

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ELMA ÇEŞİTLERİNDE ANTOSİYANİN BİYOSENTEZİNİN
DÜZENLENMESİNDE ROL OYNAYAN *MdMYBA*, *MdMYB10* VE
MdMYB3 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

Emine Ece MERCAN

Danışman
Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2017



©2017 [Emine Ece MERCAN]

TEZ ONAYI

Emine Ece MERCAN tarafından hazırlanan "Farklı Elma Çeşitlerinde Antosiyanin Biyosentezinin Düzenlenmesinde Rol Oynayan *MdMYBA*, *MdMYB10* ve *MdMYB3* Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonlarının Belirlenmesi"adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

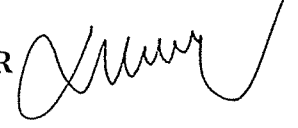
Danışman

Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Birsen ÇAKIR AYDEMİR
Ege Üniversitesi



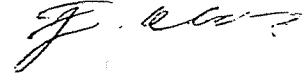
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Emine Ece MERCAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa	
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Elma Üretimi ve Elmanın Ekonomik Önemi.....	3
2.2. Elmanın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	5
2.3. Bitkilerde Bulunan Renk Maddeleri.....	6
2.3.1. Karotenoidler.....	10
2.3.2. Klorofiller.....	11
2.3.3. Antosiyaninler.....	12
2.4. Transkripsiyon Faktörleri.....	19
2.5. MYB Transkripsiyon Faktörlerinin Yapı ve Fonksiyonları.....	20
2.6. Meyvelerde Renklenmede Etkili Olan MYB Transkripsiyon Faktörleri.....	29
2.7. Elmalarda Renklenmede Etkili Olan MYB Transkripsiyon Faktörleri.....	34
3. MATERYAL VE METOD.....	38
3.1. Bitki Materyali.....	38
3.1.1. Scarlet Spur elma çeşidinin özellikleri.....	39
3.1.2. Galaxy Gala elma çeşidinin özellikleri.....	39
3.1.3. Golden Delicious elma çeşidinin özellikleri.....	39
3.1.4. Granny Smith elma çeşidinin özellikleri.....	39
3.1.5. Örnek alım zamanları.....	40
3.2. RNA İzolasyonu.....	41
3.3. DNase I Uygulaması.....	42
3.4. cDNA Sentezi.....	42
3.5. Real-Time PCR Çalışması.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	44
4.1. RNA İzolasyonu.....	44
4.2. cDNA Sentezi ve Real-Time PCR Çalışması.....	46
4.3. MdMYB10, MdMYBA ve MdMYB3 Transkripsiyon Faktörlerinin Elmalarda Renklenme Üzerine Olan Etkileri.....	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	52
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	70

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI ELMA ÇEŞİTLERİNDE ANTOSİYANİN BİYOSENTEZİNİN DÜZENLENMESİNDE ROL OYNAYAN *MdMYBA*, *MdMYB10* VE *MdMYB3* TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

Emine Ece MERCAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Elma, dünyanın her yerinde üretimi yapılan önemli bir ılıman iklim meyvesidir. Tüketimin artmasıyla birlikte elmanın meyve rengi, tadı ve aroması gibi karakteristik özellikleri kalitenin bir göstergesi haline gelmiştir. Elmalarda tat ve aromanın belirtisi olduğuna inanılan kırmızı renklenmenin ana kaynağı olan antosiyaninler, bitkilerde çevresel ve genetik faktörlerin etkisi altında sentezlenmektedir. Antosiyanin biyosentezini etkileyen genetik faktörlerin başında transkripsiyon faktörleri (TF) gösterilmektedir. Büyük bir aile olan MYB transkripsiyon faktörlerinin alt grubu olan iki tekrarlı MYB (R2R3 MYB) TF ise; bitkilerde antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Bu çalışmada elmalarda antosiyanin üretimini düzenleyen genetik faktörlerin başında gelen R2R3 MYB TF'lerinden olan *MdMYB10*, *MdMYBA* ve *MdMYB3* TF'lerinin ekspresyon seviyeleri; yeşilden koyu kırmızıya kadar farklı renklenme gösteren elma çeşitlerinde meyve olgunlaşmasının farklı dönemlerinde incelenmiştir. Çalışmada koyu kırmızı renkli Scarlet Spur, açık kırmızı renkli Galaxy Gala, sarı renkli Golden Delicious ve yeşil renkli Granny Smith elma çeşitleri kullanılmıştır. Bu elma çeşitlerinin meyveleri tam çiçeklenmeden sonra dört farklı büyüme evresinde toplanmış ve kabukları soyularak örnekler alınmıştır. Toplanan meyve kabuklarından CTAB-LiCl metodu kullanılarak toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lar ve *MdMYB10*, *MdMYBA* ve *MdMYB3* TF'lerine spesifik primerler kullanılarak real-time PCR yöntemiyle bu üç genin ekspresyon düzeyi farklı renklenme gösteren elma çeşitlerinde belirlenmiştir. Yapılan bu araştırmanın sonucunda farklı renklere sahip elma çeşitlerinde ve meyve olgunlaşmasının farklı dönemlerinde *MdMYB10*, *MdMYBA* ve *MdMYB3* TF'lerinin antosiyanin biyosentezi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Elma, antosiyanin, MYB transkripsiyon faktörü, gen ekspresyonu, real-time pcr

2017, 69 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

EXPRESSION ANALYSIS OF MdMYBA, MdMYB10 AND MdMYB3 TRANSCRIPTION FACTORS ARE INVOLVED IN THE REGULATION OF ANTHOCYANIN BIOSYNTHESIS IN DIFFERENT APPLE VARIETIES

Emine Ece MERCAN

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Apple is an important temperate climate fruit produced all over the world. Characteristic features such as fruit color, taste and aroma has become an indicator of its quality. Anthocyanins are the source of red coloration is believed to be a sign of taste and aroma. Anthocyanins biosynthesis influenced by environmental and genetic factors in plants. Transcription factors (TFs) are one of the genetic factors affecting the anthocyanin biosynthesis. Two repeat MYB (R2R3) transcription factors subgroup of MYB family are involved in regulation of anthocyanin biosynthesis in plants. In this study, expression level of MdMYBA, MdMYB10 and MdMYB3 TFs were analyzed in fruits of apple varieties showing from green to dark red coloration. For this purpose, fruit samples were collected from dark red colored Scarlet Spur, light red colored Galaxy Gala, yellow colored Golden Delicious and green colored Granny Smith apple varieties at different stages of fruit development period after the full bloom. Total RNA was isolated from the peel of the collected fruits using the CTAB-LiCl method. Expression level of MdMYBA, MdMYB10 and MdMYB3 TFs were analyzed by real-time RT-PCR method from apple cultivars showing different coloration at different fruit development stages. The result of this study showed that MdMYBA, MdMYB10 ve MdMYB3 TFs are associated with red coloration in apple fruits.

Keywords: Apple, anthocyanin, MYB transcription factors, gene expression

2017, 69 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, literatür araştırmalarımnda yardımcı olan ve bilgi ve tecrübesi her zaman bana yardımcı olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK'e teşekkürlerimi sunarım. Arazi ve laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Mehmet AKSU, Emine Doğuş SİVRİ, Ezgi SÖNMEZ ve Nadire SAKALLI'ya teşekkür ederim.

4458-YL1-05 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan eşim Fatih MERCAN'a, destekleriyle her zaman yanımda olan anneme, babama ve kardeşime sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Emine Ece MERCAN
ISPARTA, 2017

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sekonder metabolitlerin biyosentezi.....	7
Şekil 2.2. Flavonoidlerin sınıflandırılması	9
Şekil 2.3. Karotenoidlerin kimyasal yapıları	10
Şekil 2.4. Karotenoid biyosentez yolu.....	11
Şekil 2.5. Klorofil biyosentez yolu	12
Şekil 2.6. Antosiyanin genel yapısı ve antosiyanin grupları.....	13
Şekil 2.7. Antosiyanin biyosentez yolu	14
Şekil 2.8. MYB transkripsiyon faktörleri sınıfları.....	21
Şekil 2.9. MYB domainlerinin genel yapısı.....	22
Şekil 2.10. MYB TF'lerin tekrar sayılarına göre genel yapısı	22
Şekil 2.11. Antosiyaninlerin üretiminde etkili olan MYB TF'leri.....	28
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan elma çeşitleri.....	38
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan elma çeşitlerinin olgunlaşmayla birlikte renk değişimleri	40
Şekil 3.3. Elma bahçesinde meyvelerden kabuk örneklerinin alınması ve sıvı azot içinde dondurulması	41
Şekil 4.1. CTAB yöntemiyle kullanılarak elde edilen RNA'nın agaroz jel elektroforez resmi	44
Şekil 4.2. Trizol kullanılarak elde edilen RNA'nın agaroz jel elektroforez resmi	44
Şekil 4.3. Elma örneklerinden izole edilen toplam RNA'ların DNase I uygulamasından sonra elde edilen agaroz jel görüntüsü	45
Şekil 4.4. Elma örneklerinden ikinci defa izole edilen toplam RNA'ların DNase I uygulamasından sonra elde edilen agaroz jel görüntüsü görüntüleri	46
Şekil 4.5. <i>MdActin</i> ve <i>MdUbikutin</i> genleri ile yapılan deneme sonuçları.....	47
Şekil 4.6. cDNA'ların kontrolü için referans gen kullanılarak yapılan real-time PCR çalışması	48
Şekil 4.7. <i>MdMYB10</i> geninin real-time PCR sonuçları	49
Şekil 4.8. <i>MdMYBA</i> geninin real-time PCR sonuçları.....	50
Şekil 4.9. <i>MdMYB3</i> geninin real-time PCR sonuçları.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dünyada ve Türkiye'deki bazı önemli elma çeşitleri ve renk grupları.....	4
Çizelge 2.2. 2016 yılı Dünya elma üretimi	4
Çizelge 2.3. Türkiye'de illere göre 2016 yılı üretim miktarları	5
Çizelge 2.4. Türkiye'de üretimi yapılan başlıca elma çeşitleri ve 2016 yılı üretim miktarları	5
Çizelge 2.5. Farklı MYB protein sınıflarının fonksiyonları.....	23
Çizelge 2.6. Bitkilerdeki bazı MYB TF'lerinin görevleri	24
Çizelge 2.7. Meyve çeşitlerinde ışıkla uyarılan MYB TF'leri.....	27
Çizelge 2.8. Farklı meyve türlerinde MYB TF'lerin etki ettiği yapısal genler ve meyve dokuları	33
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan elma çeşitleri ve kabuk renkleri.....	38
Çizelge 3.2. Farklı elma çeşitlerine ait meyvelerin alım tarihleri	41
Çizelge 3.3. Real-time PCR uygulamasında kullanılan primer dizileri.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALA	Aminolevunilik asit
AMV	Miyeloblastosis virüsü
ANS	Antosiyanin sentaz
bZIP	Temel lösin fermuarı
C1	COLORED1
C4H	Sinamat 4-hidroksilaz
CHI	Kalkon izomeraz
CHS	Kalkon sentaz
c-MYB	HücreSEL MYB
CTAB	Setiltrimetil amonyum bromid
Cy	Siyanidin
DFR	Dihidroflavonon 4-redüktaz
DMAPP	Dimetilla-difosfat
Dp	Delfidin
EDTA	Etilendiaminetetraasetik asit
ERF/AP2	Etilen cevap faktörü/APETELA2
F3H	Flavanon 3-hidroksilaz
GGDP	Geranilgeranil-difosfat
HTH	Heliks-turn-heliks
IPP	İzopentildifosfat
LiCl	Lityum klorür
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu
Mv	Malvidin
MYB	Miyeloblastosis
MYBDL2	MYB-LİKE2
MYC	Miyelositomasis
NLS	Nüklear lokalizasyon sinyali
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pg	Pelargonidin
Pn	Peonidin
Pt	Petunidin
TAD	Transkripsiyonel aktivasyon domainin
TF	Transkripsiyon faktörü
UFGT	UDPG-flavonoid-3-O-glukoziktransferaz
v-MYB	Viral MYB
4CL	4-kumarat CoA ligaz

1. GİRİŞ

Elma, dünyanın her yerinde üretimi yapılan önemli bir ılıman iklim meyvesidir. Tüketime artmasıyla birlikte elmanın meyve rengi, tadı ve aroması gibi karakteristik özellikleri kalitenin bir göstergesi haline gelmiştir. Tat ve aromanın belirtisi olduğuna inanılan kırmızı renklenmenin, meyve kalitesinin en büyük göstergesi olduğu düşünülmektedir.

