzeyi başlangıca göre depolama süresi boyunca artış göstermiş ve en belirgin bant profili 12 hafta depolama sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu proteinin hemen üstünde yaklaşık 19, 20, 22 kDa ağırlığındaki proteinlerin ise depolama süresince ifade düzeyleri azalmıştır. Yaklaşık 28 kDa ağırlığındaki proteinin depolama süresince ifade düzeyinde artış görülmüştür. Bu proteinin hemen üstündeki yaklaşık 30 kDa ağırlığında olan proteinin ise depolama süresince ifade düzeyi azalmıştır. Yaklaşık 33 kDa ağırlığındaki proteinin ifade düzeyi 12 hafta depolama süresi sonucunda en yüksek düzeye ulaşmıştır. Yaklaşık 38 kDa ağırlığında farklı ifade olan proteinin ise depolama süresince ifade düzeyi azalmıştır. 44 kDa ağırlığında farklı ifade olduğu belirlenen protein ise 4 hafta depolama sonucu ortaya çıkmış

ve 12 hafta depolama sonunda en yüksek ifade düzeyine ulaşmıştır. Bu analiz sonucundan da anlaşıldığı üzere, PI515971 sarımsak genotipi başlarının düşük sıcaklıkta depolanması sonucunda protein profilinin belirgin şekilde değiştiği görülmektedir.

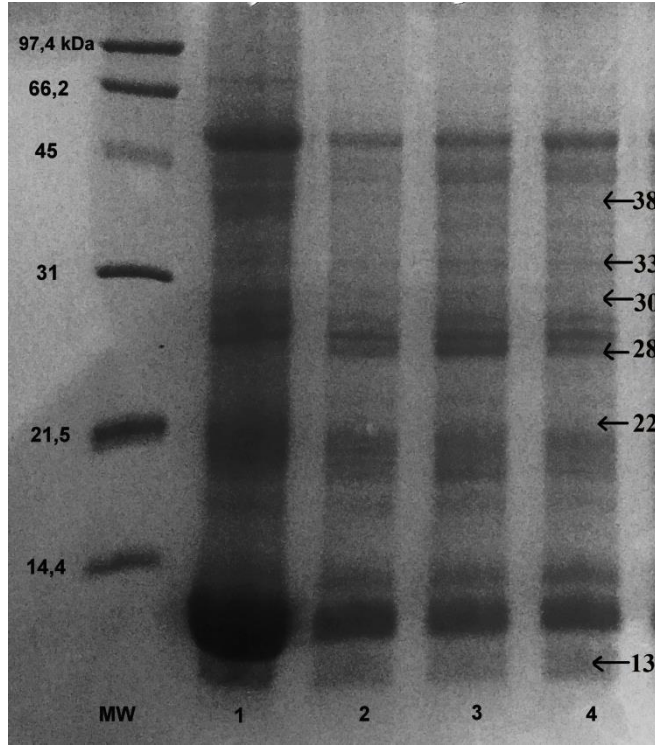


Şekil 4.3. PI5159171 sarımsak genotipi dişlerinde 4°C’de farklı depolama sürelerinde SDS-PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: 0. hafta, 2: 4. hafta, 3: 8. hafta, 4: 12. hafta.

PI515971 genotipinin 21°C’de depolanması sonucunda 6 tane belirgin şekilde farklı ifade olan protein bandları belirlenmiştir. SDS-PAGE görüntülerine göre 13 kDa ağırlığındaki proteinin 4°C’deki ifade düzeyi artarken 21°C’deki ifade düzeyinde çok belirgin bir değişme belirlenmemiştir. Yaklaşık 22 kDa ağırlığında depolama süresi arttıkça ifade düzeyi azalan protein bandı belirlenmiştir. 28 ve 33 kDa ağırlığındaki belirlenen proteinlerin ise depolama süresi boyunca ifade düzeyi artmıştır. 30 ve 38 kDa ağırlığındaki proteinlerin ise 21°C’de depolama süresi boyunca ifade düzeyleri azalmıştır (Şekil 4.4.).

