

**SARIMSAKTA DEPOLAMA SÜRESİNCE ALLİNAZ
GENİ İFADESİNDEKİ DEĞİŞİKLİĞİN BELİRLENMESİ**

Rukiye ERŞAHİN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARIMSAKTA DEPOLAMA SÜRESİNCE ALLİNAZ GENİ İFADESİNDEKİ
DEĞİŞİKLİĞİN BELİRLENMESİ**

RUKİYE ERŞAHİN
Orcid no: 0000-0002-1348-8258

PROF. DR. MERYEM İPEK
Orcid no: 0000-0002-0609-3442
DANIŞMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA- 2020
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Rukiye ERŞAHİN tarafından hazırlanan "Sarımsakta Depolama Süresince Allinaz Gen İfadesindeki Değişikliğin 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
Orcid no: 0000-0002-0609-3442
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı


İmza

Üye : Prof. Dr. Murat ŞEKER
Orcid no: 0000-0002-6886-0547
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat
Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı


İmza

Üye : Doç. Dr. Asuman CANSEV
Orcid no: 0000-0002-3353-846X
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı


İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü
19/02/2020



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.

19/02/2020

Rukiye ERŞAHİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SARIMSAKTA DEPOLAMA SÜRESİNCE ALLİNAZ GENİ İFADESİNDEKİ DEĞİŞİKLİĞİN BELİRLENMESİ

Rukiye ERŞAHİN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Meryem İPEK

Sarımsak kendine özgü keskin ve karakteristik bir kokuya sahiptir. Sarımsağa kokusunu kükürlü bileşiklerden allisin vermektedir. Allinaz geninin kodladığı enzim sarımsakta allin öncül kükürlü bileşiği allisine dönüştürür. Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı, sarımsakta depolama süresince allinaz gen ifadesindeki değişimin Real-Time PCR analizi ile belirlenmesi ve kükürlü bileşiklerden allin ve allisin içeriği ile karşılaştırılmasıdır. Tez çalışmasında, Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotipleri 4°C ve 21°C’de 12 hafta depolanmıştır. Depolama sonunda alınan örneklerden, toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra allinaz gen ifadesindeki değişimler aktin gen referans alınarak Real-Time PCR analizleri ile belirlenmiştir. Real-Time PCR analiz sonuçlarına göre, Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde 4°C ve 21°C’de depolanan örneklerde başlangıca göre göreceli allinaz gen ifade düzeyinde önemli bir artış görülmüştür. Kastamonu genotipinde, depolama öncesi örneklerinde 12,85 olan göreceli gen ifade düzeyi 4°C’de yaklaşık 2,5 kat artarak 32,37 düzeyine, 21°C’de yaklaşık 3 kat artarak 39,15 düzeyine çıkmıştır. 4°C ile 21°C uygulamaları arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PI515971 sarımsak genotipinde ise depolama öncesi örneklerinde göreceli allinaz ifadesi 18,08 iken 4°C’de yaklaşık 5 kat artarak 87,9 düzeyine, 21°C’de 5 kat artarak 88,9 düzeyine çıkmıştır. PI515971 sarımsak genotipinde, 4°C ile 21°C uygulamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ayrıca allinaz gen ifadesindeki artış ile allin ve allisin miktarındaki artış arasında yüksek pozitif korelasyonlar saptanmıştır. Sonuç olarak allinaz gen ifadesine etki yönünden depolama sıcaklıkları arasında çok fazla fark olmadığı ve 4°C ile 21°C’ de depolamada göreceli allinaz gen ifade düzeyindeki artışın allisin ve allin miktarlarındaki artışla paralel olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Allium sativum* L., Allisin, Allin, Allinaz gen, Gen ifadesi, Real-Time PCR

2020, vii + 34 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF CHANGES IN ALLIINASE GENE EXPRESSION DURING STORAGE IN GARLIC

Rukiye ERŞAHİN

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

Supervisor: Prof. Dr. Meryem İPEK

Garlic has a distinctive pungent and characteristic odor. Allicin which is one of major sulfur compounds in garlic gives garlic odor. The enzyme coded by allinase gene converts alliin precursor to the allicin. The aims of this master thesis were to determine the allinase gene expression during storage in garlic by Real-Time PCR analysis and to compare with alliin and allicin contents. In this thesis, Kastamonu and PI515971 garlic genotypes were stored at 4°C and 21°C for 12 weeks. After total RNA isolation and cDNA synthesis from the samples taken at the end of the storage, changes in relative allinase gene expression were determined by Real-Time PCR analysis by using actin reference gene. According to the results of Real-Time PCR analysis, significant increases in the relative allinase gene expression were observed in Kastamonu and PI515971 samples stored at 4°C ve 21°C compared to pre storage samples. The relative gene expression level of Kastamonu genotype was 12,85 in pre-storage samples and increased about 2,5 times to 32,37 at 4°C, and increased approximately 3 times to 39.15 at 21°C. A significant difference was found between 4°C and 21°C treatments. In the PI515971 garlic genotype, the expression was 18,08 in pre-storage samples and it increased about 5 times to 87,9 at 4°C and increased about 5 times to 88,9 at 21°C. There is no significant difference between 4°C and 21°C treatments in PI515971 garlic genotype. In addition, significant correlations were detected between increase of allinase expression level and increase of alliin and allicin contents. In conclusion, there is no significant difference between storage temperatures in terms of effect to allinase gene expression level and the increase in relative allinase gene expression during storage at 4°C and 21°C occurred in parallel with increase in contents of alliin and allicin.

Key words: *Allium sativum* L., Allicin, Alliin, Allinase gene, Gen expression, Real-Time PCR

2020, vii + 34 pages

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Meryem İPEK'e çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı babam Osman ERŞAHİN'e, annem Fatma ERŞAHİN'e teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarım Yaşar ÖZGÖL, Orhan ÖNLÖ ve AybÖke İL'e teşekkür ederim.

Rukiye ERŞAHİN

19/02/2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Kükürlü Bileşikler.....	5
2.2. Sarımsakta Depolama.....	7
2.3. Kantitatif Real-Time PCR.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Bitki Materyali	11
3.2. Toplam RNA İzolasyonu.....	11
3.3. Toplam RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	12
3.4. cDNA Sentezi.....	12
3.5. Kantitatif Real-Time PCR Analizi.....	13
3.6. Kantitatif Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi.....	16
3.7. Primer Tasarımı.....	16
3.8. İstatistiksel Analiz.....	16
4. BULGULAR.....	17
4.1. Kantitatif Real Time PCR	17
4.2. Allinaz Gen İfade Düzeyi	18
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
KAYNAKLAR	28
ÖZGEÇMİŞ	34

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge

da
 Δ, δ
dH₂O
 γ
g
KA
 μ L
mg
ml
ppm
ng
 $^{\circ}$ C
%

Açıklama

Dekar alan
Delta
Distile su
Gama
Gram
Kuru ağırlık
Mikrolitre
Miligram
Mililitre
Milyonda Bir Birim
Nanogram
Santigrat Derece
Yüzde Oran

Kısaltmalar

DNA
F
cDNA
PCR
Q-RT-PCR

RT-PCR
R
RNA
CT
HPLC
TÜBİTAK -TOVAG

Açıklama

Deoksiribo Nükleik Asit
Forwad
Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
Polymerase Chain Reaction
Quantitation Real-time Polymerase Chain
Reaction
Real-Time PCR
Reverse
Ribo Nükleik Asit
Threshold cycle
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma
Kurumu-Tarım Ormancılık Ve Veterinerlik
Araştırma Destek Grubu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Allin (S-Allil-L-sistein Sülfoksid)	3
Şekil 1.2. Allisin oluşumu (2-propen-1-sülfinotioik asit S-2-propenil ester).	3
Şekil 3.1. Real-Time PCR Plate'i	14
Şekil 3.2. Roche marka LightCycler 480 II Real-Time PCR cihazı	14
Şekil 4.1. Kastamonu genotipi qRT- PCR analiz eğrisi.....	17
Şekil 4.2. PI515971 genotipi qRT- PCR analiz eğrisi.....	17
Şekil 4.3. Farklı depolama sıcaklıklarında depolanan Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde göreceli Allinaz gen ifadesi düzeyi.....	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Sarımsağın yüz gram içeriği	5
Çizelge 2.2. Sarımsak bileşiklerinin insan sağlığı üzerindeki etkileri	6
Çizelge 3.1. Bir örnek için hazırlanan SYBR Green master karışımı	13
Çizelge 3.2. LightCycler 480 II cihazında uygulanan koşullar.....	15
Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da kullanılan allinaz ve actin genleri primerleri... ..	16
Çizelge 4.1. Farklı depolama sıcaklıklarında depolanan Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde göreceli allinaz gen ifadesi düzeyi.....	19
Çizelge 4.2. Kastamonu genotipinin göreceli allinaz gen ifadesi düzeyinin depolama sıcaklığı ile karşılaştırılmalı analizi (B: Başlangıç)	20
Çizelge 4.3. PI515971 sarımsak genotipinin göreceli allinaz gen ifadesi düzeyinin depolama sıcaklığı ile karşılaştırılmalı analizi(B: Başlangıç)	20
Çizelge 4.4. PI515971 genotipinde göreceli allinaz gen ifadesiyle allin ve allisinin korelasyon katsayıları	21
Çizelge 4.5. Kastamonu genotipinde göreceli allinaz gen ifadesiyle allin ve allisinin korelasyon katsayıları.....	22

1. GİRİŞ

Sarımsak (*Allium sativum* L.), otsu ve çok yıllık bitkileri kapsayan tek çiçekli bitkiler familyası olan Alliaceae familyasında; tek çenekliler sınıfındaki Asparagales takımının içinde yer alır.

Sarımsağın taksonomik sınıflandırılması;

Sınıf: Monocotyledoneae

Takım: Liliflorae

Familya: Alliaceae

Cins: *Allium*

Tür: *Allium sativum* L.

şeklindedir.

Sarımsak ilk yılında birkaç dişten oluşan başı olan, ikinci yılında çiçek sapına kalkarak genotipe göre nadir tohum veren çok yıllık, otsu bir bitkidir (Fritsch ve ark. 2002). Sarımsağın çeşit özelliğine bağlı olarak bazı genotiplerde çiçeklenme görülürken bazı genotiplerde çiçeklenme görülmez. Çiçeklenme özelliği taşıyan genotiplerin çoğu; çiçek tozu kısırlığı, generatif ve vejetatif organlar arasındaki besin rekabeti, tapetumun erken bozulması gibi sebeplerden dolayı kısırdır. Bu yüzden sarımsak üretimi genellikle vejetatif olarak yapılmaktadır (Günaydın 2011).