Çok farklı şekillerde tüketimi olan elma meyvesinin taze olarak tüketiminin yanında kuru meyve, konserve yapılarak, reçel ve marmelat olarak da değerlendirilmektedir. Ayrıca sirke ve meyve suyu yapımında da son zamanlarda oldukça fazla miktarda kullanılmakta olan elma meyvesi gıda sanayisinde de aroma verici olarak kullanılmaktadır.

Elmada bulunan pek çok kimyasal bileşiğin insan sağlığı üzerinde önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklere örnek olarak vitaminler ve sekonder metabolitlerden flavonoidler ve karetonoidler örnek olarak verilebilir (Xie vd., 2011). Sekonder metabolitler; bitkide büyüme ve gelişmede rol almayan ve bitkide patojenlere ve herbivorlara karşı savunmada ve aynı zamanda renk ve koku oluşumunda görevli olan bileşiklerdir. Sekonder metabolitlerden olan flavonoidlerin bir sınıfı olan antosiyaninlerin kanser, kalp hastalıkları, oksidatif stres ve diğer yaşlanmayla ilişkili hastalıklarda yararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir (Ross vd., 2002). Antosiyaninler diğer bitki türlerinde olduğu gibi elmada da kırmızı renklenmenin ana kaynağını oluşturmaktadır (Vimolmangkang vd. 2014). Elmalarda renklenme koyu kırmızıdan yeşile kadar farklı tonlarda ortaya çıkmaktadır. Elmalarda; antosiyanince zengin kırmızı elmalardan ve antosiyanin miktarı daha az olan yeşil elmalara kadar oluşan renk farklılıklarının nelerden kaynaklandığının belirlenmesi önemli bir konudur. Bundan yola çıkılarak elmadaki antosiyanin sentezinin nasıl gerçekleştiği üzerine pek çok çalışma yapılmıştır.

Bitkilerde antosiyanin biyosentezinin iki farklı etmeden etkilendiği gösterilmiştir. Bunlardan birincisi yoğun bir şekilde çalışılmış olan çevresel

faktörlerdir ve bu çalışmaların sonucunda doğal ışık olan UV-B (280-330 nm) dalga boyundaki ışığın ve gece gündüz arası oluşan sıcaklık farklılıklarının antosiyanin üretimini pozitif yönde etkiledikleri gösterilmiştir (Ban vd., 2007).

İkinci etmen olan genetik faktörler ise antosiyanin biyosentezinde rol oynayan enzimlerin üretimlerinin düzenlenmesinde rol oynayan genleri içermektedir. Antosiyanin biyosentezinde düzenleyici rol oynayan bu genler transkripsiyon faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturan MYB transkripsiyon faktörleridir. MYB transkripsiyon faktörleri antosiyanin biyosentez genlerinin çalışmalarını düzenleyerek bitkilerde antosiyanin üretimini teşvik ederler ya da baskılarlar (Ban vd., 2007).

Bu çalışmada elmalarda antosiyanin üretimini düzenleyen MYB transkripsiyon faktörlerinden *MdMYBA*, *MdMYB10* ve *MdMYB3* genlerinin ekspresyon seviyeleri yeşilden koyu kırmızıya kadar farklı renklenme gösteren elma çeşitlerinde meyve olgunlaşmasının farklı dönemlerinde incelenmiştir. Bu amaçla koyu kırmızı renkli Scarlet Spur, açık kırmızı renkli Galaxy Gala, sarı renkli Golden Delicious ve yeşil renkli Granny Smith elma çeşitlerinden, ham meyve, olgunlaşmakta olan meyve, hasat öncesi meyvesi ve hasat meyvesi dönemlerinde alınan meyvelerde *MdMYBA*, *MdMYB10* ve *MdMYB3* genlerinin ekspresyonları incelenerek, antosiyanin biyosentezi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Elma Üretimi ve Elmanın Ekonomik Önemi

Meyvecilik, ilk insanla birlikte başlamış ve medeniyetlerin gelişmesiyle birlikte hızlı bir gelişme göstermiştir. Meyve türlerinin gelişen ulaşım ağlarıyla birlikte farklı coğrafyalara yayılması, insanlığın yeni meyve türlerini keşfetmesine ve son yıllarda meyve ıslahında ve biyoteknolojide gerçekleştirilen yeni gelişmeler sonucunda dünyada üretimi yapılan meyvelerin sayılarında artışların gözlemlenmesine neden olmuştur (Gül, 2006). Meyve ve çekirdek yapılarına göre meyveler; yumuşak çekirdekli (elma, armut, ayva, alıç, muşmula, üvez, kuşburnu vb.), sert çekirdekli (kiraz, vişne, kayısı, şeftali, erik, kızılçık, iğde vb.), sert kabuklu (badem, ceviz, kestane, fındık, antep fıstığı vb.), üzüksü (üzüm, çilek, ahududu, böğürtlen, dut, incir vb.), turunçgiller (limon, portakal, altıntop, mandarin, turunç vb.) ve keyif bitkileri (çay, kakao, kahve vb.) olarak sınıflandırılmaktadır (MEB, 2011). Yumuşak çekirdekli meyveler içinde yer alan elma, farklı iklimlere oldukça iyi adapte olduğundan dolayı dünyanın pek çok bölgesinde üretilmektedir (Pereira-Lorenzo vd., 2009). Elmanın ana vatanının Orta Asya'daki Tian Şan Dağları olduğu düşünülmektedir. İnsanların yerleşik hayata geçmesiyle birlikte bu bölgedeki elmalar ticaret yollarıyla pek çok ülkeye tanıtılmıştır. Elma taze olarak tüketilmesiyle birlikte, kurutulmuş meyve, konserve, reçel ve marmelat olarak da değerlendirilmektedir. Aynı zamanda elma; sirke ve meyve suyu yapımının yanı sıra, aroma verici olarak da pek çok gıda ürünüde kullanılmaktadır. Dünyada ve Türkiye' de yaygın olarak yetiştirilen ve çok çeşitli alanlarda kullanılan elmanın 6500'ü aşkın çeşidi olduğu düşünülmektedir (Oğuz ve Karaçayır, 2009). Bazı önemli elma çeşitleri ve bu çeşitlerin renklerine göre sınıflandırılmaları Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Dünyada ve Türkiye’deki bazı önemli elma çeşitleri ve renk grupları

No	Elma Çeşidi	Renk Grubu
1	Vista Bella	Homojen kırmızı menekşe rengi
2	Jersey Mac	Sarı zemin rengi üstüne parlak kırmızı
3	Summer Red	Kırmızı renkli, üzerine beyaz renkli lentiselli
4	Raritan	Koyu sarı üzerine kırmızı çizgili
5	Rubra Precoce	Kırmızı
6	Prima	Sarı
7	Hi-Early	Kırmızı
8	Gala Grubu	Sarı zemin rengi üstüne kırmızı
9	Elstar	Krem
10	Amasya	Yeşil zemin rengi üstüne koyu ve açık kırmızı
11	Demir	Yeşil zemin rengi üstüne koyu kırmızı çizgili
12	Red Delicious	Parlak sarı zemin üstüne açık veya koyu kırmızı çizgili
13	Golden Delicious	Açık sarı
14	Starking Delicious	Koyu karmen kırmızısı
15	Granny Smith	Parlak yeşil
16	Spartan	Yeşil zemin rengi üstüne koyu kırmızı
17	Jonagold	Sarı zemin rengi üstüne kırmızı çizgili
18	Fuji	Sarımsı renk üstüne portakal kırmızısı
19	Braeburn	Sarı zemin üstüne alev rengi
20	Spur	Koyu kırmızı

Dünyada elma üretimi yaklaşık 77 milyon tondur (USDA, 2016) (Çizelge 2.2). Bu üretimde en çok paya sahip olan ülke Çin'dir ve Çin'i sırasıyla ABD ve Türkiye takip etmektedir. Ülkelere göre elma üretim değerleri Çizelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. 2016 yılı Dünya elma üretimi

SIRA	ÜLKELER	2016 YILI ÜRETİM MİKTARI (TON)
1	Çin	43500000
2	Avrupa Birliği	12295000
3	ABD	4649000
4	Türkiye	2700000
5	Hindistan	1900000
6	İran	1693000
7	Şili	1410000
8	Rusya	1335000
9	Ukrayna	1211000
10	Brezilya	1045000
11	Diğer	5426000
	Dünya	77165000

Elma, ülkemizde hemen hemen tüm bölgelerde yetiştirilmekte ancak üretimin büyük bölümü Isparta, Niğde, Denizli, Antalya, Karaman, Kayseri, Çanakkale, Mersin, Konya ve Kahramanmaraş illerinde gerçekleştirilmektedir. Türkiye’de elma üretiminin illere göre sıralaması çizelge 2.3.’te verilmiştir (TUİK, 2016).

Çizelge 2.3. Türkiye’de illere göre 2016 yılı üretim miktarları

	İLLER	ÜRETİM MİKTARI (TON)
1	Isparta	596.503
2	Karaman	398.085
3	Niğde	376.906
4	Antalya	281.019
5	Denizli	196.329
6	Kayseri	108.959
7	Konya	101.081

Türkiye elma üretim miktarı 1961 yılında 283 bin ton iken (FAOSTAT, 2014), 2016 yılında ise 3 milyon tona ulaşmıştır (TUİK, 2016) ve üretimde yer alan başlıca elma çeşitleri arasında Starking Delicious ve Golden Delicious çeşitleri bulunmaktadır. Bunların dışında Granny Smith ve Amasya gibi yerli çeşitlerin de üretimleri yaygın olarak gerçekleştirilmektedir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Türkiye’de üretimi yapılan başlıca elma çeşitleri ve 2016 yılı üretim miktarları

SIRA	ELMA ÇEŞİDİ	2016 YILI ÜRETİM MİKTARI (TON)
1	Starking	1.140.060
2	Golden	750.650
3	Amasya	232.120
4	Granny Smith	134.448
5	Diğer	668.550

2.2. Elmanın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

İnsan sağlığı için meyve ve sebze tüketiminin önemi son yıllarda oldukça popüler bir konu haline gelmiştir. Dünyanın her yerinde üretilen ve herkesin ulaşabileceği bir meyve olan elma ise insan sağlığıyla ilgili yapılan pek çok çalışmanın konusu olmuştur. Elmanın %80’den fazlası sudan oluşmaktadır. Bunun dışında içerisinde karbonhidratlar, proteinler, yağlı maddeler,

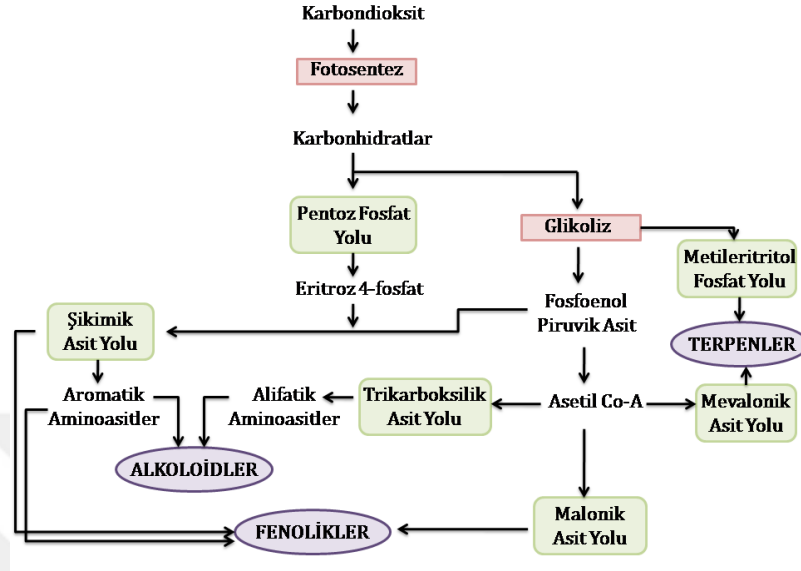
vitaminler, malik asit, pektinler ve mineral maddeler yer almaktadır (TZOB, 2003). Elmanın içerisinde bulunan mineral maddelerden olan tuzların, vücutta yıkımıyla geride kalan bazı bileşenlerin asit-baz dengesini sağladığı bilinmektedir (TZOB, 2003). Yapılan çalışmalar düzenli tüketilen elmanın baş ağrılarının ve sinir hastalıklarının kontrolünde yardımcı olduğunu göstermiştir (Collett, 2011). Bununla birlikte içinde bulundurdukları flavonoidler sayesinde kalp hastalıkları, kanser gibi pek çok önemli hastalığa karşı savaşta kullanılmaktadır (Ross vd., 2002).