PI515971 genotipinde 4°C ve 21°C’de farklı ifade olan protein profilleri karşılaştırıldığında düşük sıcaklıkta depolama ile oda sıcaklığında depolamadaki protein

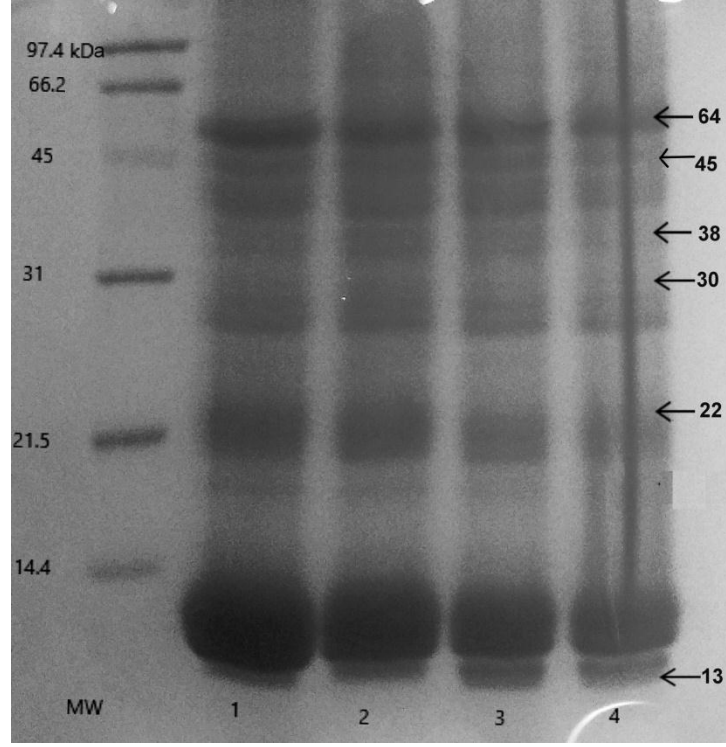
profillerinde önemli farklılıklar belirlenmiştir. 4°C’de depolamanın protein ifade düzeyine ve değişikliğine daha çok etkili olduğu görülmüştür. PI515971 genotipinde düşük sıcaklıkta protein ifade düzeylerinde değişikliğin daha fazla olması, düşük sıcaklıkla birlikte dinlenmenin kırılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.4. PI515971 sarımsak genotipi dişlerinde 21°C’de farklı depolama sürelerinde SDS-PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: 0. hafta 2: 4. hafta, 3: 8. hafta, 4: 12. Hafta.

Kastamonu genotipinde 4°C’de Şekil 4.5. de görüldüğü gibi yaklaşık 13 kDa ağırlığında olduğu tahmin edilen proteinin 8 ve 12 hafta depolama uygulaması sonucunda ifade düzeyinde artış belirlenmiştir. Yaklaşık 22 kDa ağırlığındaki proteinin başlangıç ve 4 hafta depolama süresi sonundaki ifade düzeyine göre 8 ve 12 hafta depolama süresi sonunda ifade düzeyi azalmıştır. Yaklaşık 30 kDa ağırlığındaki proteinin ise ifade düzeyi 8 hafta depolama süresi sonucunda azalmaya başlamıştır ve depolama süresince aynı kalmıştır. Yaklaşık 38 kDa ağırlığındaki proteinin 8 ve 12 hafta sonunda ifade düzeyi başlangıca göre

azalmıştır. Yaklaşık 45 kDa ve 64 kDa ağırlığındaki proteinlerin ifade düzeyleri depolama süreleri boyunca azalmıştır.



Şekil 4.5. Kastamonu sarımsak genotipi dişlerinde 4°C’de farklı depolama sürelerinde SDS-PAGE toplam protein profilleri. MW: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: 0. hafta, 2: 4. hafta, 3: 8. hafta, 4: 12. hafta.