Sarımsağın insanlık tarihinde MÖ.2600 - 2100 yılları arasında kullanılmaya başladığı bilinmektedir (Haris ve ark. 2001). Gen merkezi Orta Asya olarak kabul edilir (Baytop 1999). Sarımsak ılıman iklim kuşağında yetişen uzun gün bitkisidir. Başarılı bir yetiştiricilik için ideal sıcaklığın 15-20°C arasında, nemin ise %60' a yakın olmasını ister. Sıcaklık 25°C üzerine çıktığında ve 15°C altına düştüğünde bitki gelişimi yavaşlamakta ve verimi düşmektedir (Sabuncu 2005).

Sarımsak kullanım alanı olarak çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Keskin ve karakteristik kokuya sahip olan sarımsak, günümüzde baharat ve yemeklerde kullanılmasının dışında alternatif tıp alanında da oldukça büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca sakinleştirici, antimikrobiyel, antibakteriyel, ağrı kesici ve anti kanserojen özelliğinden dolayı; deri hastalıkları, solunum ve sindirim sistemleri rahatsızlıkları ve kalp damar rahatsızlıkları

gibi birçok hastalığın tedavisinde ilaç sanayisi tarafından tercih edilmektedir (Kemper 2000, Losling 2003).

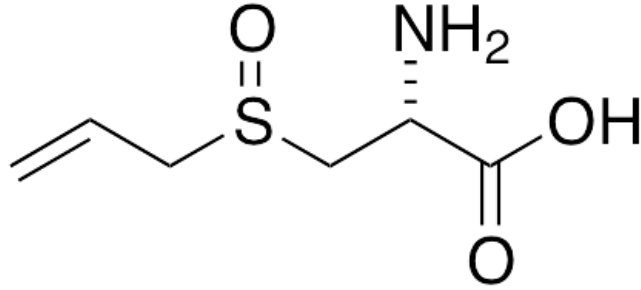
Sarımsağın insan sağlığı açısından önemi anlaşıldıktan sonra üretim ve tüketimi artmıştır (Vural ve ark. 2000). Ülkemizde 2017 yılı itibarıyla 148133 ton, Dünyada ise 28164055 ton sarımsak üretimi yapılmıştır. (FAO, 2017). Türkiye İstatistik Kurumu 2018 yılı verilerine göre ülkemizde sarımsak, taze ve kuru olmak üzere tüketim şekillerine göre ikiye ayrılmaktadır. Taze sarımsak üretim alanı olarak başlıca; Gaziantep (2.851 da) , Kahramanmaraş (2.075 da), Şanlıurfa (1.330 da) , kuru sarımsak üretim alanında ise Kastamonu (25.750 da), Gaziantep (18.665 da), Aksaray (15.175 da) illeri öneme sahiptir. Üretim miktarlarına bakıldığında Gaziantep (4871 ton), Şanlıurfa (3054 ton), Kahramanmaraş (2747 ton) taze sarımsakta; Gaziantep (20726 ton), Kastamonu (20540 ton), Kahramanmaraş (15848 ton) kuru sarımsakta üretim açısından öne çıkmaktadır. Ülkemiz sarımsaklarından ihracata en uygun olanı, kalitesi ve muhafaza ömrü oldukça iyi olduğu için Kastamonu sarımsağıdır.

Yapılan araştırmalara göre sarımsak 9 aya kadar depolanabilmektedir. Depolama süresini ekim zamanı, gübreleme, kuruma oranı ve depolama koşulları gibi faktörler etkilemektedir. Depolama sonunda ürün kayıpları %25-30 arasında değişkenlik göstermektedir (Anonim 2019a).

Sarımsak, içeriği bakımından oldukça zengin bir sebzedir. İki yüzden fazla kimyasal bileşik içermekte olup, kükürt içeren yaklaşık 33 bileşik (allin, allisin, allylpropyl disulfide, diallyl trisulfide, ajoene, sallylcysteine, vinylidithiines, vd.) bulundurmaktadır. Ayrıca 17 farklı aminoasit, uçucu yağlar, çeşitli enzimler, mineral maddeler, vitaminler, karbonhidrat ve flavonoidler içermektedir (Suong ve ark. 2007, Omar ve ark. 2010, Akan 2014).

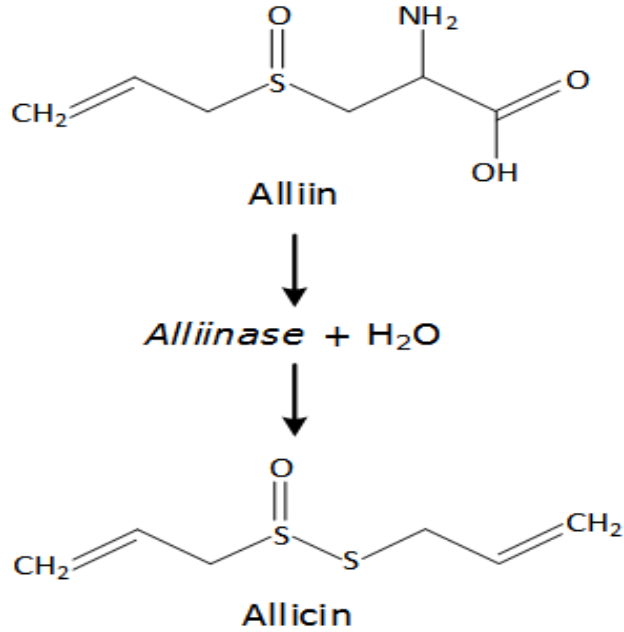
Sarımsakta; kükürtlü bileşiklerden en önemlilerinden biri olan allin (S-allil-L-sistein sülfoksid), karbon ve kükürt içeren stereokimyaya sahip tek kükürtlü bileşiktir (Şekil 1.1). Sarımsağın zedelenmesiyle allinin allisine dönüşmesi allinaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. *Allium* türlerinin kendine has kokusuna ve tadına allinaz enzimi etki etmektedir. Sarımsağın bir dişinde ortalama %0,24 allin (S-allil-L-sistein sülfoksid)

bulunmaktadır. Allinin; renksiz, kokusuz, stabil ve katı olduğu araştırmalar sonucu bulunmuştur (Stoll ve ark. 1948, Bocchini ve ark. 2001).



şekil 1.1. Allin (S-allil-L-sistein sülfoksid).

Allisin, (2-propen-1-sülfinotioik asit S-2-propenil ester), kükürtlü bir amino asit olan allinin allinaz enzimi ile parçalanması sonucu ortaya çıkan ve sarımsağa has kokusunu ve lezzetini içeren kükürtlü uçucu yağdır (şekil 1.2) (Izigov ve ark. 2011). Ülkemizde, yetiştiriciliği yapılan sarımsaklarda allin, allisin ve uçucu yağların oranı %0,4'tür (Baytop 1999). Bir diş taze sarımsakta ortalama 4-5 mg allisin bulunmaktadır (Horev-Azaria ve ark. 2009).



şekil 1.2. Allisin oluşumu (2-propen-1-sülfinotioik asit S-2-propenil ester) (Meireles ve ark. 2014)

Allinaz enzimi soğan, pırasa, sarımsak ve diğeri *Allium* türlerinin kendine özgü lezzetini belirlemektedir. Stoll ve Seebeck'in (1947) yaptığı çalışmalarda allinaz ilk olarak sarımsakta bulunmuştur. Ayrıca allinaz sarımsakta saflaştırılan ilk enzim olma özelliğine sahiptir (Mazelis ve ark. 1968). Allinaz, allin öncül maddesinin allisine dönüşümünde katalizör görevi görmektedir.

Sarımsak hasattan sonra genellikle oda koşullarında depolanmakta ve depolama sırasında biyokimyasal bileşik içerikleri değişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda depolama sırasında allin ve allisin içeriğinin değiştiği belirlenmiştir (Sukkaew ve ark. 2011). Ancak bu güne kadar sarımsakta allini allisine dönüştüren allinaz enzimi ve bu enzimi kodlayan gen ifadesinin depolama sırasında değişimi ve allinaz gen ifadesindeki değişim ile allin ve allisin içerikleri arasındaki ilişki belirlenmemiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasının amacı, sarımsak başlarında düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı koşullarında depolama süresince allinaz geni ifadesinin Real Time PCR analizleri ile belirlenmesi ve daha önceden tamamlanan TÜBİTAK-TOVAG 113O228 nolu proje kapsamında saptanan kükürtlü bileşiklerden allin ve allisin içeriği ile karşılaştırılmasıdır. Bu yüksek lisans tez çalışması ile sarımsağın depolama sırasında biyofonksiyonel özelliğinin değişip değişmediği ve hasattan sonra sarımsağın muhafaza koşullarının sarımsakta kükürtlü bileşiklerin içeriğine etkisi ortaya çıkarılmış olacaktır. Ayrıca elde edilen sonuçlar sarımsakta depolama sırasında kükürtlü bileşiklerin biyosentez mekanizmasının ortaya çıkarılmasına katkıda bulunabilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kükürtlü Bileşikler

Kükürtlü bileşikler sarımsağa özgü koku, lezzeti ve biyolojik aktivitesini kazandırır. Diğer *Allium* türlerine oranla sarımsak daha fazla miktarda kükürtlü bileşik bulundurmaktadır. Soğan, pırasa, karnabahar, brokoli gibi yüksek oranda kükürtlü bileşik içerdiği bilinen sebzelere kıyasla sarımsak dört kat daha fazla kükürtlü bileşik içermektedir (Abu-lafi 2004).

Sarımsak bileşenleri üzerine yapılan araştırmaların çoğu kükürtlü bileşikleri kapsamaktadır ve bunların %85'ni allin oluşturmaktadır. Sarımsak mekanik zarara uğradığında allinaz enzimi ortaya çıkar ve allin öncül bileşiğini allisine dönüştürür (Yünlü 2011). Sarımsağın yapısında bulunan diğer kimyasal maddeler aşağıdaki Çizelge 2.1'de verilmiştir (Evren ve ark. 2006).