Flavonoidler bitki âleminde oldukça yaygın bulunan renk pigmentleridir ve antioksidan etkiye sahiptirler (Liu vd., 2015). Bitkilerde cezbedici renklerin oluşmasında rol oynayan flavonoidler ayrıca antioksidan özellikleri sayesinde hücrelerde strese bağlı oluşan hastalıkların engellenmesinde de rol oynamaktadırlar (Akbaşlı, 2013). Elma ise flavonoidlerin bir alt grubu olan antosiyaninlerce zengin bir meyve olarak düzenli tüketiminde insan sağlığı açısından oldukça faydalıdır. Bu ve bunun gibi nedenlerden dolayı elma dünyada oldukça yaygın olarak tüketilen bir meyve türüdür.

2.3. Bitkilerde Bulunan Renk Maddeleri

Bitkilerde farklı renklerin oluşmasında ana bileşenler fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitkilerde sekonder metabolizma ürünü olup, çok az miktarda üretilen maddelerdir. Sekonder metabolitler, bitki âleminde sınırlı sayıda bulunmaktadır ve başlıca üç ana gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; terpenler, fenolik bileşikler ve alkaloidlerdir (Kabera vd., 2014). Sekonder metabolitler, bitkilerde büyüme, gelişme gibi temel yaşamsal olayların dışında üretilen, genelde bitkilerde çevresel şartlara uyum sağlama, tozlaşma, avcılara karşı savunma gibi görevlerin yerine getirilmesinde rol oynayan bileşiklerdir (Oskay ve Oskay, 2009). Bunların yanı sıra stres koşullarına karşı savunma amaçlı olarak da üretilmektedirler. Ayrıca bazı sekonder metabolitler yapısal destek sağlama (lignin) ya da pigment görevi görmek (antosiyanin) gibi önemli fonksiyonlara da sahiptirler. Sekonder metabolitler bitkilerde özelleşmiş hücrelerde, belirli gelişimsel dönemlerde sentezlenmektedirler. Bu nedenle

sekonder metabolitlerin bitkilerden saflaştırılması oldukça zorlu bir süreçtir (Irchhaiya vd., 2014). Bu metabolitlerin biyosentezi ile ilgili yollar Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Sekonder metabolitlerin biyosentezi (Großkinsky vd., (2012)'nden modifiye edilmiştir.)

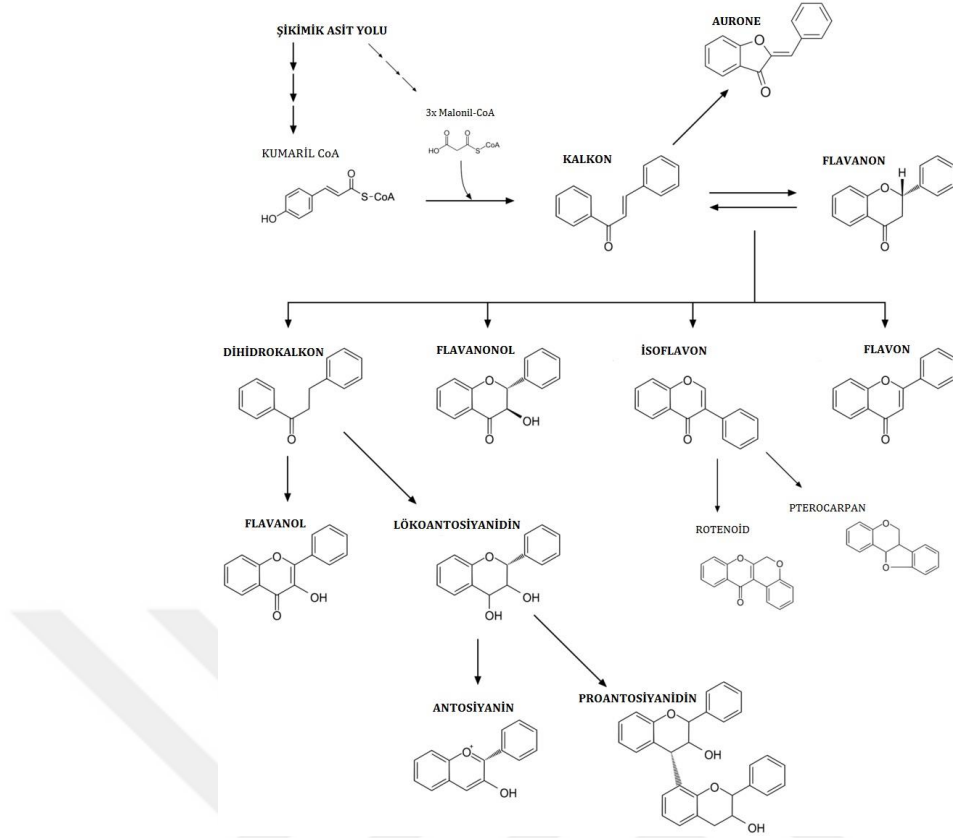
Terpenoidler, sekonder metabolitlerin en büyük ve en çok çeşide sahip olan grubudur. Yapıları linear yapıdan polisiklik moleküllere ve büyüklükleri 5 C'lu hemiterpenlerden binlerce isopren ünitesi içeren bileşenlere kadar genişleyebilmektedir. Bütün terpenler 5 karbonlu isopren ünitelerinin kondansasyonundan üretilmektedir (Mahmoud ve Croteau, 2002). Giberellin, brassinosteroid gibi bazı büyüme hormonları; mentol, limon yağı gibi tat ve kokuyla ilgili olan esansiyel yağlar ve renklenmede etkili olan karotenoidler terpenlere örnek olarak verilebilir (Taiz vd., 2015).

Sekonder metabolitlerin diğer bir sınıfı olan alkaloidler, damarlı bitki türlerinin neredeyse %20'sinde bulunmaktadır. Genellikle lizin, tirozin, triptofan gibi aminoasitlerden sentezlenmektedirler. Daha çok omurgalı hayvanlar üzerindeki farmasötik etkilerinden dolayı bilinmektedirler. Yüzyıllarca bitkilerdeki rolleri nitrojen artıkları ya da nitrojen depoları olarak bilinmekteydi ancak bu fonksiyonları destekleyen çok az kanıt mevcuttu. Şimdilerse ise çoğu alkaloidin herbivorlara (özellikle memelilere) karşı savunmada rol aldığı

düşünülmektedir. Bunun nedeni olarak da toksik özelliklere sahip olmaları gösterilmektedir (Taiz vd., 2015).

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin bir diğer grubunu oluşturan fenolik bileşikler ise, yapılarında bir veya birden fazla sayıda hidroksil grubu taşıyan aromatik bir halkadan oluşmaktadırlar (Balasundram vd., 2006). Bu bileşenler, büyük bir biyoaktif kimyasal grup olduğu için farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Fenolik bileşiklerin otçullara karşı savunma özellikleri, tozlayıcıları çekme, renklenme, UV ışığına karşı koruma gibi özelliklerinin yanında antioksidan özellikleri bulunmaktadır. Fenolik bileşenlerin sahip olduğu bu özellikler bitki büyüme ve gelişmesinde, herbivor ve patojenlere karşı savunmada etkili olduğu gibi, meyve ve sebzelerin karakteristik renklerinin oluşmasında da etkilidirler (Ignat vd., 2009). Fenolik bileşikler; bir fenol halkalı molekülünden polifenol yapıya sahip moleküllere kadar çeşitlilik göstermektedirler. İçerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaya bağlı yapısal elementlere göre birkaç sınıfa ayrılmaktadırlar. Bu sınıflar; flavonoidler, fenolik asitler, taninler, stilbenler ve lignanlar olarak sıralanabilir (D'Archivio vd., 2007).

Flavonoidler, bitki aleminde yosunlardan kapalı tohumlu bitkilere kadar geniş bir yelpazede bulunan düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir (Koes vd., 1994). Flavonoidlerin hepsi aynı temel iskelet yapısını paylaşmaktadırlar. Bu iskelet yapıyı A, B ve C halkaları oluşturmaktadır. A ve B halkaları 6 karbon içeren aromatik halkalardır. Merkez halka olan C halkası ise A ve B halkasına heterosiklik bir bağla bağlanmıştır. C halkasının temel yapıya bağlanması sırasında oluşan modifikasyonlarına göre flavononlar, isoflavononlar, flavonlar, flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler olarak farklı gruplara ayrılmaktadırlar (Şekil 2.2) (Schijlen vd., 2004).



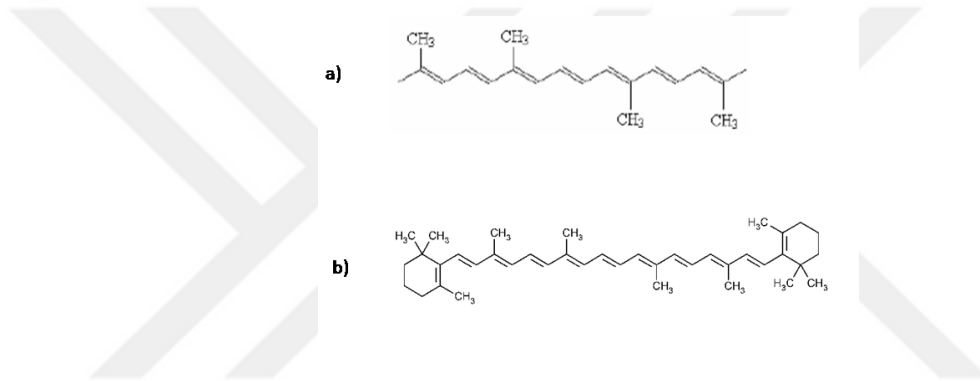
Şekil 2.2. Flavonoidlerin sınıflandırılması (Mierziak vd., 2014)

Farklı flavonoidlerin farklı görevleri bulunmaktadır. Bu görevler arasında UV'ye ve patojenlere karşı koruma, nodülasyon sırasında sinyalleme ve oksin transferi bulunmaktadır (Koes vd., 2005). Bu görevlerinin yanında flavonoidler çiçeklere, meyvelere ve tohumlara renklerini veren pigmentler arasında yer almaktadırlar (Koes vd., 2005).

Temelde bitkilerde renk oluşumunun; flavonoidlerin bir alt sınıfı olan antosiyaninler, terpenlerin bir alt sınıfı olan karotenoidler ve klorofiller tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Antosiyaninler bitkilerde pembeden koyu mora kadar farklı renklerin kaynağını oluştururlar. Bunun yanında karotenoidler, bitkilerde açık sarı-kırmızı renk oluşumunda; klorofiller, yeşil renk oluşumunda etkilidirler.