Kastamonu genotipinde 21°C’de SDS-PAGE jel analizleri sonucunda net görüntüler elde edilemediğinden dolayı çok başarılı sonuç alınamamıştır. 4°C’de depolamanın protein ifade düzeyine ve değişikliğine daha çok etkili olduğu belirlenmiştir. Kastamonu genotipinde düşük sıcaklıkla protein ifade düzeylerindeki değişikliğin, düşük sıcaklıkla birlikte dinlenmenin kırılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sarımsakta hasattan sonra ekime kadar ya da tüketim için kullanılacaksa tüketim zamanına kadar başlardaki protein içeriğindeki değişimler ve farklı ifade olan proteinler konusunda çok fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüksek lisans tezi kapsamında iki farklı muhafaza sıcaklığında sarımsak dişlerinin protein içeriği ve protein ifadesindeki değişimler belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki genotipte de 4°C’de TÇP miktarının 21°C’ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu düşük sıcaklıkta depolamanın sarımsakta TÇP miktarını arttırdığını göstermektedir. Kastamonu ve PI515971 genotiplerinin TÇP içerikleri karşılaştırıldığında en yüksek protein içeriği PI515971 genotipinde 4°C’de 12 hafta depolama uygulamasında 15,09 mg/g TA olarak belirlenmiştir. 21°C’de ise en yüksek içeriği 12 hafta depolama uygulaması sonucunda 12,25 mg/g TA olarak yine PI515971 genotipinde belirlenmiştir. Kastamonu genotipinde 4°C 8 hafta depolama uygulamasında diğer depolama sürelerine göre en yüksek protein içeriği (13,85 mg/g TA) belirlenmiştir. Kastamonu genotipinin 21°C sıcaklıkta farklı depolama sürelerinde ise protein içeriklerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde değişiklik olmamıştır (Çizelge 4.3.). Bu sonuçlar sarımsak genotiplerinin depolama sıcaklığı ve süresine verdikleri tepkilerin farklı olduğunu ve Kastamonu genotipinin, PI515971 genotipine göre daha uzun dinlenme süresi ve daha düşük sıcaklık istediği olduğunu göstermektedir.

SDS-PAGE analizleri sonucunda PI515971 ve Kastamonu genotiplerinin 4°C’de depolamasında başarılı sonuçlar alınırken, Kastamonu genotipinde 21°C’de çok net görüntüler elde edilememiştir. PI515971 genotipinde düşük sıcaklıkta depolama sonucunda protein profilleri açısından önemli derecede farklılıklar bulunmuştur. PI515971 genotipinde düşük sıcaklıkta ifade düzeyi değişikliği gösteren proteinlerin bazıları Kastamonu genotipinde benzer bir şekilde ifade düzeyini değiştirmiştir. Örneğin yaklaşık 30 kDa ağırlığında kontrol grubunda belirlenen soğuğa hassas proteinin PI515971 genotipinde olduğu gibi Kastamonu genotipinde de depolama süresi arttıkça ifade düzeyi azalmıştır.

Benzer ifade gösteren proteinler olduğu gibi iki sarımsak genotipi arasında farklı ifade profili gösteren proteinler de belirlenmiştir. Örneğin PI515971 genotipinin SDS-PAGE jel profilinde net bir şekilde ayrılan ve ifade düzeyi depolama süresince artan 28 kDa ağırlığında bir protein belirlenmiştir. Bu protein Kastamonu genotipinde belirlenmemiştir. Bu sonuçlar düşük sıcaklıkta depolamada protein ifade profili yönünden genotipler arasında farklılıklar olabileceğini göstermektedir. Bu farklılığın iki genotipin dormansi ve vernalizasyon isteği sürelerinin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Kastamonu genotipi PI515971 genotipine göre daha geççi ve dormansi süresi daha uzun bir genotiptir.

SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre PI515971 genotipinde 4°C’de depolama sonucunda 5 proteinin ifade düzeyi artmış, 5 proteinin ifade düzeyi azalmıştır. 21°C’de depolama sonucunda 3 proteinin ifade düzeyi artarken 3 proteinin ifade düzeyi azalmıştır. Kastamonu genotipinde 4°C’de depolama sonucunda 5 proteinin ifade düzeyi azalmış ve 1 proteinin ifade düzeyi artmıştır. Hurtado ve ark. (2015), sarımsak dişlerini 5°C ve 23°C’de 5 hafta depolayarak, dişlerin protein profillerindeki değişiklikleri incelemişlerdir. Düşük sıcaklık koşullarında 22 proteinin ifadesi artarken, 37 proteinin ifade düzeyi azalmıştır. Sonuç olarak, sarımsak başlarına düşük sıcaklık uygulamasının protein profilinde değişikliğe neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar sarımsakta dinlenmenin kırılması sürecinde bazı proteinlerin yukarı doğru düzenlendiğini (upregulated) bazı proteinlerin ise aşağı doğru düzenlendiğini (downregulated) göstermektedir. Sarımsak ve diğer *Allium* türlerinde yapılan çalışmalarda dinlenmenin kırılması sırasında GA₃ miktarının arttığı, ABA miktarının ise azaldığı belirtilmektedir (Rahman ve ark. 2003, 2006). Bu tez çalışmasında farklı ifade olduğu belirlenen proteinlerin tanımlanması henüz yapılmamıştır. Bu nedenle bu proteinlerin GA ve ABA biyosentezi ile ilişkili olup olmadığının sonraki çalışmalarda ortaya çıkarılması hedeflenmektedir.

Sarımsakta proteomik ile ilgili çok fazla çalışma yapılmamış olmasından dolayı elde edilen bulgular diğer bitki türlerinin proteomik çalışmalarının sonuçları ile tartışılmıştır. Bu çalışmalarda bizim elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde düşük sıcaklıkta ya da düşük sıcaklık stresi uygulamalarında protein ifadesinde önemli değişiklikler belirlenmiştir. Örneğin

Arabidopsis bitkilerinin soğuk stresine tepkisini araştıran çalışmada, 5 haftalık Arabidopsis bitkileri 1 hafta boyunca soğuk stresine (6°C ve 10°C) maruz bırakılmıştır. 6°C'de depolama sonucunda 18 proteinin ifade düzeyi artarken 4 proteinin ifade düzeyi azalmıştır. Proteom analizi sonucunda tanımlanan proteinlerin soğuk stresi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Amme ve ark. 2006). Diğer bir çalışmada ise Kosova ve ark. (2013), dona dayanıklı ve dona hassas buğday çeşitlerini 4°C'de 3 ve 21 gün depolamışlardır. Proteomik analizler sonucunda hücre bölünmesi, bitki büyümesi, stres tepkisi ve gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan 36 farklı protein belirlemiştir. Cheng ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, patateste soğuk uygulamasının protein profiline etkilerini araştırılmıştır. Yumrular 4°C'de ve 25°C'de 30 gün depolanmış ve 2D-DIGE analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda 25 proteinin farklı ifade olduğunu belirlenmiştir. Bu proteinlerin patates yumrularını düşük sıcaklık stresinden korumaya yönelik savunma proteinleri olduğu ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada sarımsak dişlerini düşük sıcaklıkta depolamanın protein profilini etkilediği görülmüştür. Her iki genotipte de SDS-PAGE analizlerinde farklı ifade olan protein bantları belirlenmiştir. Ayrıca her iki genotipte de protein içerikleri 4°C'de depolamada başlangıç miktarına göre artış göstermiştir. Sarımsakta düşük sıcaklıkta farklı depolama sürelerinde farklı ifade olduğu belirlenen bu proteinlerin daha sonra yapılacak çalışmalarla karakterize edilmesi, sarımsakta dinlenme ve vernalizasyon mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