Çizelge 2.1. Sarımsağın 100 g içeriği (Evren ve ark. 2006)

Bileşikler	Miktar (%)	Mineraller	Miktar (ppm)	Vitaminler	Miktar (mg/100 g)
Su	66,32	Potasyum	21378	Askorbik asit	19
Protein	9,26	Fosfor	6009	Thiamin	9,21
Yağ	0,34	Magnezyum	1056	Niasin	0,9
Azotlu Bileşikler	7,1	Sodyum	532	Riboflovin	0,11
Lif	2,17	Kalsiyum	363		
SÇKM	18,4	Demir	52		
Uçucu yağ	0,14	Çinko	27		
pH	6,05	Manganez	12		

Louis Pasteur, 1858 yılında sarımsağın antimikrobiyal özelliğini bulmuştur. Yapılan araştırmalarda sarımsakta bulunan kükürtlü bileşiklerden en etkili tedavi edici özelliği allisinde bulunmuştur (Kemper 2000). Günümüzde sarımsağın insan sağlığı üzerinde

antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik ve probiyotik etkileri ve bu özellikleri sağlayan bileşikler Çizelge 2.2' de gösterilmiştir (Villamiel 2007).

Çizelge 2.2. Sarımsak bileşiklerinin insan sağlığı üzerindeki etkileri

Farmakolojik Etki	Etkiye Neden Olan Bileşik
Antikoagulan	Ajoen
Hipotansif	Selenyum-Germanyum-Allisin
Antiparazitik	Allisin-Allin-Ajoen
Antibakteriyel	Allisin-Allin
Antimikotik	Allisin-Allin-Ajoen
Antiviral	Allisin-Ajoen
Antikanserojen	Diallyl-disülfürler,Allisin,Ajoen

Oda sıcaklığında allisin katı kristal halde olup bir gece bekletildiğinde %9 oranında bozulma görülmektedir (Lawson ve ark. 1992). Allisin 4°C'de 2 ay, -20°C'de 4 ay, -70°C'de ise 2 yıl bozulmadan muhafaza edilebilmektedir (Lawson and ark. 2001, Rybak ve ark. 2004). Kükürtlü bileşikler için en ideal saklama pH 4,5-5,0 arasındadır. pH'ın daha düşük olduğu değerlerde saklanan sarımsak örneklerinde uçucu kükürtlü bileşikler açığa çıkmaktadır (Tung ve ark. 1989).

Freeman ve Whenham (1975) *Allium* türlerini; yüksek miktarda propenil sistein sülfoksid, yüksek miktarda allilil sistein sülfoksid ve metil sistein sülfoksid içerenler olarak üç sınıfa ayırmıştır.

Sarımsağın en önemli antimikrobiyal etki gösteren bileşiği allisindir. Bu bileşik mikroorganizmadaki RNA sentezi, lipid ve yağ asitlerinin oluşumunu engellemektedir. Bu engelleyici etki, allisinin kovalent olmayan bağ oluşturmasına bağlıdır (Ghannoum 1988).

Cantwell (2000) 'in yaptığı bir çalışmada taze sarımsak dişleri 5°C'de 3 hafta depolandığında allin içeriğinde %10-15, 10°C'de 3 hafta depolandığında ise daha fazla kayıplar olduğunu bildirmiştir.

2.2. Sarımsakta Depolama

Sarımsağın hasadından sonraki muhafaza koşulları, başın ve dişlerin kalitesini etkilemektedir. Genellikle sarımsağın muhafaza ömrünü ve kalitesini etkileyen etmenler; köklenme, hastalık ve su kayıpları, filizlenme, renk ve görünüş bozukluklarıdır. Muhafazada sıcaklık kontrolü diğer sebzelerde olduğu gibi sarımsakta da depo ömrünü uzatmada en önemli unsurdur. Düşük sıcaklık, bitki metabolizmasını yavaşlatarak yaşlanmayı geciktirmekte ve su kaybını en aza indirmektedir. Böylece sarımsağın kalitesi korunmuş, raf ömrü uzatılmış olmaktadır (Wills ve ark. 2007, Anonim 2019b). Farklı depolama sıcaklıklarının sarımsak üzerine etkisi aşağıdaki gibidir:

- -1 ile 0°C'de (nem oranı %60-70) depolandığında; ortalama depo ömrü 9 aydır. Ortamda hava sirkülasyonu ile nem birikmesi önlediği takdirde depolama kayıpları daha az olmaktadır (Anonim 2019c).
- 0°C'de (nem oranı %65-70) depolandığında; sarımsak başları en az kayıpla saklanabilmekte ve depo ömrü ortalama 1 yıl olmaktadır (Dhall ve ark. 2013).
- 0-2°C'de (nem oranı %65-70) depolandığında, depolama kayıpları %5-10'a kadar azalmaktadır. Depo ömrü ortalama 6-9 aydır (Lawande 2018).
- 1-5°C'de (%75 nem oranı) depolandığında; depo ömrü 10 ay olmaktadır. Oda sıcaklığında depolanan sarımsak ile karşılaştırıldığında kayıplar %42,4 iken 1 ila 5 °C arasında değişen sıcaklıklarda %12,5'tir (Anonim 2019d).
- 5-18°C'de (nem oranı %60-70) arasında depolandığında: sarımsak başları dinlenme döneminden hızlıca çıkmaktadır (Cantwell 2004, Cantwell ve ark. 2002, Dhall ve ark. 2013).

- 10-20°C'de arasında depolandığında: Sarımsaklarda filizlenme görülmektedir (Miedema 1994).
- 20-30 °C (oda sıcaklığı) arasında depolandığında: dişler bozulmadan 1-2 ay kadar muhafaza edilebilmektedir. Bu sürenin sonuna doğru dişler su kaybı nedeni ile yumuşamakta ve renkte bozulmalar görülmektedir (Anonim 2019c).
- 28-30°C arasında depolandığında; nem ve su kayıpları fazla miktarda olmaktadır (Dhall ve ark. 2013).

Sarımsakta en az kayıp ve iyi bir raf ömrü için optimum depolama sıcaklığı: -1-0°C olarak tavsiye edilmiştir (Cantwell 2000).

Bloem ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada hasat öncesi azot ve kükürt içeren gübre uygulamalarının sarımsakta allin ve su miktarına olan etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada materyaller, oda koşullarında, ışısız ve kuru bir ortamda 83 gün depo edilmiş, her 21 günde analizler yapılmıştır. Bu analizlere göre en iyi sonucu; allin miktarının önemli derecede artışı ve su kaybının normale göre daha az olmasını sağlayan deneme grubu olan azot gübresi uygulanmayan düşük dozda kükürt gübresi uygulaması olmuştur.

Ichikawa ve ark. (2006a) yaptığı çalışmada HPLC yöntemini kullanarak 5 ay boyunca 23°C'de depolanan sarımsak dişlerinde, GSPC (γ -L-glutamyl-S- (trans-1-propenyl)-L-cysteine)'de bir azalma ve izoallin yerine sikloallinde artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu mekanizmayı açıklamak amacıyla yaptıkları başka bir çalışmada ise sarımsak dişlerinin hem tampon çözeltilerinde (pH 4.6, 5.5 ve 6.5) hem de 25 ve 35°C' de izoallininin sikloalline dönüşümü incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda izoallininin sikloalline dönüştüğü ve sarımsak dişlerinin daha yüksek sıcaklıkta depolandığında sikloallinin içeriğinin arttığı sonucuna varılmıştır (Ichikawa ve ark. 2006b).

Vernalizasyon bitkinin vejetatif aşamadan generatif aşamaya geçebilmek için gerekli olan düşük sıcaklık isteğidir. Tek yıllık bitkilerde vernalizasyon zorunlu değilken, bu ihtiyacının karşılanması çiçeklenmeyi hızlandırmaktadır. İki yıllık bitkilerde ise vernalizasyon ihtiyacının karşılanmadığı takdirde çiçeklenme görülmemektedir (Doğru

ve ark. 2015). Brezilya’da yapılan bir çalışmada üç vernalizasyon döneminin (30 gün, 40 gün, 50 gün) ve üç ekim tarihinin (23/03, 23/04, 23/05) iki sarımsak (Caçador ve Quitéria) genotipinin verimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda her iki genotipte de 23/04 ekim tarihinin ve 40 günlük vernalizasyon süresinin, sarımsak verimini arttırmada etkili olduğunu bildirmişlerdir (Resende ve ark. 2011).

2.3. Kantitatif Real-Time PCR

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)), polimeraz zincir reaksiyonun her aşamasını gösteren, floresan işaretli prob ve boyaların yardımı ile ekrana yansıtan, nükleik asitin floresanla doğru orantılı olarak çoğaldığını gösteren bir PCR yöntemidir (Gibson ve ark 1996). Genellikle floresan kantitatif real time PCR, kantitatif - kinetik PCR gibi adlarda da kullanılmaktadır. Bu yöntem sayesinde gen ifadelerinin düzeylerini sayısal verilere dönüştürmek, devam etmekte olan PCR reaksiyonunu eş zamanlı olarak takip ederek istenilen zamanda müdahale edebilmek ve döngü sayısını değiştirebilmekte mümkündür (Aydın-Sayitoğlu 2008). Aynı zamanda DNA ve RNA örneklerini kısa bir sürede kalitatif ve kantitatif olarak çözümlenmekte, kontaminasyon riskini en aza indirgeyerek birçok laboratuvar sorunlarını gidermektedir (Bustin 2000).

Real Time-PCR’da kantitatif belirlemede iki yöntem kullanılmaktadır:

1. Özgül Floresan İşaretli Problar

- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Taqman
- Molecular Beacons
- Scorpion Primerleri
- Hibridizasyon Probları

2. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar

- Syber Green I
- EvaGreen
- Yo-Pro1

- BOXTO

RT PCR cihazının ticari olarak geliştirilmiş farklı modelleri bulunmakla birlikte yaygın olarak kullanılanları;

1. LightCycler (Roche)
2. TaqMAN (PE Biosystem)
3. ICycler (BIO-RAD)'dir.

LightCycler modelinde Syber Green I kullanılır. Syber Green I, sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresans vermektedir. Primerlerin bağlanması ile oluşan uzama aşamasında floresans miktarı, hedef DNA'nın çift sarmal oluşturmasıyla DNA'ya bağlanan Syber Green I miktarı ile belirlenmektedir (Grove 1999, Kubista ve ark. 2006). Fakat her zaman floresans artışı istenilen bölgenin uzadığı anlamına gelmez. Çünkü Syber Green I, hedef moleküllerin bulunmadığı durumda primerler kendi aralarında bağlanmalar meydana getirirse bu da floresans artışına neden olmaktadır. Bunların önüne geçmek için melting curve analizi yapılmaktadır.