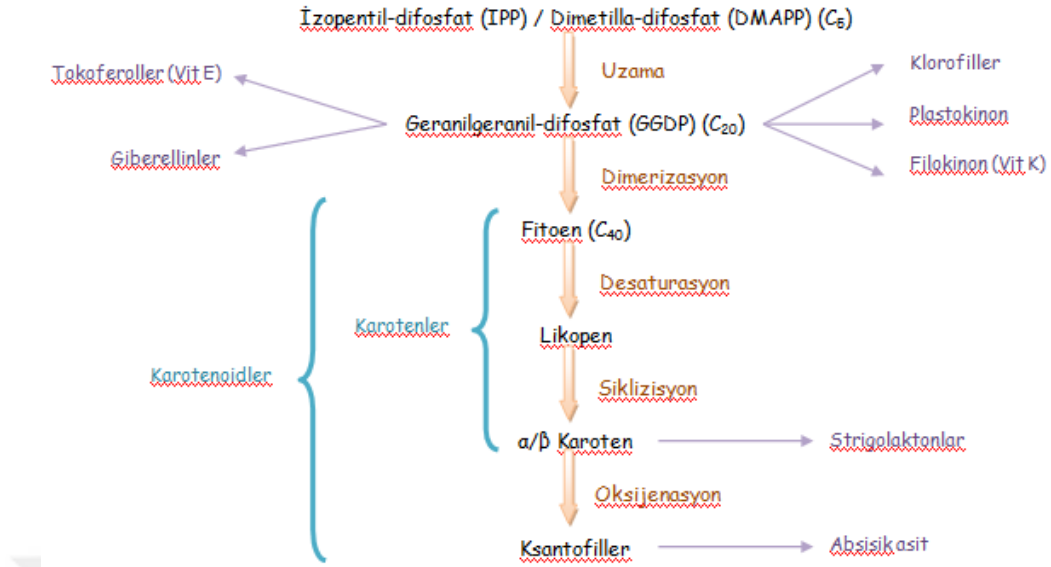
2.3.1. Karotenoidler

Karotenoidler, ilk olarak Weckenroder tarafından 1831'de havuçlardan elde edilmiştir (Baysal ve Ersus, 1999). Yalnızca bitkilerde sarıdan kırmızıya kadar olan renklerin oluşmasında etkilidirler. Genel olarak yağda çözünebilen karotenoidler, birbiri ardına dizilmiş izoprenoid birimlerinden oluşmaktadırlar (Yuan vd., 2015). Bu izoprenoid yapıyla birlikte, yapısında karbon bulunduranlarına karoten, oksijen bulunduranlarına ksantofil denilmektedir (Jaswir vd., 2011). Şekil 2.3'te izoprenoid yapıyla birlikte karoten ve ksantofillerin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Karotenoidlerin kimyasal yapıları (a) Karotenoidlerin izopren yapısı (b) Yapısında karbon içeren karoten (β -karoten) (c) Yapısında oksijen içeren ksantofil (lutein)

Genel olarak karotenler ve ksantofiller olmak üzere iki ana gruba ayrılan karotenoidler plastitlerde küçük bir molekül olan izopentildifosfat (IPP)'tan oluşmaktadırlar (Şekil 2.4). Daha sonra uzama reaksiyonları geçiren IPP ve onun izomeri dimetilla-difosfat (DMAPP), büyük bir molekül olan geranilgeranil-difosfatı (GGDP) oluşturmaktadır. GGDP birden fazla biyosentetik yolağın başlangıç molekülüdür. Bu basamaktan sonra pek çok reaksiyon gerçekleşir ve bu reaksiyonların sonucunda ilk renksiz karoten olan fitoen oluşmaktadır. Daha sonraki basamaklarda gerçekleşen reaksiyonlarla birlikte karotenoidler meydana gelmektedir (Rodrı'guez-Concepcio'n, 2010) (Şekil 2.4).

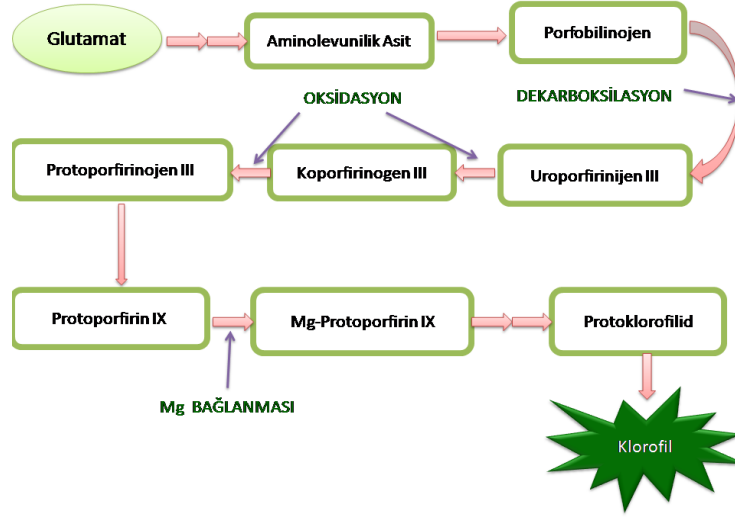


Şekil 2.4. Karotenoid biyosentez yolu (Golden Rice Project, 2005)

2.3.2. Klorofiller

Bitkilerde, fotosentez olayının meydana geldiği yeşil renge sahip pigment olarak bilinen ve fotosentetik porfirin pigmenti sınıflarını kapsayan bileşikler olarak tanımlanan klorofillerin biyosentezi, tetrapirrol mekanizmasının bir parçasıdır. Tetrapiroller, belirgin yapısal ve fonksiyonel özellikleri olan makromoleküllerdir. Tetrapirollerin yaygın karakteristik özellikleri doymamış methin grubuna bağlı dört adet pirol halkası bulundurmalarıdır. Farklı kimyasalların ve metal iyonların bu yapıya bağlanmasıyla; tetrapiroller görünür ışığı absorbe etme ya da farklı redoks reaksiyonlarına girme gibi özelliklere sahip olmuşlardır (Wang ve Grimm, 2015). Geçmiş çalışmalarda tetrapiroller “hayatın pigmentleri” olarak da tanımlanmıştır. Bu da bir tetrapirrol olan klorofillerin tanımlanmasıdır (Battersby vd., 1980).

Klorofil biyosentezi, tüm tetrapirollerin öncü molekülü olan aminolevunilik asidin (ALA) oluşumuyla başlamaktadır. Daha sonra dekarboksilasyon ve oksidasyon gibi kimyasal reaksiyonlarla ara ürünler meydana gelirken; Mg^{+2} iyonunun protoforfirine bağlanması gerçekleşir ve bu basamaktan sonra uzun hidrokarbon yapının esterifikasyonu ile klorofil a; klorofil a'nın oksitlenmesiyle de klorofil b sentezlenmektedir (Brzezowski vd., 2015).



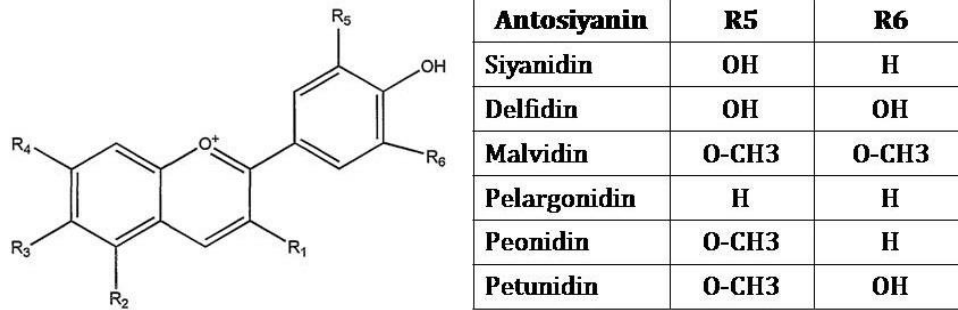
Şekil 2.5. Klorofil biyosentez yolu (Ortega-Rodés vd. (2014)'ten modifiye edilerek alınmıştır.)

Yeşil yaprakların ve bazı meyvelerin yeşil rengini veren klorofil pigmentleri, klorofil a (mavi-yeşil) ve klorofil b (sarı-yeşil)'den oluşmaktadır. Klorofillerin renk tonlarındaki farklılıklar klorofil a ve b'nin yapılarındaki magnezyumun hidrojen atomu veya diğer metal iyonlarıyla yer değiştirmesiyle oluşmaktadır. Örneğin klorofil a ve b'de bulunan magnezyumun, hidrojen atomu ile yer değiştirmesiyle klorofil, feofitin a ve b'ye dönüşür ve bunun sonucunda klorofiller parlak yeşil renk yerine mat zeytin yeşil rengine sahip olurlar. Diğer bir durumda ise magnezyumun yerine demir gibi diğer metal iyonlarının geçmesi rengin yeşilden grimsi kahverengine dönüşmesine neden olur (Ata, 2013).

2.3.3. Antosiyaninler

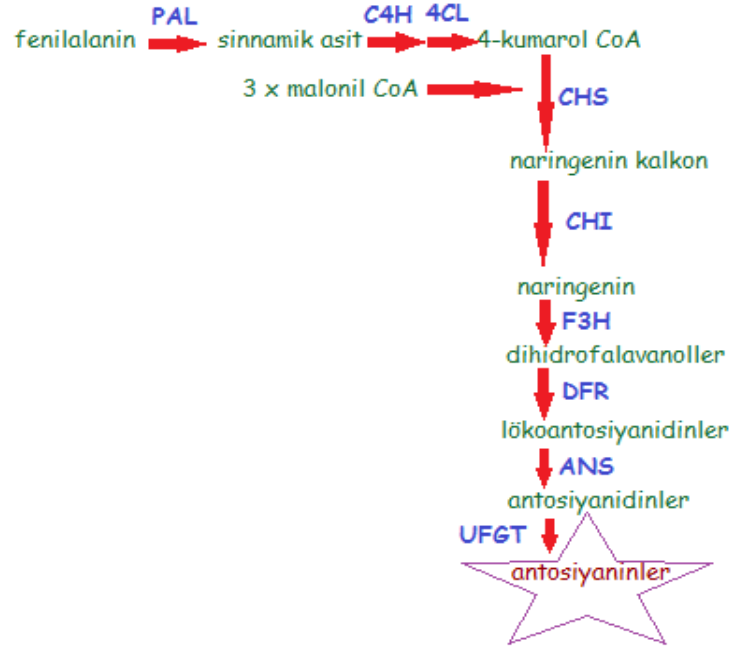
Antosiyaninler, Yunanca çiçek ve mavi kelimelerinden türemiştir ve ilk olarak 1835'te Marquant tarafından tanımlanmıştır (Hepsağ vd., 2012). Bitkilerin meyve, yaprak, kök gibi pek çok organında bulunabilen antosiyaninler mavi, kırmızı ve mor renklerinin oluşumunda etkilidirler. Suda çözünebilen doğal pigmentler olan antosiyaninler yapılarında bir veya birden fazla şeker içeren antosiyanidinlerden oluşmaktadırlar (Jaakola, 2013). Antosiyaninler; hidroksil grubu eklenmesi ya da ayrılması, hidroksil metilasyonunun derecesi ve şeker

moleküllerinin pozisyon ve sayılarındaki farklılıklara göre; siyanidin (Cy), delfinidin (Dp), pelargonidin (Pg), peonidin (Pn), petunidin (Pt), malvidin (Mv) olmak üzere altı gruba ayrılmaktadırlar (Aza-González vd., 2012) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Antosiyanin genel yapısı ve antosiyanin grupları (Aza-González vd., 2012)