- Acar, H. 2006.** Kışlık buğdayın (*Triticum Sp.*) in vitro koşullarda vernalizasyonu. *Doktora Tezi*. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Ade-Ademilua, O.E., Iwaotan, T.O., Osai, T.C. 2009.** Preplanting (cold) treatment of *Allium sativum* cloves improves its growth and yield under open field and open shade conditions. *Journal of Plant Sciences*, 4(3): 49-58.
- Akan, S. 2014.** Siyah sarımsak. *Gıda*, 39 (6): 363-370.
- Amme, S., Matros, A., Schlesier, B., Mock, H.P. 2006.** Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-Technology. *Journal of Experimental Botany*, 57 (7): 1537–1546.
- Anonim, 1995.** Nature's amazing nutritional medicinal wonder food woodland publishing, www.nutraceutical.com/educate/pdf/garlic.pdf1995.-(Erişim tarihi 12.09.2017).
- Ayaz, E., Alpsoy, H.C. 2007.** Sarımsak (*Allium sativum*) ve geleneksel tedavide kullanımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31 (2): 145-149.
- Bae, M.S., Cho, E.J., Choi, E., Park, O. 2003.** Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal*, 36: 652-663.
- Bandara, M.S., Krieger, K., Slinkard, A.E., Tanino, K. K. 1999.** Pre-planting chilling requirements for cloving of spring-planted garlic. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(2): 379-384.
- Baytop, T. 1999.** Türkiye'de bitkilerle tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 480 s.
- Bizuayehu, D., Kebede, B., Wassu, Bekele, A., Getachew, T. 2018.** Duration of low temperature storage, clove topping and gibberellic acid on garlic sprouting and seedling vigor. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 18(2): 13420-13437.
- Brewster, J.L. 1990.** The genus *Allium* L. : Onions and allied crops. Volume I. Ed: Brewster, J.L., Rabinowitch, H. D., CRC Press, Florida, pp: 2-15.
- Chong, K., Wang, L., Tan, K., Huang, H. and Liang, H. 1994.** Molecular cloning and characterization of vernalization-related (ver) genes in winter wheat. *Physiologia Plantarum*, 92: 511-515.
- Cheng, L., Zhang, X., Zhao, Q., Li, H., Wang, Y., Wang, D., Wang, D., Zhang, F. 2014.** Comparative proteomic analysis of cold-induced sweetening in potato (*Solanum Tuberosum* L.) tuber. *Acta Physiol Plant*, 36: 1197–1210.
- Del, Boccio, P, Urbani, A. 2005.** Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. *Ann Ist Super Sanita*, 41: 479-82.
- Doğru, M. Ş., Balkaya, A. 2015.** Lahanalarda tohum üretim süresini kısaltmaya yönelik uygulamalar ve etki mekanizmaları. *Alatarım*, 14 (2): 29-37.
- Ertürk, Y., Güleriyüz, M. 2007.** Erzincan koşullarında bazı yerli ve yabancı kayısı çeşitlerinin düşük sıcaklıklara dayanım derecelerinin belirlenmesi (2003- 2004 Dönemi). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(2): 128-136.
- Etoh, T., Simon, P.W. 2002.** Diversity, fertility and seed production of garlic, *Allium* crop sciences: recent advances. Ed: Rabinowitch H.D., Currah L., CABI International, Wallingford, UK, pp: 101-118.
- FAO. 2016.** Dünya sarımsak üretimi. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.