Real Time PCR avantajları;

- Spesifik olmayan DNA çoğalmalarından etkilenmez,
- Geleneksel PCR sonlandıktan sonra değerlendirilirken RT-PCR uygulanırken veri değişimleri gözlemlenebilir.
- RT-PCR'dan sonra ikinci bir analize gerek yoktur, böylece kontaminasyon riskinin önüne geçilmiş olunur.
- Spesifik erime eğrisi analizleri ile spesifik amplifikasyonların tanımlanmasını sağlar.
- İki kat değişikliği hızla belirleme hassasiyetindedir (Morris ve ark. 1996).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma 2017 - 2019 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, ülkemizde önemli bir yere sahip olan Kastamonu sarımsağı ve Amerika'da bulunan WRPIS-Western Regional Plant Introduction Station'ndan sağlanan PI515971 kodlu sarımsak genotipi materyal olarak kullanılmıştır. 2014 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi arazisinde yetiştirilmiş olan genotiplerin bir bölümü 4°C'de diğer bir bölümü 21°C'de 12 hafta depolanmıştır. Depolama sıcaklıkları belirlenirken, sarımsak başlarında dinlenmenin kırılmasında etkili olan 4°C ve dinlenmenin kırılması için etkili olmayan 21°C sıcaklıkları seçilmiştir. Depolama denemesinden önce ve depolama sonunda dişlerin ortasındaki yaprak taslaklarından elde edilmiş ve -85°C'lik derin dondurucuda saklanmış örnekler bu tez çalışmasında kullanılmıştır.

3.2. Toplam RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu, QIAGEN marka RNeasy® Plant Mini Kit'i ve kit protokolü kullanılarak steril kabin ortamında gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, -80°C'de saklanan örnekler çıkarıldıktan sonra zaman kaybetmeden sıvı azot bulunan havanda ezilmiştir. Daha sonra iki ml'lik RNaz-free mikrosantrifüj tüplerine 450 µl RLT Tamponu eklenmiş ve sıvı azotta dondurulmuş spatula ile yaklaşık 100 mg toz haldeki örnekler dikkatlice tüpe aktarılmıştır. Tüp içindeki örnekler vorteksenerek homojen hale getirilmiştir. Kit içinde bulunan QIAshredded döndürme kolonu (mor) 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildikten sonra RLT tamponu içindeki örnek, kolonun üstüne aktarılmıştır. Tüpler 16000 x g hızda 2 dk santrifüj edildikten sonra tüpte toplanan kısım, pellet gelmeyecek şekilde mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. Hacimce yarısı kadar etanol (%96-100) eklenip pipetlenerek karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti özel tüp içindeki RNeasy mini dönüş koluna (pembe) aktarılmış ve 15 sn 8000 x g de santrifüj edildikten sonra tüpe geçen sıvı kısım atılmıştır. Daha sonra 700 µl RW1 tampon çözelti RNeasy mini dönüş kolonuna eklenmiş ve 15 sn 8000 x g de santrifüj edilmiştir. Alta

geçen sıvı kısım atılmıştır. Daha sonra 500 µl RPE tampon çözelti RNeasy mini dönüş kolonuna eklenmiş ve 15 sn 8000 x g de santrifüj edildikten sonra alta geçen sıvı kısım atılmıştır. Yeniden 500 µl RPE tampon çözelti eklenip, 2 dk 8000 x g de santrifüj edildikten sonra alta geçen sıvı kısım atılmıştır. Daha sonra RNeasy mini dönüş kolonu yeni 2 ml'lik toplama tüpüne aktarılmış ve membranın kuruması için 16000 x g de 1 dk santrifüj edilmiştir. Son aşamada RNeasy mini dönüş kolonu 1,5 µl'lik toplama tüpüne alınmış ve üzerine 30-50 µl RNase-free su eklenmiştir. Ardından 1dk 8000 x g 'de santrifüj edilerek RNA örnekleri elde edilmiştir.

3.3. Toplam RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Toplam RNA konsantrasyonu belirlenmesinde Qubit® RNA BR Assay Kit kullanılmış ve Qubit® Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazı ile RNA okumaları yapılmıştır.

2 µl'lik bir ependorf tüp içerisine her örnek ve 2 standart için 199 µl RNA BR Assay, 1 µl RNA BR Reagent konulmuş ve vortekslenerek karıştırılmıştır. Ardından örnekler için ve standart okumalar için 0,5 µl'lik ince duvarlı steril tüpler hazırlanmıştır. Bu tüpler içerisine hazırlanmış olduğumuz karışımdan her bir RNA örneği için 198 µl, standartlar için ise 190 µl dağıtılmıştır. Daha sonra örnekler için 2 µl RNA, standartlar için 10 µl RNA BR Standart 1 ve RNA BR Standart 2 eklenmiştir. Toplam hacmi 200 µl olan tüpler 2-3 sn vortekslenmiş, 3 dakika beklemenin ardından okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.4. cDNA Sentezi

Çıkarılmış olduğumuz toplam RNA'lardan Promega Go Taq qPCR® Master Mix kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlk aşama da buz içerisinde RNA'ların ve kit içerisinde bulunan çözeltilerin çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra RNA konsantrasyon hesaplamaları yapıp, en son konsantrasyon 800 ng olacak şekilde RNA örnekleri plate kuyucuklarına eklenmiştir. Ardından her RNA örneğin üzerine 1 µl forward primer ve 1 µl reverse primer eklenerek primerlerin RNA'ya daha iyi bağlanması için 70°C'de 5 dk PCR cihazında bekletilmiştir. Daha sonra bir mikrosantrifüj tüp içerisinde ana karışım hazırlanmıştır. Ana karışım, her örnek için 4 µl 5X Reaction Buffer, 1,5 µl MgCl₂, 1 µl PCR Nucleotide Mix, 0,5 µl Rnasin, 1 µl GoScript RT kullanılarak hazırlanmış ve pipetlenerek homojen hale getirilmiştir.

Hazırlanan ana karışımdan 8 µl, RNA bulunan kuyucuklara dağıtılmış ve üzerine her RNA örneği için ayrı hesaplanan Nuclease-Free su miktarları eklenmiştir. Toplamda 20 µl hazırlanan çözelti için 25°C’de 5 dk, 42°C’ de 1 saat, 70°C’ de 15 dk, 4°C’ de ∞ olacak şekilde PCR reaksiyonları yapılmıştır.

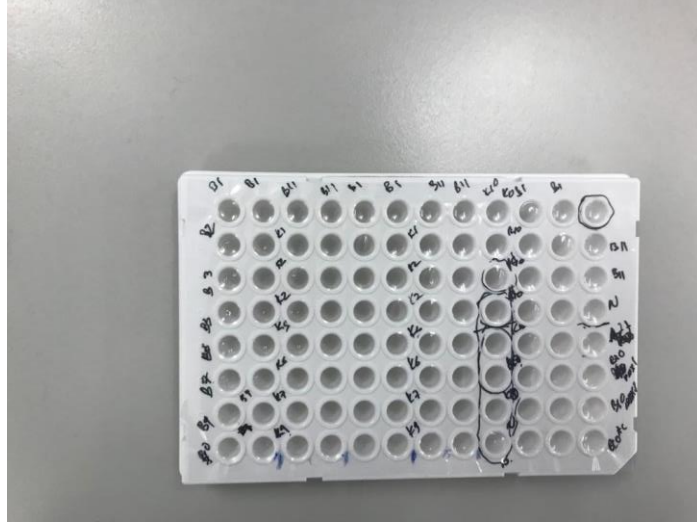
3.5. Kantitatif Real-Time PCR analizi

Kantitatif Real-Time PCR reaksiyonu için referans geni olarak aktin geni ((gi|56159166|gb|AY821677.1) kullanılmıştır. Analiz için RocheLightCycler® 480 SYBR Green Master I kiti kullanılmıştır. SYBR Green master karışımı her örnek için aşağıdaki Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Bir örnek için hazırlanan SYBR Green master karışımı

SYBR Green karışımı	10 µl
Primer F (forward)	1 µl
Primer R (reverse)	1 µl
ddH ₂ O	5 µl
TOPLAM	17 µl

Karışımlar ayrı ayrı pipetlenerek iyice karıştırılmış ve 3 µl cDNA bulunan RT-PCR plate kuyucuklarına (Şekil 3.1) 17 µl hazırlanan karışımdan dağıtılmıştır. Plate cihaza konulmadan önce üzeri özel film ile kapatılmış ve LightCycler 480 II RT-PCR cihazına (Roche, Almanya; Şekil 3.2) yerleştirilmiştir. Relative quantification programı seçildikten sonra gerekli analiz ayarlamaları Çizelge 3.2’ deki gibi yapılmıştır.