Fenilpropanoid yoluyla üretilen antosiyaninlerin, biyosentez basamakları çok iyi bilinmektedir. Antosiyanin biyosentezinde fenilalanin amonyum liyaz (PAL), kalkon sentaz (CHS), antosiyanidin sentaz (ANS) gibi çeşitli yapısal genler bulunmaktadır. Fenilalanin bu sentezin öncülüdür ve fenilalaninden antosiyaninlere dönüşme, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır. İlk olarak fenilalanin, PAL aracılığıyla amonyumunu kaybederek sinamik aside dönüşür. Sonra sinamik asit sinamat 4-hidroksilaz (C4H) ve 4-kumarat-CoA ligaz (4CL) aracılığıyla 4-kumarol-CoA'ya çevrilir. Daha sonra bir molekül 4-kumarol-CoA ile üç molekül malonil CoA birleşerek CHS enzimi yardımıyla naringenin kalkonu oluştururlar. Bunun ardından naringenin kalkon, kalkon izomeraz (CHI) tarafından hızlı bir şekilde naringenini meydana getirir. Bu reaksiyonlardan sonra naringenin flavanon 3-hidroksilaz (F3H) enzimi tarafından hidroksillenerek dihidroflavonollere; dihidroflavonollerse, dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR) enzim tarafından lökoantosiyanidinlere çevrilir. ANS enzimi ise lökoantosiyanidinleri bir substrat gibi kullanarak antosiyanidinleri sentezler. Son basamakta ise antosiyanidinler UDP tarafından aktive olan şeker vericileriyle UDPG-flavonoid-3-O-glukoziltransferaz (UFGT) enzimiyle glikozillenip aktif hale gelerek antosiyaninleri oluştururlar (Xie vd., 2011) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Antosiyanın biyosentez yolu (PAL; fenilalanin amonyum liyaz, C4H; asit sinnamat 4-hidroksilaz, 4CL; kumarat-CoA ligaz, CHS; kalkon sentaz, CHI; kalkon izomeraz, F3H; flavanon 3 hidroksilaz, DFR; dihidroflavonol 4-redüktaz, ANS; antosiyanidin sentaz, UFGT; UDPG-flavonoid-3-O-glukoziltransferaz)

Pek çok farklı bitki türünde antosiyanın biyosenteziyle ilgili çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalar bitkilerde antosiyanın konsantrasyonunu etkileyen faktörler üzerine yapılan araştırmalarla başlamış ve yapılan birçok farklı araştırmanın sonucunda bitkilerde antosiyanın biyosentezinin genetik olarak nasıl düzenlendiği belirlenmiştir. Pirie ve Mullins (1976), asmada sukroz, nitrat ve absisik asit gibi hormonların antosiyanın biyosentezini nasıl etkilediği üzerine bir araştırma yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada aynı ortamda yetiştirilen bitkilere; ayrı ayrı olarak sukroz, nitrat ve absisik asit uygulanarak antosiyanın konsantrasyonları arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Bu araştırmanın sonucunda sukroz ve absisik asidin yapraklarda antosiyanın birikimini arttırdığı ancak nitratın antosiyanın birikimini azalttığı belirlenmiştir. Rail ve Hemleben (1984) ise şebboy (*Matthiola incana* R.) bitkisinde antosiyanın biyosentez genlerinden CHS enziminin aktivitesinin çiçeklerde renklenmeyle birlikte artıp artmadığına incelemişlerdir. Bu çalışmada SDS-PAGE yöntemiyle CHS enziminin miktarının şebboy bitkisinin çiçeklerinde ilk renklenmeyle birlikte artış gösterdiği tespit edilmiştir. Soya fasulyesinde yapılan bir diğer

çalışmada ise metil jasmonat uygulanmış soya fasulyelerinde antosiyanin birikiminin 5-7 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Franceschi ve Grimes, 1991).

Glaßgen vd. (1998) yaptıkları bir çalışmada, karanlıkta bırakılan, sürekli UV ışığa maruz bırakılan ve *Pythium aphanidermatum* inoküle edilmiş havuç hücre kültürlerinde antosiyanin düzeyleri arasındaki farklılıklar incelemiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda sürekli UV ışığa maruz bırakılan hücre kültürlerinde antosiyanin birikiminin oldukça arttığı gözlemlenirken, diğer hücre kültürlerinde antosiyanin birikiminin baskılandığı tespit edilmiştir.

Vitrac vd. (2000) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise asmada sukroz tarafından sinyal taşıyıcı olan kalsiyum kanallarının uyarıldığı ve bu sayede asma hücrelerinde antosiyanin birikiminin arttığı anlaşılmıştır.

Asmada yapılan bir başka çalışmada ise metil jasmonat uygulanmış asma hücre kültürlerinde ve kontrol bitkileri arasında antosiyanin birikimi yönünden farklılıklar incelenmiştir. Çalışmada metil jasmonat uygulanmış hücre kültürlerinde 3. günden sonra antosiyanin birikiminin kontrollere göre daha fazla olduğu saptanmış ve 14. günde yapılan ölçümlerin sonucunda metil jasmonat uygulanmış hücre kültürlerinin %45 oranında antosiyanin içerdiği, kontrollerde bu oranın %32 olduğu belirlenmiştir (Curtin vd., 2003). Bu sonuçlar da bize asmada metil jasmonatın antosiyanin birikimini teşvik ettiğini göstermektedir.

Asmada yapılan bir başka çalışmada ise Qu vd. (2006) metil jasmonat ve fenilalanin eklenmiş VV05 ve VV06 hücre kültürlerinde antosiyanin miktarlarının kontrollere göre sırasıyla 2,5 ve 5,2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada ise Bureau vd. (2009), antosiyanin birikimindeki farklılıkları yoğun kırmızı renge sahip iki farklı kayısı çeşidi (A3576 ve A3751) arasında incelemiştir. Tam çiçeklenmeden 108 ve 118 gün sonra alınan

örnekler incelendiğinde her iki çeşitte de antosiyanin birikiminin maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Olgunlaşma sırasında, ise A3751 çeşidinde hem kabukta hem de meyve etinde antosiyanin birikimi gözlemlenirken, diğer çeşitte sadece kabukta biriktiği gözlemlenmiştir.

Çetin ve Baydar (2014) tarafından; Gamay, Kalecik karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerinde kadmiyum sülfatın, metil jasmonatın, sukrozun ve floresan radyasyonunun kallus hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyaninler de dahil olacak şekilde fenolik bileşiklerin üretimini nasıl etkilediği incelenmiştir. Hücre kültürlerine kadmiyum sülfat 0.1 ve 1.5 mM, metil jasmonat 0 ve 10 µM, sukroz 0, 0.2 ve 1.25 M olacak şekilde uygulanmıştır. Ayrıca hücre kültürleri karanlıkta ya da 10000 lux ışık altında bırakılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda; 1.5 mM kadmiyum sülfat Kalecik karasında en yüksek antosiyanin birikimini sağlarken, 10 µM metil jasmonat tüm çeşitlerde fenolik bileşiklerin birikimini artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca 0.20 M sukroz antosiyanin birikimini en çok Gamay çeşidinde artırırken, floresan radyasyonunun ise antosiyanin birikimini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

Araştırmacılar bitkilerde antosiyanin birikiminin genetik olarak nasıl ve ne şekilde düzenlendiğini ve antosiyanin düzeyleri arasındaki farklılıkların nelerden kaynaklandığını anlamak amacıyla farklı meyvelerde meyve olgunlaşmasının farklı evrelerinde antosiyanin sentezinden sorumlu genlerin ifade (ekspresyon) düzeylerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Jaakola vd. (2002) yaptıkları bir çalışmada; yaban mersinlerinin yabani tipi ve renkli bir mutan arasında, antosiyanin, proantosiyanidin ve flavonollerin sentezinde rol oynayan genlerin (*PAL*, *CHS*, *F3H*, *DFR* ve *ANS*) ifadeleri, meyve gelişiminin farklı dönemlerinde incelemektedir. Ayrıca olgun meyvede antosiyanin, proantosiyanidin ve flavonol bileşenlerinin miktarları sıvı kromatografisi ile analiz edilip, kütle spektrofotometrisiyle belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonunda meyve olgunlaşmasıyla birlikte antosiyanin birikiminde ve flavonoid biyosentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonlarında doğru orantılı bir şekilde artış gözlemlenmiştir.

Portakal meyvelerinde de Cotroneo vd. (2006) buna benzer bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Antosiyanin biyosentezinde rol oynayan *CHS*, *ANS* ve *UFGT* genlerinin ekspresyon seviyeleri ve antosiyanin birikimi üzerine olan etkileri; olgunlaşmanın yedi farklı döneminde, kan portakalı ve Washington portakalı meyvelerinde, real-time PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Kan portakalında *CHS*, *ANS* ve *UFGT* genlerinin ekspresyon seviyelerinin olgunlaşmayla birlikte arttığı, Washington portakalında ise azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ise *CHS*, *ANS* ve *UFGT* genlerinin fonksiyonlarının pigment oluşumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Antosiyaninler bitkilerde stres koşullarıyla karşılaştığında da üretilmektedir (Zhang vd., 2014). 2005 yılında Piero ve arkadaşları tarafından, 4 °C'deki kısmen uzun saklama koşullarında kırmızı portakallardaki antosiyanin üretimini ve antosiyanin üretiminde rol oynayan *PAL*, *CHS*, *DFR* ve *UFGT* yapısal genlerinin ekspresyonlarını araştırmak üzere bir çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar; kırmızı portakallarda meydana gelen antosiyanin birikiminin, düşük sıcaklıkta 75 gün tutulan portakallarda, 25 °C'de tutulan portakallara göre 8 kat fazla olduğunu göstermiştir. Yapılan real-time PCR çalışmalarının sonucunda ise *PAL*, *CHS*, *DFR* ve *UFGT* genlerinin ekspresyonlarının düşük sıcaklıkta tutulan portakallarda kontrol örneklerine göre 40 kat arttığı belirlenmiştir.

Elmada yapılan diğer bir çalışmada ise Ubi vd. (2006) UV-B ışık altında ve düşük sıcaklıklarda 5 antosiyanin biyosentez geninin (*CHS*, *F3H*, *DFR*, *ANS* ve *UFGT*) ekspresyonlarını araştırmışlardır. Bunun için 5 elma çeşidi seçilmiştir. Bu çeşitler: aslında açık kırmızı renkli olan ama çalışmada olgunlaşmadan toplanıp kullanılan ve yeşil renkli kabul edilen 'Iwai', açık kırmızı renkli 'Tsugaru' ve koyu kırmızı renkli üç çeşit: 'Sansa', 'Homei-Tsugaru' ve 'Akane'dir. Öncelikle 'Iwai' dışında tüm çeşitlerde olgunlaşmayla birlikte antosiyanin birikiminin arttığı gözlemlenmiştir ve tam çiçeklenmeden 107 gün sonra da bu artışın hızlandığı saptanmıştır. Ayrıca incelenen bu 4 çeşidin meyve kabuğunda antosiyanin artışıyla birlikte *CHS*, *ANS* ve *UFGT* genlerinin ekspresyonlarında da artışlar gözlemlenmiştir. Aynı elma çeşitlerinde, UV-B ışık altında ve düşük

sıcaklıklarda antosiyanin birikiminde ve antosiyanin biyosentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonlarında da artışlar belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar stres koşullarında antosiyanin birikiminin arttığını ve antosiyanin biyosentezinde rol oynayan genlerin aktif hale geldiklerini göstermiştir.

Feng vd. (2008) kızıl renkli 'Mantianhong' ve kırmızı renkli 'Aoguan' armut çeşitlerinde farklı renk oluşumu evrelerindeki meyveler kullanılarak antosiyanin biyosentezi ve PAL ve CHI enzimleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca güneşlenme süreleri ve renk oluşumu arasındaki bağlantı da saptanmaya çalışılmıştır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda 'Augoun' çeşidinde 'Mantianhong' çeşidine göre antosiyanin seviyesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. PAL aktivitesi ise 'Augoun' çeşidinde 'Mantianhong' çeşidine göre daha az; CHI aktivitesi ise daha fazla olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar PAL aktivitesinin renklenmeyle doğrudan ilişkili olmadığını göstermiştir. Yapılan bu çalışmada aynı zamanda ambalajlamanın CHI enziminin aktivitesine ve antosiyanin sentezine olan etkisini araştırmak üzere renklenmeye başlayan meyveler toplanmıştır. Toplanan meyvelerin bir kısmı ambalajlanmış diğer bir kısmı ise ambalajlanmamıştır. Bu deney sonucunda CHI enziminin aktivitesinin ve antosiyanin sentezinin ambalajlamayla inhibasyona uğradığı görülürken; ambalajlanmamış meyvelerde tam tersi durum gözlemlenmiştir. Aynı zamanda ambalajlanmamış 'Augoan' çeşidinde ambalajlanmışa göre CHI aktivitesi daha yüksek olarak belirlenmiştir. PAL enziminin ise ambalajlamadan etkilenmediği gözlemlenmiştir.