- Feng, R., Zhang, L., Whang, J., Luo, J., Peng, M. 2015.** Proteomic analysis of cold stress responses in banana leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 140(3): 214–222.
- Fritsch, R.M., Friesen, N. 2002.** Evolution, domestication and taxonomy. *Allium Crop Sciences: Recent Advances*, Ed: Rabinowitch H.D., Currah L., CABI International, Wallingford, UK, pp: 5-30.
- Guy, C.L. 1990.** Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 187-223.
- Gülen, H. 2000.** Ayva ve armutlarda anaç/kalem ilişkilerinin izoenzim analizleriyle araştırılması. *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Graham, D.R., Elliott, S. T., Van Eyk, J.E. 2005.** Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening. *J Physiol*, 563: 1–9.
- Hong, T., Etoh, T. 1996.** Fertile clones of garlic (*Allium sativum* L.) abundant around the tien shan mountains. *Breeding Science*, 46: 349-53.
- Hurtado, M., Ocampo, J., Pacheco A., Rosa A. and Silva1, E. 2015.** Low temperature conditioning of garlic (*Allium Sativum* L.) “seed” cloves induces alterations in sprouts proteome. *Front. Plant Sci.*, 6: 332.
- Imin, N., Kerim, T., Rolfe, B.G., Weinmann, J.J. 2004.** Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers. *Proteomics*, 1873-1882.
- Ipek, M., Ipek, A., Simon, P.W. 2005.** Sarımsak genomu organizasyonunun PZR’a dayalı gen spesifik markırlarla belirlenmesi. 14. Biyoteknoloji Kongresi Bildiri ve Poster Kitabı, Eskişehir, s. 60-63.
- Ipek, M. 2011.** Sarımsak yetiştiriciliği (*Allium sativum* L.). Bahçe tarımı II, Editörler: Şeniz, V., Erdoğan, V., Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, s. 171-173.
- Kaymak, H.Ç., Güvenç, İ. 2009.** The influence of vernalization time and day length on flower induction of radish (*Raphanus Sativus* L.) under controlled and field conditions. *Turk J Agric For*, 34: 401-413.
- Kosova, K., Vitamvas, P., Planchon, S., Renaut, J., Vankova, R., Prasil, I. 2013.** Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *J. Proteome Res.*, 12:4830–4845.
- Kurban, S., Mehmetoğlu, İ. 2010.** Proteomik –derleme. *Yeni Tıp Dergisi*, 27: 70-75.
- Kusumadewi, S., Hamim., Sobir. 2016.** The effects of vernalization and photoperiod on flowering of shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum* Baker) in Lowland Area. *International Seminar on Tropical Horticulture*, Bogor, Indonesia.
- Kütevin, Z., Türkeş, T., 1987.** Sebzeçilik ve genel sebze tarımı prensipleri ve pratik sebzeçilik yöntemleri. İnkılap Kitabevi, İstanbul, 379 s.
- Lee, D.G., Ahsan, N., Lee, S.H., Lee, J.J., Bahk, J.D., Kang, K.Y., Lee B.H. 2009.** Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1-11.
- Lucena, R.M.M., Negreiros, M.Z., Lopes, W.A.R., Soares, A.M. 2016.** Qualitative analysis of vernalized semi-noble garlic cultivars in western rio grande do norte state, Brazil. *Rev. Caatinga, Mossoro*, 29(3):764 – 773.
- Mathew, D., Forer, Y., Rabinowitch, H.D., Kamenetsky, R., 2011.** Effect of long photoperiod on the reproductive and bulbing processes in garlic (*Allium sativum* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 166–173.

- Mayer, E.S., Michael, T.B., Rotem, N., Rabinowitch, H.D., Faigenbom, A.D., Kosmola, A., Perlikowski, D., Sherman, A., Kamenetsky, R. 2015.** Garlic (*Allium sativum* L.) fertility: transcriptome and proteome analyses provide insight into flower and pollen development. *Frontiers in Plant Science*, 6: 271.
- Nadaroğlu, Y., Erciyas, Y., Yücel, G., Şimşek, O., Çalık, Y. 2016.** Bitki soğuklama isteği hesaplama programı. Meteoroloji Genel Müdürlüğü.
- Özenoğlu, S., Yıldızhan, H., Demiralp-Özen, D., Duman-Cansaran, D. 2016.** Farklı biyolojik organizmalarda proteomik uygulamalar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(4): 405-418.
- Pomeroy, M.K., Siminovitch, D., Wrightman, F. 1970.** Seasonal biochemical changes in the living bark and needles of red pine (*Pinus resinosa*) in relation to adaptation to freezing. *Can. J. Bot.*, 48:953-67.
- Rahman, M.H., Haque, M.S., Ahmed, M. 2003.** Pre-Planting temperature treatments for breaking dormancy of garlic cloves. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2(1): 123-126.
- Rahman, M.H., Haque, M.S., Karim, M.A., Ahmed, M. 2006.** Effects of gibberellic acid (GA₃) on breaking dormancy in garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Agriculture & Biology*, 8(1):63-65.
- Sakai, A., Otsuka, K., Yoshida, S. 1968.** Mechanisms of survival of plant cells at super-low temperatures by rapid cooling and re-warming. *Cryobiology*, 4:165-173.
- Siminovitch, D., Briggs, D.R. 1949.** The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. 1. seasonal variations in protein content. *Arch. Biochem.*, 23:8-17.
- Simon, P.W., Jenderek, M.M. 2003.** Flowering, seed production, and the genesis of garlic breeding. *Plant Breeding Reviews*, Editörler: Janick, J., Wiley, USA, 23:211-244.
- Subrata, C., Chattopadhyay, P K., Hassan, M.A., 2010.** Dynamics of growth and yield of garlic in variable planting time and applied nutrient. *Indian J. Horticulture*, 67 (3): 348-352.
- Takagi, H. 1990.** Garlic (*Allium sativum*): Onion and allied crops, Ed: Rabinowitch, H. D., Brewster, J. L., Baco Raton, Florida, pp: 109-147.
- Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A., Millar, A.H. 2005.** Differential impact an environmental stress on the mitochondrial proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1122-1133.
- TUIK. 2017.** Türkiye kuru sarımsak üretimi. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>.
- Volk, G.M., Rotindo, K.E., Lyons, W. 2004.** Low – temperature storage of garlic for spring planting. *Hort. Science*, 39(3): 571-573.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. 2000.** Kültür sebzeleri (sebze yetiştirme). Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 440 s.
- Woldeyes, F., Witsadik, K., Tabor, G. 2017.** Emergence of garlic (*Allium sativum* L.) as influenced by low storage temperature and gibberellic acid treatments. *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, 10(2): 20-20
- Wu, C., Wang, M., Cheng, Z., Meng, H. 2015.** Growth, bolting and yield of garlic (*Allium sativum* L.) in response to clove chilling treatment. *Scientia Horticulturae*, 194: 45-52.