Şekil 3.1. Real-Time PCR Plate'i



Şekil 3.2. Roche marka LightCycler 480 II Real-Time PCR cihazı

Çizelge 3.2. LightCycler 480 II cihazında uygulanan koşullar

AYARLAR				
Algılama biçimi	Blok tipi	Reaksiyon hacmi		
Sybr Green	96	20 µl		
PROGRAMLAR				
Program ismi	Döngü	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1	Hiç Biri		
Amplifikasyon	45	Miktar		
Erime Eğrileri	1	Erime Eğrileri		
Soğutma	1	Hiç Biri		
ISI HEDEFLERİ				
Hedef (°C)	Veri alımı	Nüfuz (sa:dk:sn)	Yükselme oranı (°C/s)	Veri alımı (°C)
Ön- inkübasyon				
95	Hiç Biri	00:05:00	4.4	-
Amplifikasyon				
95	Hiç Biri	00:00:10	4.4	-
59	Hiç Biri	00:00:10	2.2	-
72	Hiç Biri	00:00:15	4.4	-
Erime eğrileri				
95	Hiç Biri	00:01:00	4.4	-
60	Hiç Biri	00:01:00	2.2	-
90	Sürekli	-	-	5-10
Soğutma				
40	Hiç Biri	00:00:30	2.2	-

3.6. Kantitatif Real-Time PCR Sonuçlarının Analizi

LightCycler 480 II cihazına plate yerleştirildikten sonra analize başlamadan önce plate düzenindeki kuyucukların içerdikleri her örnek ve primer kombinasyonu tanımlanmıştır. Sonrasında Advanced Relative Quantification yöntemi altında bire bir karşılaştırma ve yüksek duyarlılık seçenekleri seçilerek analizler gerçekleştirilmiştir. Hesaplama sonunda her bir örneğin eşik döngü değeri (CT) ve Δ CT metoduna göre hesaplanmış normalleştirme değerleri görüntülenmiştir. Hesaplama kullanılan Δ CT metodu formülasyonu şu şekildedir:

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

3.7. Primer Tasarımı

Allinaz geni için primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri bankasında bulunan sarımsak allinaz (gb| KR270355.1) dizileri kullanılarak, referans geni için ise sarımsak aktin (gi|56159166|gb|AY821677.1) geni kullanılarak dizayn edilmiştir. Primerler Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Primer dizileri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Real-time PCR'da kullanılan allinaz ve aktin genleri primerleri

Gen	Dizisi (5'-3')
ALLİNAZ	F-5'- GGAGGGCTCTCCTAAATGCGAG -3'
	R-5'- GGTGAAACCAGCACTGCACTG -3'
AKTİN	F-5'-TGGAATTGTGAGCAACTGGGATGAC-3'
	R- 5'-AGCCTGGATAGCAACATACATGGC-3'

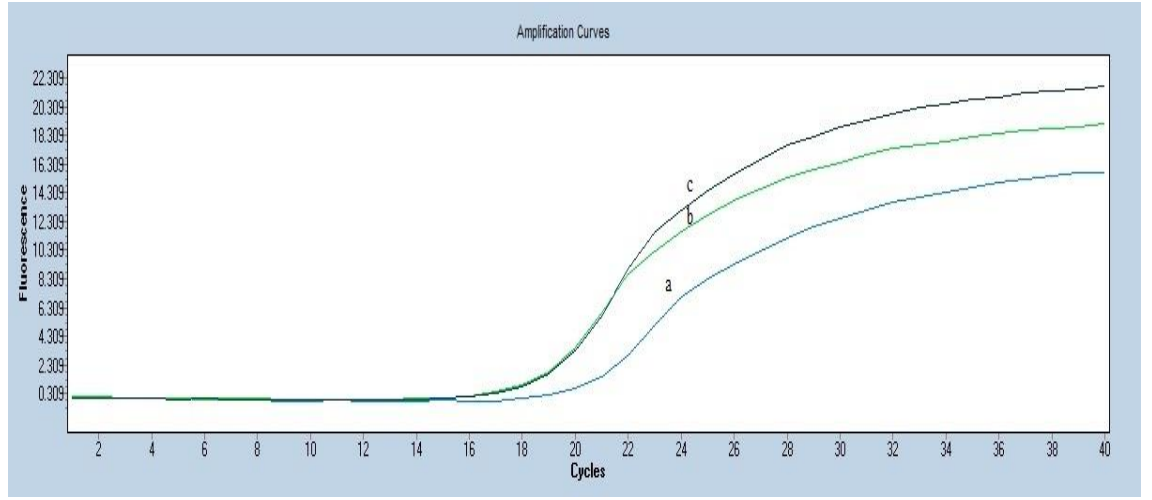
3.8. İstatistiksel Analiz

qRT-PCR'dan elde ettiğimiz değerler SPSS 22.0 programında analiz edilmiş ve istatistiksel fark %5 önem seviyesinde bulunmuştur. qRT-PCR'da elde ettiğimiz göreceli allinaz gen ifadesi ile TUBİTAK TOVAG 113O228 nolu projeden elde edilen allin ve allisin değerleri arasındaki Pearson korelasyon analizi yine aynı programda yapılmıştır.

4. BULGULAR

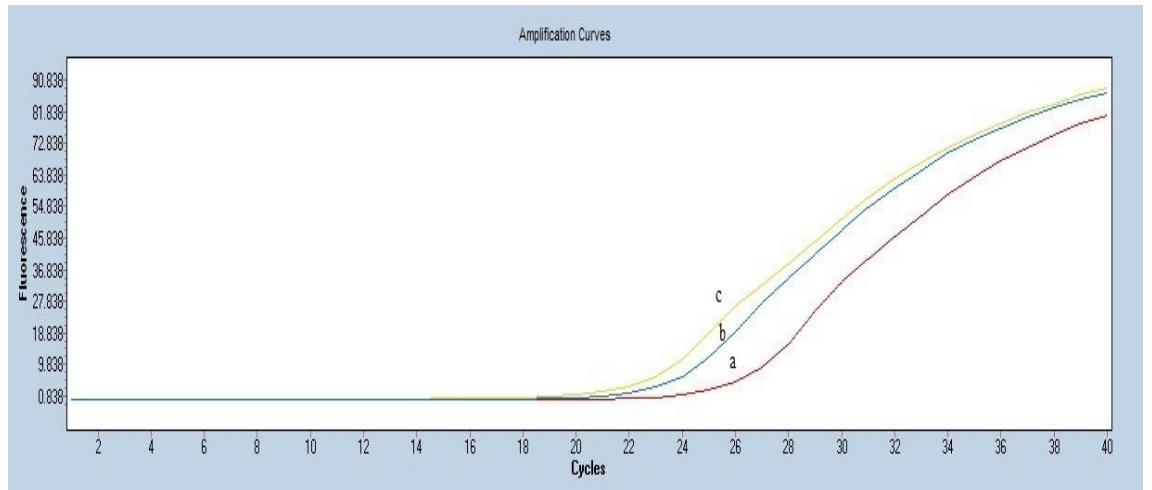
4.1. Kantitatif Real Time PCR

Kastamonu ve PI515971 genotipleri örneklerinde göreceli allinaz gen ifadesinin qRT-PCR analizi sonucu oluşan eğriler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir. Eğriler her uygulamadan bir tekerrürü temsil etmektedir.



Şekil 4.1. Kastamonu genotipi qRT- PCR analiz eğrisi

Şekil 4.1’de gösterilen Kastamonu genotipine ait eğrilerde “a” ile gösterilen mavi renkli eğri depolama öncesi örneklerini, “b” ile gösterilen yeşil renkli eğri 4°C’de depolanan örneklerin, “c” ile gösterilen siyah renkli eğri ise 21°C’de depolanan örneklerin göreceli allinaz gen ifade düzeyini belirtmektedir.



Şekil 4.2. PI515971 genotipi qRT-PCR analiz eğrisi

PI515971 genotipine ait Real-Time PCR eğrisinde belirtilen kırmızı renkli “a” ile gösterilen eğri depolama öncesi örneklerinin, “b” ile gösterilen mavi renkli eğri 4°C’de depolanan örnekleri, “c” ile gösterilen sarı renkli eğri ise 21°C’de depolanan örneklerin göreceli allinaz gen ifade düzeyini göstermektedir (Şekil 4.2).

4.2. Allinaz Gen İfade Düzeyi

Kastamonu ve PI515971 sarımsak çeşitleri düşük sıcaklık ve oda sıcaklığı koşullarında 12 hafta depolandıktan sonra allinaz geninin göreceli ifade düzeyindeki değişimlerinin istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

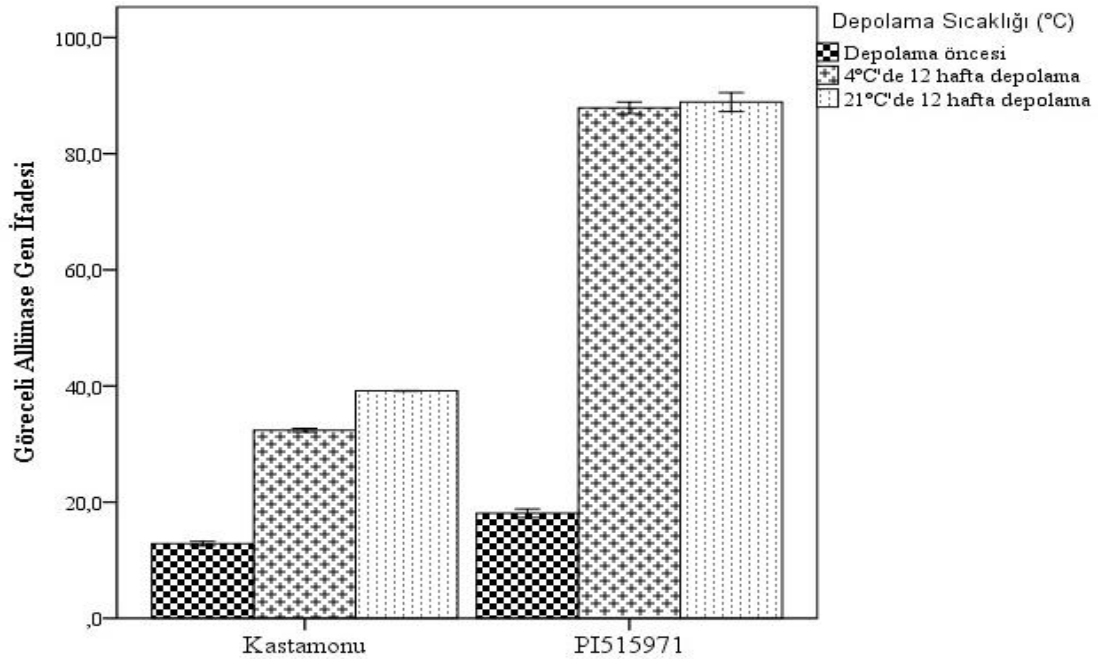
Kastamonu genotipinde, hem 21°C hem de 4°C’de 12 hafta depolama sonunda allinaz geninin göreceli ifade düzeyinde istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P \leq 0.05$) artışlar olmuştur. Bu genotipte, allinaz geni göreceli ifade düzeyi en yüksek 21°C’de depolanan örneklerde görülmüştür. 21°C’de depolanan örneklerin allinaz geninin göreceli ifade değeri (39,15) depolama öncesine göre (12,85) yaklaşık 3 kat artmıştır. Depolama sıcaklığı 4°C olan örneklerde allinaz geninin göreceli ifade düzeyi ise 32,37 olarak bulunmuştur. Bu değer depolama öncesi değerine (12,85) göre 2,5 kat daha yüksektir. Bu sonuçlara göre her iki depolama sıcaklığında da depolama öncesine göre allinaz geninin göreceli ifade düzeyi artışında anlamlı bir fark bulunmaktadır. Ayrıca her iki sıcaklık değeri arasında da istatistiksel olarak önemli bir fark vardır. Genel olarak Kastamonu genotipinde depolama süresince her iki sıcaklık koşullarında da gen ifadesi artmış ancak bu artış 21 °C’de daha fazla gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.3).