Antosiyaninlerin insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olmasından dolayı geçmişten günümüze kadar antosiyaninler konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar antosiyaninlerin nasıl sentezlendiğiyle başlayıp daha sonra sentezinin nasıl düzenlendiği, hangi düzenleyici faktörlerin antosiyanin sentezinde rol aldığı üzerine yoğunlaşmıştır. Bundan yola çıkarak bir genin ifadesinin düzenlenmesinde ilk basamaklarda yer alan transkripsiyon faktörleri üzerine pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmaların sonucunda büyük bir transkripsiyon faktörü ailesi olan MYB TF'lerinin bitkilerde antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesinde önemli rollerinin olduğu belirlenmiştir.

2.4. Transkripsiyon Faktörleri

Tek hücreli organizmalardan çok hücreli organizmalara geçişte hücreler farklı görevleri yapmak üzere özelleşmiştir. Özelleşmenin ardından hücre farklılaşması; hücrelerin doğru dağılımı, sinyalleme sistemi ve ardından gen ekspresyonlarının düzenlenmesiyle kontrol edilmektedir. Bu düzenleme DNA metilasyonu, kromatin organizasyonu, dimerizasyon ve transkripsiyon faktörleri gibi elementlerin, genlerin promotör bölgelerine dizi spesifik olarak bağlanmalarıyla gerçekleşmektedir (Feller vd., 2011).

Transkripsiyon faktörleri (TF) bütün organizmalarda gen ifadelerinin düzenlenmesinde çok önemli rollere sahiptirler ve büyüme, gelişme, farklılaşma, strese yanıt gibi pek çok biyolojik olayla da yakından ilişkilidirler (Muhhamilarasan vd., 2014). Hücrede pek çok fonksiyona sahip olan TF'leri; DNA bağlanma bölgesi, nüklear lokalizasyon sinyali (NLS), transkripsiyon aktivasyon bölgesi ve oligomerizasyon bölgesi olmak üzere en az dört farklı bölgeden oluşmaktadır ve bu bölgeler aracılığıyla fizyolojik ve biyokimyasal olayların başlamasında ve düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (Du vd., 2009). TF'leri farklı proteinlerle etkileşime girerek bir geni aktive edebilir ya da o genin anlatımını baskılayabilirler (Feller vd., 2011). Yukarıda sayılan önemli rollerinden dolayı organizmaların protein kodlayan genlerinin büyük bir kısmı TF'lerini kodlamaktadır. Örneğin *Arabidopsis thaliana*'da 28000'e yakın genin yaklaşık %6'sı, bir başka deyişle 1700 genden daha fazlası TF'lerini kodlamaktadır (Feller vd., 2011).

İçerdikleri DNA bağlanma bölgelerine göre TF'leri çok farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar arasında bZIP (temel lösin fermuarı), MYC (miyelositomasis), ERF/AP2 (Etilen Cevap Faktörü/APETALA2), çinko parmak ve MYB (miyeloblastosis) örnek olarak verilebilir (Amvawat vd., 2013). Transkripsiyon faktörleri arasında MYB TF'leri oldukça büyük bir öneme sahiptir.

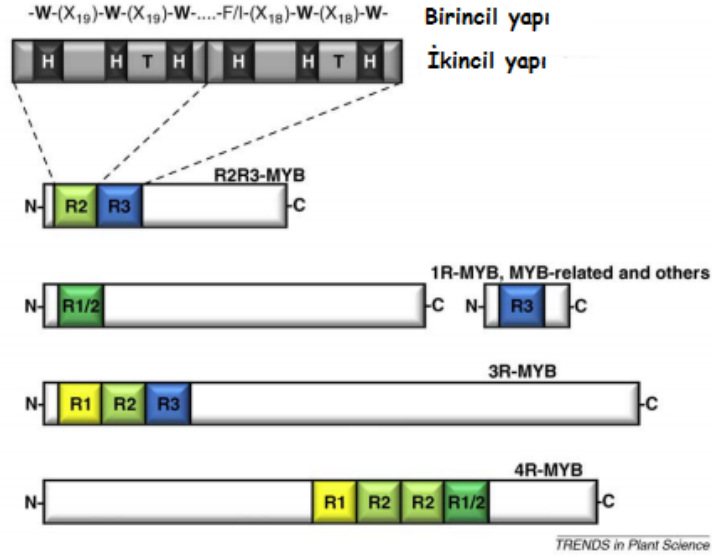
2.5. MYB Transkripsiyon Faktörlerinin Yapı ve Fonksiyonları

İlk MYB geni avian miyelo blastosis virüsünde (AMV) tanımlanmıştır ve *v-MYB* (*MYeloBlastosis*) olarak adlandırılmıştır (Hall vd., 1941). Bu virüste bulunan *v-MYB* genleri tavuklarda miyelomonositik hematopoietik hücrelerinin şekil değiştirmelerinden sorumludur (Foos vd., 1992). Daha sonra hayvanlarda *v-MYB* genine benzer olan *c-MYB* (*hücreyel MYB*) onkogeni, *A-MYB* ve *B-MYB* tanımlanmıştır (Luscher ve Eisenman, 1990). Ökaryotik hücrelerde gözlemlenen *c-MYB* geni; siklin aktivitesini doğrudan etkilemekte, hücrelerde çoğalma ve farklılaşmayı etkileyerek kansere sebep olmaktadır (Nakata vd., 2007). İnsanda ise *B-MYB* ve *A-MYB* genleri bulunmaktadır. *B-MYB* geni *c-MYB*'ye oldukça benzer özelliklere sahip olup hücre çoğalmasında ve apoptosiste önemlidir. Bu genlerde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon kansere neden olmaktadır (Foos vd., 1992). Bunun yanında *A-MYB* hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu genin hücre çoğalmasında etkili olmadığı düşünülmektedir (Golay vd., 1996).

Bitkilerde ilk olarak bulunan MYB geni mısır'dan (*Zea mays*) elde edilen *C1* (*COLORED1*) genidir ve bu genin antosiyanin biyosenteziyle ilişkili bir TF'nü kodladığı bulunmuştur (Paz-Ares vd., 1987). Bu çalışmanın ardından arpada (Marocco vd., 1989), mısırdan (Grotewold vd., 1991), *Antirrhinum*'da (Jackson vd., 1991), *Arabidopsis*'te (Oppenheimer vd., 1991) ve *Petunia*'da (Avila vd., 1993) MYB benzeri genler izole edilmiştir. Yapılan farklı çalışmaların sonucunda bitkilerde transkripsiyonel kontrol düzeyinde MYB TF'lerinin çok büyük rollerinin olduğu belirlenmiştir (Martin ve Paz-Ares, 1997). *Arabidopsis* bitkisinin genom dizisinin yayınlanmasının ardından, bitki MYB genlerinin ilk kapsamlı tanımlaması ve sınıflandırılması yapılmıştır (Stracke vd., 2001). Farklı bitkilere ait genom bilgilerinin tamamlanmasının ardından MYB TF ailesi hakkında da daha fazla bilgiler elde edilmeye başlanmıştır.

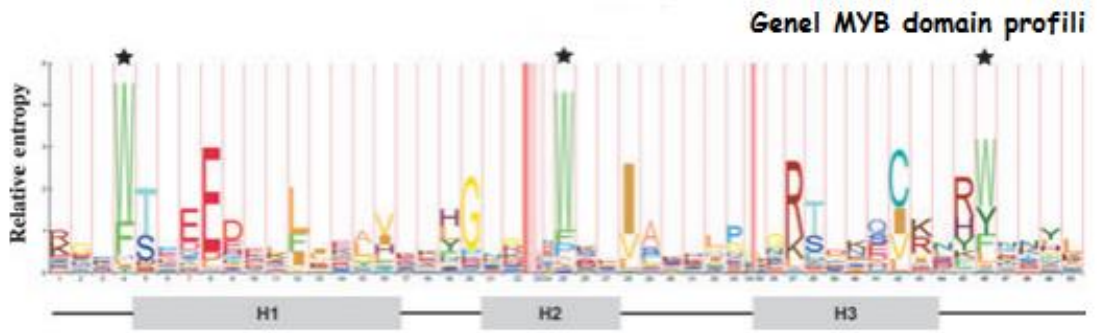
MYB proteinleri MYB domaini adı verilen çok iyi korunmuş DNA bağlanma bölgelerine sahiptir ve her MYB proteini yapılarında bu MYB domainlerinden bir,

iki, üç ya da dört tekrar bulundurmaktadır. MYB TF'leri içerdikleri bu tekrarlı dizilere göre farklı sınıflara ayrılmaktadır (Şekil 2.8).



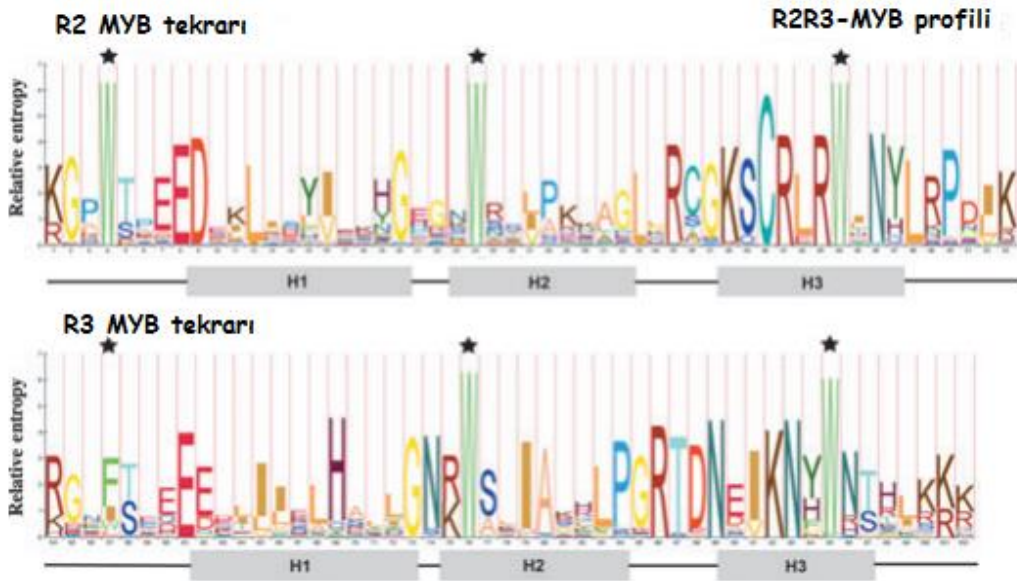
Şekil 2.8. MYB transkripsiyon faktörlerinin içerdikleri domainlere göre sınıfları (R, tekrar; H, heliks; T, turn; W, triptofan; X, amino asit)(Dubos vd., 2010)

MYB TF'lerinin içerdikleri domainler yaklaşık 52 amino asidin dörtten fazla tekrarını içermektedir ve her domain üç α -heliks yapısından oluşmaktadır (Kanei-Ishii vd., 1990). Her tekrarın heliks yapıları triptofan içermekte olup, hidrofobik bir bölge oluşturan heliks-turn-heliks (HTH) yapısını oluşturmaktadır (Ogata vd., 1996). Tanıma heliksi adı verilen üçüncü heliks DNA ile direk olarak etkileşime girmekte ve büyük oluğa bağlanmaktadır (Jia vd., 2004). DNA ile etkileşim sırasında, iki MYB tekrarı büyük oluğa sıkıca bağlanmakta, bundan dolayı iki tanıma heliksi spesifik DNA dizi motifine ortaklaşa bağlanmaktadır (Dubos vd., 2010).