- Wu, C., Wang, M., Cheng, Z., Meng, H. 2016.** Response of garlic (*Allium sativum* L.) bolting and bulbing to temperature and photoperiod treatments. *Published by The Company of Biologists Ltd . Biology Open.* 5: 507-518.
- Yanmaz, R., Ermiş, S. 2005.** Tunceli sarımsağı (*Allium tuncelianum* Kollman, Özhatay, Matthew, Şiraneci) tohumlarındaki çimlenme probleminin çözülmesi üzerinde araştırma. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, 9-11 Kasım 2005, Adana.
- Youssef, N.S. 2013.** Growth and bulbing of garlic as influenced by low temperature and storage period treatments. *World Rural Observations*, 5(2):47-57.
- Youssef, N.S., Tony, H.S.H., 2014.** Influence of different planting date on the performance of new garlic genotypes grown under el-minia governorate conditions. *Nature and Science*, 12 (5): 112-119.
- Yünlü, S., Kır, E. 2016.** Soğan (*Allium cepa*) ve Sarımsaktaki (*Allium sativum*) bazı fenolik bileşiklerin tayin edilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(3): 566-574.
- Zhang, W., Zhang, H., Ning, L., Li, B., Bao, M. 2016.** Quantitative proteomic analysis provides novel insights into cold stress responses in petunia seedlings. *Frontiersin Plant Science*, 7:136.
- Zheng, M., Wang, Y., Liu, K., Shu, H., Zhou, Z. 2012.** Protein expression changes during cotton fiber elongation in response to low temperature stres. *Pl. Physiol*, 4: 399-409.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Aybüke İL
Doğum Yeri ve Tarihi :Kars 14.07.1992
Yabancı Dili :İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Bandırma Ayyıldız Anadolu Lisesi - 2010
Lisans :Süleyman Demirel Üniversitesi – Ziraat
Fakültesi – Bahçe Bitkileri - 2015
Yüksek Lisans :Uludağ Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü -
Bahçe Bitkileri A.B.D.- 2019

İletişim (e-posta) :aybuke_il@windowslive.com

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar :Tümaş Tarım Ürünleri ve Paz. Ltd. Şti.
(Bayram Tohum) 2017-

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Aybüke İL
Tez Adı	Sarımsakta Düşük Sıcaklıkta Farklı İfade olan Protein Profillerinin Belirlenmesi
Enstitü	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Bahçe Bitkileri
Tez Türü	Yüksek Lisans
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Meryem İPEK
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih :16.09.2019

İmza :