PI515971 genotipinde yapılan qRT-PCR analiz sonuçları doğrultusunda allinaz geninin göreceli ifade düzeyinde, başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artışlar ($P \leq 0.05$) belirlenmiştir. 21°C’de depolanan örneklerde allinaz göreceli ifade düzeyi 88,89 olup başlangıç değerine göre (18,08) yaklaşık 5 kat bir artış tespit edilmiştir. 4°C’de depolanan örneklerin ise allinaz geninin göreceli ifade değerinin 87,89 olduğu görülmüştür. Bu değer başlangıç zamanına göre yaklaşık 5 kat istatistiksel olarak anlamlıdır. Allinaz genin göreceli gen ifadesinde depolama sıcaklıkları arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.1; Şekil 4.3).

Genel olarak bakıldığında her iki genotipte 4°C’de ve 21°C’de 12 hafta depolandığında allinaz geninin göreceli ifade düzeyi başlangıca göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiştir ancak PI515971 genotipinde Kastamonu genotipine göre iki kattan daha fazla artış gerçekleşmiştir. Ayrıca allinaz gen ifadesinin PI515971 depolama öncesi örneklerinde Kastamonu genotipinin depolama öncesi örneklerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı depolama sıcaklıklarında depolanan Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde göreceli allinaz gen ifadesi düzeyi

Genotip	Depolama sıcaklığı (°C)	Depolama süresi	Göreceli allinaz gen ifade düzeyi
Kastamonu	4	0 hafta	12,85±0,37
		12 hafta	32,37±0,32
	21	0 hafta	12,85±0,37
		12 hafta	39,15±0,041
PI515971	4	0 hafta	18,08±0,74
		12 hafta	87,89±1,00
	21	0 hafta	18,08±0,74
		12 hafta	88,89±1,62



Şekil 4.3. Farklı depolama sıcaklıklarında depolanan Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinde göreceli allinaz gen ifadesi düzeyi

Kastamonu sarımsak genotipinde, göreceli allinaz geni ifade düzeyi sıcaklıklara göre karşılaştırıldığında (Çizelge 4.2), 21°C’de depolanan örneklerde (39,15) 4°C’de depolanan örneklerle (32,37) göre istatistiksel olarak daha yüksek düzeyde ifade olduğu ve bu değerlerin başlangıç (12,85) gen ifadesine göre istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir.

PI515971 sarımsak genotipinde, Çizelge 4.3’te görüldüğü gibi göreceli allinaz gen ifade düzeyi depolama sıcaklıklarına göre karşılaştırılmasında, 4°C ve 21°C arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ancak başlangıç sıcaklığı ile depolama sıcaklıkları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Kastamonu genotipinin göreceli allinaz gen ifadesi düzeyinin depolama sıcaklığına göre karşılaştırılması (B: Başlangıç)

Depolama sıcaklığı (°C)	Göreceli allinaz gen ifade düzeyi
B	12,85 c*
4	32,37 b
21	39,15 a

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

Çizelge 4.3. PI515971 sarımsak genotipinin göreceli allinaz gen ifadesi düzeyinin depolama sıcaklığına göre karşılaştırılması (B: Başlangıç)

Depolama sıcaklığı (°C)	Göreceli allinaz gen ifade düzeyi
B	18,08 b*
4	87,89 a
21	88,89 a

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

Allinaz enzimi, sarımsakta dokular parçalandığında kükürtlü bileşik olan allin ile reaksiyona girerek bu bileşiği allisine dönüştürmektedir. Allinaz gen ifadesi ile sarımsak başlarındaki bu iki kükürtlü bileşik içeriği arasında bir korelasyon olup olmadığını

belirlemek için Pearson korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Korelasyon analizinde kullanılan allin ve allisin değerleri daha önceden tamamlanan TÜBİTAK-TOVAG 113O228 nolu ve “Sarımsakta Düşük Sıcaklık Koşullarında Tiamin Biyosentezinde Görev Alan THIC Genin İfade Düzeyi, Tiamin ve Bazı Biyokimyasal Bileşiklerin İçeriklerinde Oluşan Değişimlerin Belirlenmesi” başlıklı projeden alınmıştır. Bu proje kapsamında Kastamonu ve PI515971 nolu sarımsak genotipleri başlarında 4°C ve 21°C’de 12 hafta depolama süresince allin ve allisin içeriğindeki değişimler belirlenmiştir. Bu projede PI515971 sarımsak genotipinde allinin başlangıç değeri 12.00 mg/g KA olarak ölçülmüştür. Allin değerinin 4°C’ de 12 hafta depolandıktan sonra 14.44 mg/g KA’a, 21°C’ de ise 19.24 mg/g KA’a yükseldiği belirlenmiştir. Aynı genotipte allisin değeri başlangıç seviyesi 1,98 mg/g iken, 4°C’ de 12 hafta depolanmış örneklerde 3,41 mg/g, 21°C’ de 12 hafta depolanmış örneklerinde ise 3,12 mg/g’dır. Kastamonu genotipinde ise allinin başlangıç değeri 18.25 mg/g KA’dan 4°C’de 12 hafta depolandıktan sonra 24.93 mg/g KA’a, 21°C 12 hafta depolandıktan sonra 25.85 mg/g KA ulaşmıştır.

Korelasyon analizlerinde PI515971 sarımsağı genotipinde göreceli allinaz gen ifadesindeki artış ile allin içeriği değişimi arasında 0.05 önem seviyesinde yüksek pozitif korelasyon ($r = 0.76$) tespit edilmiştir. Allinaz gen ifadesi ile allisin içeriğindeki değişimler arasında da 0.01 önem seviyesinde yüksek pozitif korelasyon ($r = 0.94$) belirlenmiştir. Ancak allin ve allisin kükürtlü bileşik içeriklerinin depolama süresince değişim değerleri arasındaki korelasyonun ($r = 0.52$) 0.05 önem seviyesinde anlamlı olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. PI515971 genotipinde göreceli allinaz gen ifadesiyle allin ve allisin içerikleri arasındaki korelasyon katsayıları

	Allin (mg/g)	Allisin (mg/g)
Allisin	0,52	
Göreceli allinaz gen ifadesi	0,76*	0,94**

*: Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır (2-uçlu).

** : Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-uçlu).

Kastamonu genotipi başlarında 12 hafta süre ile depolama sonunda görülen göreceli allinaz gen ifadesindeki artış ile allin içeriği değişimi arasında 0.01 önem düzeyinde yüksek pozitif korelasyon ($r = 0.96$) bulunmuştur. Allinaz gen ifadesi ile allisin içeriğindeki değişimler arasında da 0.01 önem düzeyinde yüksek pozitif korelasyon ($r = 0.82$) belirlenmiştir. Aynı şekilde allin ve allisin kükürtlü bileşik içeriklerinin depolama süresince değişim değerleri arasında yüksek pozitif korelasyon ($r = 0.88$) saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kastamonu genotipinde göreceli allinaz gen ifadesiyle allin ve allisin içerikleri arasındaki korelasyon katsayıları

	Allin (mg/g)	Allisin (mg/g)
Allisin	0,88**	
Göreceli allinaz gen ifadesi	0,96**	0,82**

** : Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-uçlu).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sarımsağın, antibakteriyel ve antimikrobiyal özelliğinin “allisin” ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Allisin, sarımsak dişleri bütün iken oluşmamakta, sadece dişler mekanik zarara uğradığında allinaz enzimin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Allinin allinaz enzimi ile parçalanması sonucu allisin meydana gelmektedir (Iberl ve ark. 1990).

Yaptığımız Real-Time PCR analiz sonuçlarına göre göreceli allinaz gen ifadesi düzeyi en yüksek değer PI515971 sarımsak genotipi örneklerinin 21°C’de 12 hafta depolanması sonucu belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.1). Bu sonuca en yakın değer PI515971 sarımsak genotipinin 4°C’de 12 hafta depolanması sonucunda görülmüştür.

PI515971 sarımsak genotipin incelendiğinde her iki sıcaklık derecesinde depolama öncesine göre göreceli allinaz gen ifade düzeyinde önemli bir artış görülmüştür. Ancak iki sıcaklık derecesi arasında gen ifade düzeylerinde istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir (bkz. Çizelge 4.3). Kastamonu genotipi analiz sonuçlarına göre de 4°C ve 21°C’de depolanan örneklerde başlangıca göre göreceli allinaz geni ifade düzeyinde önemli bir artış olmuştur. İki sıcaklık değeri karşılaştırıldığında ise 21°C’de artışın istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (bkz. Çizelge 4.2).

Koççat (2016), yüksek lisans tez çalışmasında Kastamonu ve PI515971 sarımsak genotiplerinin 4°C ve 21°C’de 4, 8 ve 12 hafta depolanması sonucunda tiamin (B1 vitamini) biyosentezinde görev alan THIC geni ifade düzeyindeki değişimleri araştırmıştır. Bu araştırmaya göre PI515971 sarımsak genotipi 12 hafta depolandıktan sonra başlangıca göre 25 kat, 21°C’de 12 hafta depolandıktan sonra ise başlangıca göre 2,5 kat gen ifade düzeyinde artış göstermiştir. Kastamonu genotipinde ise 4°C’de 12 hafta depolandıktan sonra başlangıca göre 25 kat THIC geni ifade düzeyinde artış gözlenirken 21°C’de anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Sarımsakta depolama süresince gen aktivesinin değişmesi konusunda yapılan başka bir yüksek lisans tez çalışmasında da düşük sıcaklıkta depolamanın (4°C) oda sıcaklığında (21°C) depolamaya göre protein ifade profilindeki değişim üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir (İl 2019). 4°C’de depolamada gözlemlenen daha yüksek THIC geni ifade düzeyi ve protein ifade düzeyindeki değişim düşük sıcaklıkta dinlenmenin kırılmasıyla ilişkilendirilebilir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında ise göreceli allinaz gen ifade düzeyi hem 4°C hem de

21°C’de depolanan sarımsak örneklerinde başlangıç değerine göre önemli artış göstermiş ve yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak 21°C’de depolanan örneklerde daha yüksek bir artış gerçekleşmiştir.