Şekil 2.9. MYB domainlerinin genel yapısı. (Yıldızlar triptofanlı bölgeleri temsil etmektedir. H1, H2 ve H3 heliks yapılarını göstermektedir.) (Feller vd., 2011)

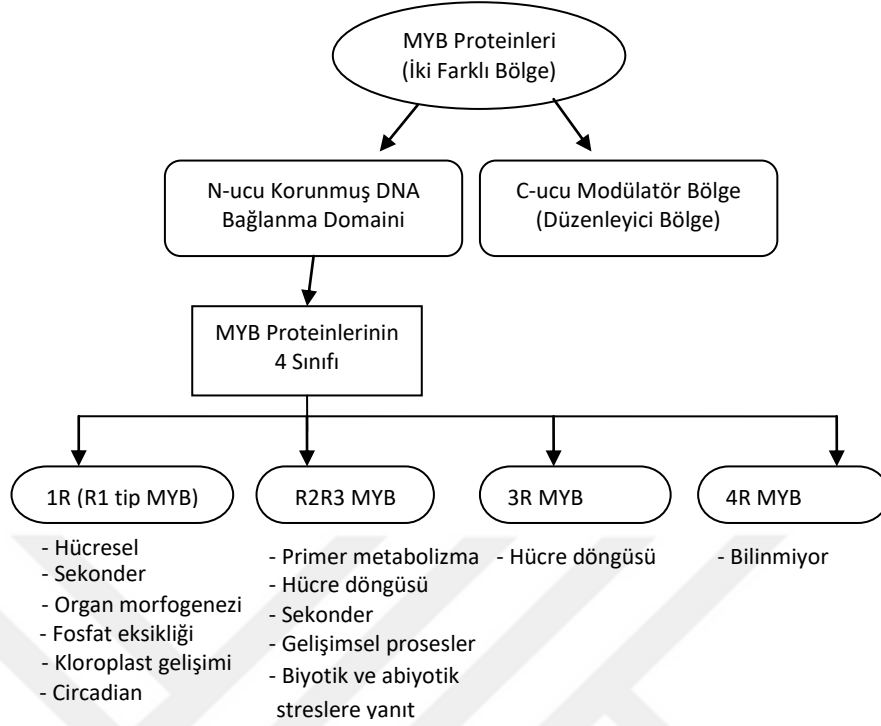
Yapılarındaki farklı tekrarlı domain yapılarına göre MYB proteinlerinin sınıflandırılması şekil 2.10'da gösterilmektedir.



Şekil 2.10. MYB TF'lerin tekrar sayılarına göre genel yapısı (Yıldızlar triptofanlı bölgeleri temsil etmektedir. H1, H2 ve H3 heliks yapılarını göstermektedir) (Feller vd., 2011)

MYB domainlerindeki farklı tekrar sayılarını içeren MYB proteinlerinin farklı yapı ve fonksiyonları çizelge 2.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 2.5. Farklı MYB protein sınıflarının fonksiyonları (Ambawat vd., 2013)



Dört tekrar içeren bir sınıf olan 4R-MYB'ler; MYB proteinlerinin en küçük sınıfını oluşturmaktadır. Bazı bitki genomlarında bir tane 4R-MYB proteininin kodlandığı bilinmektedir. Bunun dışında bu proteinlerle ilgili çok az bilgi mevcuttur (Dubos vd., 2010).

Diğer bir sınıf olan ve üç tekrardan oluşan (R1, R2, R3) MYB3R proteinleri, MYB'lerin küçük bir sınıfını oluşturmaktadır (Stracke vd., 2001). Bu sınıftaki proteinlerin hepsi aynı R1 tekrarını ve DNA'ya bağlanma spesifitesi için önemli olan R2 tekrarını paylaşmaktadır (William ve Grotewold, 1997).

Yapısal olarak farklılıklar içeren proteinlerden oluşan diğer bir alt grup olan tek tekrarlı MYB protein sınıfı, bu yapısal farklılıklardan dolayı farklı alt gruplara ayrılmıştır. Bu proteinlerden ilki R3 benzeri domain içeren proteinler olarak tanımlanmıştır. (Wester vd., 2009). Bu tek tekrarlı R3 MYB'ler *Arabidopsis*'te köklerde emici tüylerin farklılaşması ve tüy oluşumunun düzenlenmesi gibi önemli rollere sahiptir (Zhu vd., 2009). Bunun yanında yine *Arabidopsis*'te MYB-LIKE2 (MYBL2) adı verilen bir proteinin flavonoid biyosentezinde düzenleyici rolü olduğu rapor edilmiştir (Matsui vd., 2008). Tek tekrarlı MYB'lerin ikinci alt

grubu evrimsel açıdan oldukça eskilere dayanan R1 ya da R2 tekrarını içermektedir (Romero vd., 1998). Bu gruba örnek olarak sirkadiyan saat kontrolünde görevli CCA1 ve LHY proteinleri verilebilmektedir (Lu vd., 2009). Üçüncü alt grup GARP olarak adlandırılmaktadır. Bu ad mısırdaki G2, *Arabidopsis*'teki ARPs, *Chlamydomonas reinhardtii*'teki PSR1 ve *Arabidopsis*'teki PHR1 proteinlerinden esinlenerek verilmiştir (Hosoda vd., 2002). Çizelge 2.6'da *Arabidopsis*'te bulunan farklı MYB alt gruplarının görevleri ve diğer bitki türlerinde benzer görevlere sahip olan genler gösterilmektedir. Bu çizelge geçmişte yapılmış olan çalışmaların bir özeti olarak oluşturulmuştur.

Çizelge 2.6. Bitkilerdeki bazı MYB TF'lerinin görevleri (Feller vd., 2011)

FİLOGENETİK GRUP	<i>Arabidopsis thaliana</i> 'daki Görevleri ve <i>Arabidopsis thaliana</i> 'da Bulunan Gen İsimleri	Diğer Türlerde Bulunan Benzer Genler ve Görevleri
Alt grup 4	- Transkripsiyonel represör, Proantosiyanın sentezinin engelleyicisi, <i>MYB3</i> , <i>MYB4</i> , <i>MYB7</i> , <i>MYB32</i> - UV-bağımlı sinapat ester biyosentezi, <i>MYB4</i> - Polen-duvarı içeriğinin belirlenmesi, <i>MYB32</i>	Antosiyanın Biyosentezi/Flavonol Biyosentezi : <i>FaMYB1</i> , Lignin Biyosentezi : <i>AmMYB308</i> , <i>AmMYB330</i> , <i>EgMYB1</i> , <i>ZmMYB31</i> , <i>ZmMYB42</i>
Alt grup 5	- Tohum kabuğundaki proantosiyanın biyosentezi /tanin biyosentezi: <i>MYBTT2</i>	Proantosiyanın Biyosentezi: <i>LjTT2a, b, c</i> , <i>PtMYB134</i> Antosiyanın Biyosentezi: <i>GMYB10</i> , <i>MdMYB1</i> , <i>MdMYB9/TT2</i> , <i>MdMYB10</i> , <i>MdMYB11</i> , <i>PhMYBAN4</i> , <i>PmMBF1</i> , <i>VvMYB1a</i> , <i>ZmC1 (COLORLESS1)</i> , <i>ZmP11</i>
Alt grup 6	- Antosiyanın biyosentezi (vejetatif dokularda): <i>PAP1</i> , <i>PAP2</i> - İkincil hücre-duvar formasyonu: <i>PAP1</i> - Diğerleri: <i>MYB113</i> , <i>MYB114</i>	<i>AmROSEA1</i> , <i>CaA</i> , <i>GmMYB19</i> , <i>GtMYB3</i> , <i>IbMYB1</i> , <i>InMYB1, 2, 3</i> , <i>PhMYBAN2</i> , <i>SIANT1</i>
Alt grup 7	Tüm dokularda flavonol biyosentezi: <i>PFG2</i> , <i>PFG1</i> , <i>PFG3</i>	<i>VvMYBF1</i> Phlobaphenes, 3-deoxy-flavonoid biyosentezi: <i>SbY1</i> , <i>ZmP1/P2</i>
Alt grup 9	- Taç yaprakların hücrelerinin şekli: <i>MIXTA</i> - Erken çiçeklenme, çimlenme: <i>MYB17</i> - Trichome gelişiminin negatif kontrolü: <i>NOK</i>	<i>AmMIXTA</i> , <i>AmMYBML1</i> <i>GhMYB25</i>
Alt grup 15	- Epidermal hücre tipi belirleme - Sürgünde trichome başlatma: <i>GL1</i> , <i>MYB23</i> - Saçak kök oluşumu, stomata biçimlenmesi: <i>WER</i> , <i>WER</i> tarafından <i>MYB23</i> 'ün pozitif regülasyonu ve pozitif feedback loop Tüy eklenmesi ve dallanma: <i>MYB5</i> ile <i>MYB23</i>	<i>GhMYB1</i> , <i>GaMYB2</i>
Alt grup 16	Hipokotil uzaması (kırmızı ışıktan uzakta): <i>LAF1</i> Diğerleri: <i>MYB19</i> , <i>MYB45</i>	

Çizelge 2.6. Bitkilerdeki bazı MYB TF'lerinin görevleri (Feller vd., 2011)(Devam)

Bilinmeyenler/ tipik olmayanlar	-Tohum kabuğunun farklılaşması, proantosiyanın biyosentezi /tannin biyosentezi: <i>MYB5</i> - Trichome dallaması: <i>MYB23</i> ile <i>MYB5</i> , Stomata hücre ayrılması, terminal farklılaşma, hücre döngüsü: <i>FLP</i> ve <i>MYB88</i> <i>MYB20, MYB42, MYB83</i>	-Vakuoler asidifikasyon aktivatörü, antosiyanın biyosentezi: <i>PhPH4</i> - Hücre duvarı farklılaşması, lignin biyosentezi: <i>PtMYB1</i> - İkincil duvar farklılaşması, lignin biyosentezi: <i>EgMYB2</i>
CPC-benzeri (R2R3 orjinli)	-Sürgün morfogenezi ve yaprak oluşumu: <i>AS1</i> -Trichomelar/saçak kökler: <i>TRY, CPC,</i> <i>ETC1, ETC2, ETC3, TCL1, MYBL2</i> -Antosiyanın biyosentezinin negatif regülasyonu: <i>CPC</i> -Flavonoid biyosentezinin negatif regülasyonu: <i>MYBL2</i>	Yapraklarda dorsi-ventral kutuplaşma: <i>ZmRS2</i>
CCA-1 benzeri (R1/R2 orjinli)	Circadian saat: <i>CCA1, LHY</i>	<i>PpCCA1a,b</i>
GARP benzeri	Fosfat eksikliği yanıtı: <i>PHR1</i>	
RAD benzeri	<i>RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6</i>	- Asimetrik taç yaprak gelişimi: <i>AmRAD,</i> <i>VmRAD, GoRAD;</i> - Erken meyve gelişimi: <i>SIFSM</i>
Telomer- binding	<i>RTBP1</i>	<i>ZmIBP</i>
MYB3R	Hücre döngüsü, G2/M faz geçidi: <i>MYB3R1,</i> <i>MYB3R2,</i> <i>MYB3R3, MYB3R4, MYB3R5</i>	<i>NtMYBA1, A2, OsMYB3R-2</i>
Nadir görülenler	-Hücre döngüsü, pre-mRNA splicing ve siklinlerin transkripsiyonel düzenlenmesi: <i>CDC5</i> Bilinmeyen: <i>MYB4R</i> Hücre büyümesi ve bölünmesi, DNAJ domain: <i>MIDA1</i>	Yüksek bitkilerde asimetrik hücre bölünmesi: GlsA

MYB proteinlerinin en büyük sınıfını oluşturan iki tekrarlı MYB'ler (R2R3 MYB'ler); bitkilerde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. R2R3-MYB ailesi yüzlerce üyeden oluşmaktadır. Çoğu bitkide tamamen korunmuş olan bu üyelerin C uçları farklılıklar gösterebilmektedir. Bu bölge genellikle transkripsiyonel aktivasyon (TAD) ya da represyon domainlerini içermekte olup post-transkripsiyonel modifikasyonlardan sorumlu olan serin ve treonince zengin bir bölgeden oluşmaktadır (Martin ve Paz-Ares, 1997).