Allinaz gen ifade düzeyinin allin ve allisin içeriği arasında bir korelasyon olup olmadığını belirlemek için korelasyon analizi yapılmıştır. Korelasyon analizinde, TÜBİTAK-TOVAG-113O228 nolu projede belirlenen allisin ve allin verileri kullanılmıştır. Korelasyon analizi sonuçlarına göre allinaz göreceli gen ifade düzeyindeki artış ile allin ve allisin içeriğindeki artış arasında hem Kastamonu hem de PI515971 genotipinde yüksek pozitif korelasyon belirlenmiştir (Çizelgeler 4.4 ve 4.5). Yüksek pozitif korelasyon allinaz gen ifadesinin hücrede yüksek allin konsantrasyonu ile yukarı doğru düzenlendiğini (upregulation) işaret etmektedir.

Ayrıca bu tez çalışmasında PI515971 genotipinde başlangıç allinaz göreceli gen ifadesinin Kastamonu sarımsağına göre iki kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak TÜBİTAK-TOVAG-113O228 nolu projede PI515971 sarımsak genotipinin allin ve allisin içeriklerinin Kastamonu genotipine göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Li ve ark. (2018) sarımsak dişlerinde depolama sırasında düşük sıcaklığın neden olduğu ve sarımsak kalitesini olumsuz etkileyen yeşillenme ile ilişkili genleri belirlemek için yeni nesil RNA-seq analizleri ile transkriptomik çalışması yapmışlardır. Analizlerde düşük sıcaklıkta (4°C) depolama sonucu dişlerde yeşillenmeye neden olabilecek farklı şekilde ifade olan 7 tane allinaz kodlayan gen, 5 tane γ -glutamyltranspeptidase kodlayan gen ve 1 tane δ -aminolevulinic acid dehidratase kodlayan gen belirlemişlerdir. Sarımsak γ -glutamyltranspeptidase enzimi allin biyosentez yolağındaki γ -glutamyl-S-alk(en)yl-L-cysteine ara bileşikteki γ -glutamyl grubu uzaklaştırarak allin sentezlenmesini sağlamaktadır (Yoshimoto 2015). Allinaz geni ise sentezlenen allini kükürtlü bileşikler biyosentez yolağının bir sonraki aşamasında allisine dönüştürmektedir. Sarımsakta yapılan başka bir çalışmada başların düşük sıcaklıkta depolanmasıyla γ -glutamyltranspeptidase aktivitesinin arttığı ve sarımsak dişi püresine bu enzim eklendiğinde yeşil renge dönüştüğü ortaya çıkarılmıştır (Li ve ark. 2008). Bu yeşil rengin sarımsakta allinaz enziminin aktivitesi sonucu açığa çıkan tiosülfınatların (allisin ve diğer tiosülfınatlar) neden olduğu belirtilmektedir (Kubec ve ark. 2004, Bai ve ark. 2005). Daha önce yürütülen TÜBİTAK-TOVAG-113O228 nolu projenin depolama

denemelerinde de dişler soyulduğunda PI515971 sarımsak genotipi dişlerinde daha fazla yeşillenme olduğu gözlemlenmiştir (veriler alınmamıştır). PI515971 genotipinde dişlerde görülen yeşillenme allin ve allisin içeriğinin Kastamonu sarımsağına göre daha düşük olmasına rağmen allinaz gen ifadesinin iki kat daha yüksek olması ile ilişkili olabilir. Kastamonu genotipinde 12 hafta depolama sonunda yeşillenmenin daha az görülmesinin ise bu genotipte allinaz gen ifadesinin daha düşük olması ile ilişkili olabilir. Allinaz enzimi ve substratı olan allin hücrede farklı yerlerde depolanmaktadır. Allinaz hücre kofulunda depolanırken allin sitozolda bulunmaktadır. Hücre parçaladığında enzim ve allin bir araya gelerek allisin sentezlenmektedir (Ellmore ve ark. 1994). Bitkilerde stres koşullarında özellikle düşük sıcaklık stresinde hücredeki koful zarı zarar görmekte ve zararlanan kofullardaki metabolitler sitoplazmaya sızmaktadır (Willing ve ark.1983, Murai ve ark. 1998). Bu tez çalışmasında düşük sıcaklık depolama koşullarında allinaz enzimi gen ifadesi ve aktivitesinin artması düşük sıcaklık stresinden dolayı kofulda meydana gelen zararlanmadan kaynaklanmış olabilir ve bu zararlanma PI515971 genotipinde daha yüksek gerçekleşmiş olabilir. Oda sıcaklığı koşullarında ise gen ifadesinin yüksek olması ve bunun yine PI515971 genotipinde daha yüksek gerçekleşmesi bu genotipin depolamaya daha az dayanıklı olması ve erken sürmesinden kaynaklanmış olabilir.

PI515971 ve Kastamonu sarımsak genotipleri genetik ve bazı fiziksel özellikler yönünden farklılık göstermektedir. Çoğaltılmış parça uzunluğu farklılığı (AFLP) DNA moleküler markırları ile yapılan bir çalışmada PI515971 ve Kastamonu genotipinin çiçeklenmeyen sarımsak grubuna girdiği ancak genetik olarak birbirinden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir (İpek ve ark. 2008). Yaptığımız gözlemlere göre de PI515971 genotipi Kastamonu sarımsağına göre daha erkenci ve hasattan sonra depolamaya daha az dayanmaktadır. Kastamonu genotipi adi depolarda 6-9 ay kadar sürmeden depolanabilirken PI515971 genotipi 4-5 ay sonra sürmeye başlamaktadır. İki genotip soğuklama ihtiyacı yönünden de farklılık göstermektedirler. Kastamonu genotipinde dinlenmenin kırılması için gerekli soğuklama ihtiyacı PI515971 genotipine göre 3-4 hafta daha uzun olmaktadır. Ayrıca TÜBİTAK-TOVAG-1130228 nolu projede Kastamonu genotipinde kuru madde oranının (%40,22) PI515971 genotipi kuru madde (%33) oranına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak bu projede depolama süresince baş ağırlık kaybı ve diş ortasındaki sürgün uzunluğundaki

değişimler de ölçülmüş ve PI515971 genotipinde ağırlık kaybı ve sürgün uzunluğunun 21°C’de depolan örneklerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kastamonu genotipi ile karşılaştırıldığında ise PI515971 genotipinde her iki depolama sıcaklık koşullarında ağırlık kaybının ve sürgün uzunluğunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bütün bu farklılıklar ve bu tez çalışmasında allinaz gen ifadesinin PI515971 genotipinde daha yüksek olması bu genotipin düşük sıcaklık stresine ve erken sürmeye karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Sarımsakta allinaz enziminin depolama sırasında gen ifadesinin değiştiğini ve bu değişimin sarımsak dişlerinde kaliteye olan etkisini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bununla birlikte sarımsakta depolama sırasında allin ve allisin içeriği değişiminin belirlendiği bazı çalışmalar mevcuttur. Hughes ve ark. (2006), oda sıcaklığında ve 4°C’de 6 ay depoladıkları sarımsak örneklerinde kükürlü bileşik içeriklerine sarımsak dişlerinin baş üzerinde bulunduğu yerin etkisini ve içeriklerdeki değişimi HPLC yöntemiyle incelemişlerdir. Allin seviyesinde, sarımsak başının iç tarafındaki dişleri ile dış tarafındaki dişleri arasında istatistiksel fark bulunmuştur. Dış tarafta bulunan dişlerde allin seviyesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak allin seviyesinin depolama süresince değişmediğini belirlemişlerdir. Sukkaew ve ark. (2011)’ın yaptığı başka bir çalışmada sarımsak başları için 7 farklı deneme grubu oluşturmuştur. Bu gruplar sırasıyla kontrol (1.grup), 4-6°C’de %60-70 nemde (2.grup), 4-6°C’de %80-90 nemde (3.grup), 8-10°C’de %60-70 nemde (4.grup), 8-10°C’de %80-90 nemde (5.grup) depolanmıştır ve 4 ay boyunca her 20 günde bir allisin ölçümleri yapılmıştır. Bu araştırmaya sonucunda her deneme grubunda allisin içeriğinin arttığı belirtilmiştir. Dört ay depolama sonucunda allisin miktarı kontrol grubuna göre 2.grupta %119, 3.grupta %149, 4.grupta %138 ve 5.grupta ise %165 oranında artmıştır. Sonuç olarak allisin miktarının sıcaklık ve bağıl nem arttıkça arttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tez çalışmasında göreceli allinaz gen ifadesi düzeyinde her iki sarımsak genotipinin her iki sıcaklık koşullarında depolanan örneklerinde depolama öncesine göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Ancak bu artış 21°C’de depolanan örneklerde daha fazla gerçekleşmiştir. Ayrıca allinaz gen ifadesindeki artış ile kükürlü bileşiklerden allin ve allisin içerikleri arasında yüksek korelasyonlar tespit edilmiştir. Allinaz gen ifadesindeki artış daha önce literatürde sarımsak kükürlü bileşik

biyosentezinde görev alan γ -glutamiltranspeptidase enzim aktivitesinin düşük sıcaklıkta depolama süresince artışı ile de örtüşmektedir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda iki enzimin gen ifade düzeyinin birlikte analiz edilmesi sarımsakta hasattan sonra depolama periyodunda kükürlü bileşiklerin biyosentez mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR

Abu-Lafi, S., Dembicki, J.W., Goldshlag, P., Hanus, L.O., Dembitsky, V.M., 2004. The use of the cryogenic GC/MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the *Allium sativum*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(2): 235-245.

Anonim, 2019a. Sarımsak (*Allium sativum*). Ankara, https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/7750/mod_resource/content/0/SARI_MSAK%2011.%20hafta.pdf (Erişim tarihi: 12.12.2019)

Anonim, 2019b. Soğan Sarımsak Hastalıkları ve Zararlıları ile Mücadele. Kilis, <https://kilis.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Yeti%C5%9Ftiricilik%20D%C3%B6k%C3%BCmanlar%C4%B1/sogan-sar%C4%B1msak.pdf>(Erişim tarihi: 10.12.2019).

Anonim, 2019c. Garlic. <https://cargohandbook.com/index.php/Garlic> (Erişim tarihi: 10.12.2019).

Anonim, 2019d. Post – Harvest Management, The National Horticultural Research and Development Foundation (NHRDF), Hindistan. http://nhrdf.org/en-us/pPostHarvestTech_G (Erişim tarihi: 10.12.2019)

Akan, S., 2014. Sarımsak (*Allium sativum* L.) Tüketiminin İnsan Sağlığına Yararları. *Academic Food Journal*, 12(2): 95-100

Aydın-Sayitoğlu, M., 2008. Hemotoloji’de Real-Time PCR , İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul. <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/mugeaydinsayitoglu.pdf> (Erişim tarihi: 12.12.2019).

Bai, B., Chen, F., Wang, Z., Liao, X., Zhao, G., Hu, X., 2005. Mechanism of the greening color formation of “Laba” garlic, a traditional homemade Chinese food product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7103–7107.

Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 368-371.

Bloem, E., Haneklaus, S., Schnug, E., 2011. Storage Life of Field-Grown Garlic Bulbs (*Allium sativum* L.) as Influenced by Nitrogen and Sulfur Fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (9): 4442-4444.

Bocchini, P., Andalo, R., Galletti, G.C., Amtonelli, A., 2001. Determination of Diallyl thiosulfinate (allisin) in garlic (*Allium sativum*) by Highperformance liquid chromatography with a post- column photochemical reactor. *Analaysis Chimica Acta*, 441(1): 37-43.

Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2): 169-193.

Cantwell, M.I., 2000. Garlic recommendations for maintaining postharvest quality. Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA 95616. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts>. (Erişim tarihi: 10.12.2019)

Cantwell, M.I., 2004. Garlic. Recommendations for maintaining postharvest quality. Retrieved from <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts> (Erişim tarihi: 10.12.2019).

Cantwell, M.I., Suslow, T.V., 2002. Postharvest handling systems: Freshcut fruits and vegetables. Davis, CA: Post harvest Technology Center, University of California. <https://www.researchgate.net/publication/313180473> (Erişim tarihi: 10.12.2019)

Dhall, R.K., Ahuja, S., 2013. Post-harvest management of garlic. National Seminar on "High-Tech Cultivation of Vegetables and its Postharvest Management". Karnal, India: NHRDF, s.117–121.

Doğru, M.Ş., Balkaya, A., 2015. Lahanalarda tohum üretim süresini kısaltmaya yönelik uygulamalar ve etki mekanizmaları. *Alatarım*, 14 (2): 29-37.

Ellmore, G.S., Feldberg, R.S., 1994. Alliin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *American Journal of Botany*, 81(1): 89–94.

Evren, M., Apan, M., Albayram, C., 2006. Sarımsağın Antimikrobiyel Özellikleri. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.

FAO, 2017. Dünya Sarımsak Üretimi. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>

Freeman, G.G., Whenham, R.J., 1975. A survey of volatile components of some allium species in terms of s-alk(en)yl-l-cysteine sulphoxides present as flavour precursors. *Journal of Science Food Agricultural*, 26: 1869-1886.

Fritsch, R.M., Friesen, N., 2002. Recent Advances: Allium Crop Science, Editor(s): Rabinowitch, H.D., Currah, L., The Hebrew University of Jerusalem, İsrail, s.5-30

Ghannoum, M.A., 1988. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). *Journal of Genetical Microbiology*, 134(11): 2917-2924.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10): 995-1001.

Grove, D.S., 1999. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using Taqman and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *Journal of Biomolecular Techniques*, 10: 11-16

- Günaydın, Ö., 2011.** Sarımsakta (*Allium sativum* L.) düşük sıcaklıkta depolama uygulamasından farklı etkilenen aday genlerin cDNA- AFLP yöntemi ile belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.
- Haris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Lloyd, D., 2001.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3): 282-286.
- Horev-Azaria, L., Eliav, S., Izigov, N., 2009.** Allicin up-regulates cellular glutathione level in vascular endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, 48: 67-74.
- Hughes, J., Collin, H.A., Tregova, A., Tomsett, A.B., Cosstick, R., Jones, M.G., 2006.** Effect of Low Storage Temperature on Some of the Flavour Precursors in Garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 61: 81-85.
- Iberl, B., Winkler, G., Knobloch, K., 1990.** Products of allisin transformation: ajoenes and dithiins characterization and their deteren düşükation by HPLC. *Planta Medical*, 56: 202-211.
- Ichikawa, M., Nagatoshi, I., Yoshida, J., Yamaguchi, H., Kazuhisa, O., 2006a.** Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 1535-1540.
- Ichikawa, M., Nagatoshi, I., Kazuhisa, O., 2006b.** Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 4849-4854.
- Izigov, N., Farzam, N., Savion, N., 2011.** Sallylmercapto-N-acetylcysteine up-regulates cellular glutathione and protects vascular endothelial cells from oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(9): 1131-1139.
- İl, A., 2019.** Sarımsakta düşük sıcaklıkta farklı ifade olan protein profillerin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.
- İpek, M., İpek, A., Simon, P.W., 2008.** Molecular characterization of Kastamonu garlic: An economically important garlic clone in Turkey. *Science Direct*, 115: 203-208.
- Kemper, K.J., 2000.** Garlic (*Allium sativum*). The Longwood Herbal Task Force. <https://www.yumpu.com/en/document/read/3781207/garlic-allium-sativum-longwood-herbal-task-force> (Erişim tarihi: 11.12.2019)
- Koççat, S., 2016.** Sarımsakta depolama süresince tiamin biyosentezinde görev alan *THIC* geninin ifade düzeyindeki değişimin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

- Kubec, R., Hrbáčová, M., Musah, R. A., Velíek, J., 2004.** *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5089–5094.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjogreen, J., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006.** The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3): 95-125.
- Lawande, K.E., 2018.** Onion and garlic storage for value addition and supply chain management. *Journal of Allium Research*, 1(1): 1–6.
- Lawson, L.D., Huges, B.G., 1992.** Characterization of the formation of allisin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Medical*, 58(4): 345-350
- Lawson, L.D., Wang, Z., 2001.** Low Allisin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of allinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5): 2592-2599.
- Li, L., Hu, D., Jiang, Y., Chen, F., Hu, X., Zhao, G., 2008.** Relationship between γ -glutamyl transpeptidase activity and garlic greening, as controlled by temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3): 941–945.
- Li, N., Qiu, Z., Lu, X., Shi, B., Sun, X., Tang, X., Qiao, X., 2018.** Comparative transcriptome analysis of temperature-induced green discoloration in garlic. *International Journal of Genomics*, 2018: 1-8.
- Losling, P., 2003.** Alicin the heart of garlic. NWI Publishing, Callahan Florida, s.6-158.
- Mazelis, M., Crews, L., 1968.** Purification of the allin lyase of garlic, *Allium sativum* L. *Biochemical Journal*, 108: 725-730.
- Meireles, M.A.A., Fariás-Campomanes, A.M., Horita, C.N., Pollonio, M.A.R., 2014.** Allicin-Rich Extract Obtained from Garlic by Pressurized Liquid Extraction: Quantitative Determination of Allicin in Garlic Samples. *Food and Public Health*, 4(6): 273.
- Miedema, P., 1994.** Bulb dormancy in onion. I. The effects of temperature and cultivar on sprouting and rooting. *Journal of Horticultural Science*, 69(1): 29–39.
- Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M., 1996.** Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *Journal Clinical Microbiology*, 34(12): 2933-2936.
- Murai M., Yoshida, S., 1998.** Vacuolar membrane lesions induced by a freeze-thaw cycle in protoplasts isolated from deacclimated tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant and Cell Physiology*, 39(1): 87–96.

Omar, S.H., Al-Wabel, N.A., 2010. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 51–58.

Rahman, 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.

Resende, J.T.V., Morales, R.G.F., Resende, F.V., Faria, M.V., Souza R.J., Marchese, A., 2011. Garlic vernalization and planting dates in Guarapuava. *Horticultura Brasileira*, 29: 193-198.

Rybak, M.E., Calvey, E.M., Harnly, J.M. 2004. Quantitative determination of alicin in garlic: Supercritical fluid extraction and Standard addition of Allin. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52(4): 682-687.

Sabuncu, A.B., 2005. Çinkonun sarımsak (*Allium sativum* L.)’ta verim ve bazı kalite parametrelerine etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Ankara.

Stoll, V.A., Seebeck, E., 1947. Allin, the pure mother substance of garlic oil. *Experientia*, 3(3): 114-115.

Stoll, V.A., Seebeck, E., 1948. Allium compounds. I. Allin, the true mother compound of garlic oil. *Helvetica Chimica Acta*, 31(1): 189-194.

Suong, N.T., Desmond, B.W., Lynne, C., Richard J., 2007. Does Garlic Reduce Risk of Colorectal Cancer? A Systematic Review Head. *The Journal of Nutrition*, 137(10): 2264–2269.

Sukkaew, P., Tira-umphon, A., 2011. Effects of Storage Conditions on Allisin Content in Garlic (*Allium sativum*). *Acta Horticulturae*, 969: 209-212.

TUIK, 2018. Türkiye taze ve kuru sarımsak üretimi. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>

Tung, Y., Chung, W., Chen, S.Y., 1989. Effects of pH adjustment and heat treatment on the stability and formation of volatile compounds of garlic. *Journal of Food Science*, 37(3): 730-734.

Villamiel, M., Corzo-Martinez, M., Corzo, N., 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12): 609-625.

Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bornova, İzmir, s.42-51

Willing, R.P., Leopold, A.C., 1983. Cellular expansion at low temperature as a cause of membrane lesions. *Plant Physiology*, 71(1): 118–121.

Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D., 2007. Postharvest-An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals. 5th ed. CABI, Wallingford, UK.

Yoshimoto, N., Yabe, A., Sugino, Y., 2015. Garlic γ -glutamyl transpeptidases that catalyze deglutamylation of biosynthetic intermediate of alliin, *Frontiers in Plant Science*, 5: 758.

Yünlü, S., 2011. Soğan (*Allium cepa*) ve Sarımsaktaki (*Allium sativum*) Fenolik Bileşiklerin HPLC Yöntemiyle Tayin Edilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Isparta.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Rukiye ERŞAHİN
Doğum Yeri ve Tarihi :Mersin 15.05.1992
Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yıldırım Beyazıt Lisesi - 2010
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi – Ziraat
Fakültesi – Bahçe Bitkileri - 2016
Yüksek Lisans :Bursa Uludağ Üniversitesi- Fen Bilimleri
Enstitüsü -Bahçe Bitkileri A.B.D.- 2020

İletişim (e-posta) : r.ersahinn@gmail.com

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar :Pak Tohumculuk Ltd. Şti. 2019-