Farklı bitki çeşitlerinde R2R3 MYB TF'lerinin farklı fonksiyonları yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. MYB TF'lerinin hücre şekillerinin kontrolünde görev aldığı *Antirrhinum*'daki *MIXTA* geni ile ve *MIXTA* geninin benzeri olan; petunyada petal epidermal hücrelerinin konik formalarının gelişiminde görev alan *PhMYB1* geni ile kanıtlanmıştır (Noda vd., 1994). *Arabidopsis*'te bulunan MYB proteini WEREWOLF, epidermal hücrelerinin düzenlenmesinde görev

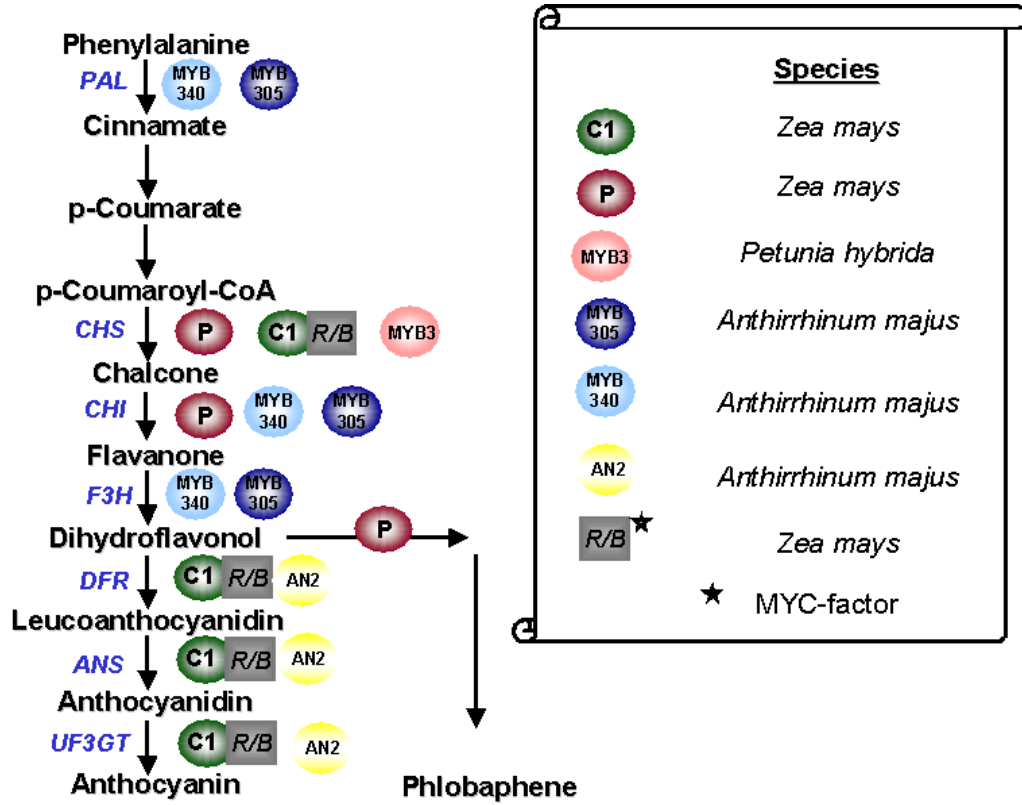
almaktadır (Lee ve Schiefelbein, 1999). Churin vd. (2003) yaptıkları çalışmada buğday MYB TF'lerinden olan *HvMCB1* ve *HvMCB2* genlerinin kloroplast gelişiminde ve çevresel faktörlere yanıtta etkili olduğu gösterilmiştir. *Arabidopsis*'te ayrıca anter ve polen gelişimini teşvik eden *AtMYB33* ve *AtMYB65* (Millar ve Gubler, 2005), petal epidermal hücre şekillenmesinde *AtMYB16* (Baumann vd., 2007), embriyogenesiste *AtMYB115* ve *AtMYB118/PGA37* (Wang vd., 2008), erkek gamet hücrelerinin bölünme ve farklılaşmasında *AtMYB125/DUO1* (Brownfield vd., 2009) ve yan dalların oluşmasında ve sap ile dalın birleştiği yerdeki meristem doku biçimlenmesinde *AtMYB105/LOF1*, *AtMYB117/LOF2* ve *AtMYB37* (Lee vd., 2009) genleri bulunmuştur. Ayrıca çeltikte Dai vd. (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada, *OsMYB2P-1* geninin kök sistemlerinin yapısının düzenlenmesiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Stres koşullarına karşı savunmada rol alan R2R3-MYB genlerine pek çok örnek verilebilmektedir. *Arabidopsis*'te patojen saldırılarına karşı *MYB30* geninin kodlandığı ve aynı zamanda bu genin yağ asitlerinin sentezinde görev aldığı belirlenmiştir. Çeltikte *OsLTR1* (Cheong vd., 2002) ve *Arabidopsis*'te *AtMYB34*, *AtMYB51*, *AtMYB75* genlerinin (Johnson ve Dowd, 2004) böcek ve otçullara karşı mücadelede ve yaralanmalarda jasmonik aside bağlı savunma mekanizmalarını aktif hale geçirdikleri belirlenmiştir. Abiyotik streslere karşı; *Arabidopsis*'te *AtMYB2*, mısırdaki *C1* genlerinin kuraklık ve tuzluluk streslerinde absisik asit üretimini teşvik ettikleri belirtilmiştir (Abe vd., 1997). Chen vd. (2005) ise *Boea crassifolia* türünde kodlanan *BcMYB1* geninin kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık gibi abiyotik streslere yanıtta aktif olduğunu göstermişlerdir. *Arabidopsis*'te yapılan bir diğer çalışmada kuraklık ve hastalık direnci için gerekli olan stomatal hareketin düzenlenmesiyle ilişkili olarak absisik asit (ABA) sinyalinin artmasında *AtMYB60* ve *AtMYB96* (Cominelli vd., 2005) genlerinin rol aldığı belirlenmiştir. Bir diğer abiyotik stres faktörü olan ışığın MYB TF'lerinin ekspresyonunu arttırdığı bunun sonucunda da antosiyanin biyosentezinin gerçekleştiği yapılan pek çok çalışmayla kanıtlanmıştır. Çizelge 2.7'de bazı meyve çeşitlerinde ışıkla uyarılan MYB TF'leri gösterilmektedir.

Çizelge 2.7. Meyve çeşitlerinde ışıkla uyarılan MYB TF'leri (Zoratti, 2014)

Türler	R2R3 MYB	Fonksiyonu
Elma (<i>Malus domestica</i>)	MdMYB1	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
	MdMYBA	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
	MdMYB10	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
	MdMYB9	Yaprakta proantosiyanidin sentezi
	MdMYB11	Yaprakta proantosiyanidin sentezi
Çin Defne Ağacı (<i>Myrica rubra</i>)	MrMYB1	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
Üzüm (<i>Vitis vinifera</i> , <i>Vitis labruscana</i>)	VvMYBF1	Meyve kabuğunda flavon biyosentezi
	VvMYB12	Meyve kabuğunda flavon biyosentezi
	VvMYBA1	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
	VlMYBA2	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
	VvMYBPA1	Meyve kabuğunda proantosiyanidin sentezi
	VvMYBPA2	Meyve kabuğunda proantosiyanidin sentezi
	VvMYB5a	Meyve kabuğunda genel flavonoid biyosentezi
	VlMYB5b	Meyve kabuğunda genel flavonoid biyosentezi
Liçi (<i>Litchi chinensis</i>)	LcMYB1	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
Nektarin (<i>Prunus persica</i>)	PpMYB10	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
Şeftali (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	PyMYB10	Meyve kabuğunda antosiyanin biyosentezi
Kültür Çileği (<i>Fragaria ananassa</i>)	FaMYB10	Meyvede antosiyanin biyosentezi
Orman Çileği (<i>Fragaria vesca</i>)	FvMYB10	Çiçekte antosiyanin biyosentezi

Işıklı uyarılısın ya da uyarılısın R2R3 MYB genlerinin ve onların kodladıkları transkripsiyon faktörlerinin antosiyanin üretiminde ve renklenmenin oluşmasında çok büyük etkileri bulunmaktadır. R2R3 MYB transkripsiyon faktörleri; antosiyanin biyosentezi basamaklarında görev alan enzimlerin sentezini aktive ederek ya da onları baskılayarak bitkilerde antosiyanin üretimini ve renk oluşumunu etkilemektedirler.



Şekil 2.11. Antosiyanlerin üretiminde etkili olan MYB transkripsiyon faktörleri (C1, COLORED1; P, MYB-ilişkili protein; AN2, Antosiyanin2) (Geffers ve Wingender, 2015)

Antosiyanin biyosentezinde R2R3 MYB TF'lerinin görev aldığını gösteren ilk çalışma mısırdaki yapılmıştır ve bu gene *COLORED1* (*C1*) adı verilmiştir. Bu çalışmada *C1* geninin, antosiyanin biyosentezi sırasında görev alan kalkan izomeraz (CHI), flavanon 3-hidroksilaz (F3H) enzimlerinin çalışmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (Paz-Ares vd., 1987). Bu çalışmadan sonra 1993 yılında petunya çiçeklerinde *AN2* adı verilen bir MYB geni bulunmuştur. Bu genin antosiyanin biyosentezini teşvik ettiği belirlenmiştir (Quattrocchio et al. 1993). Petunyada yapılan bir diğer çalışmada ise *kalkan sentetaz* (*CHS*) genini aktif eden *PhMYB3* geninin özellikle çiçeklerde petal epidermislerde renk oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Solano vd., 1995). Başka bir tür olan aslanagzı (*Antirrhinum majus*) çiçeklerinde yapılan diğer bir çalışmada ise *AmMYB305* ve *AmMYB340* genlerinin, antosiyanin biyosentezinde görevli ilk enzim olan fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enziminin kodlanmasında görev aldığı rapor edilmiştir (Moyano vd., 1996). *Arabidopsis*'te yapılan bir diğer çalışmada çiçeklerde *PAP1/MYB75* ve *PAP2/MYB90* genlerinin antosiyanin biyosentez

genlerinden PAL, CHS ve dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR) enzimlerinin üretimini arttırarak antosiyanin biyosentezinde görev aldıkları gösterilmiştir (Borevitz vd., 2000). Mehrtens vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada ise *Arabidopsis*'te *AtMYB12* olarak adlandırılan genin CHS ve flavonol sentaz enzimlerinin çalışmasının düzenlenmesinde rollerinin olduğu belirlenmiştir.

MYB transkripsiyon faktörleri bitkilerde bir yandan yaprak ve çiçeklerde renklenmeyi etkilerken bir yandan da meyvelerde göz alıcı renklerin oluşmasında etkilidirler. Farklı meyve çeşitlerinde MYB TF'lerinin renklenmeyi nasıl etkilediği üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır ve yapılan bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

2.6. Meyvelerde Renklenmede Etkili Olan MYB Transkripsiyon Faktörleri

Kyoho üzüm çeşidinde yapılan bir çalışmada, antosiyanin biyosentez genlerinden *UFGT*'nin ekspresyonunun MYBA TF aracılığıyla artıp artmadığına bakılmıştır. Kyoho asmalarında northern blot analiziyle *UFGT* geninin sadece kırmızı kabuk kısmında anlatımının olduğu gösterilmiştir. Ardından *MYBA* geninin aktarıldığı transgenik bitkilerin analiz edilmesi sonucunda kontrol ve transgenik bitkilerdeki gen ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Son basamaklarında görev alan *UFGT* geninin ekspresyonunun *MYBA* transkripsiyon faktörü aracılığıyla arttığı ve bu sayede renksiz olan asma embriyolarından kırmızımsı-morumsu meyveler elde edildiği belirtilmiştir. Bunun da *MYBA*'nın *UFGT* genini aktif edip antosiyanin birikimine neden olarak kırmızı renk oluşumunu teşvik ettiğini ifade edilmiştir (Kobayashi vd., 2002).

Deluc vd. (2006) olgun üzüm tanelerinde fenilpropanoid metabolik sentez yolunda etkili olan ve *VvMYB5a* olarak adlandırılan bir geni izole etmişlerdir. Bu genin tütünde aşırı ifade edilmesiyle elde edilen transgenik bitkilerin analizinde fenilpropanoid sentezinde yer alan genlerin etkilendiği ve dolayısıyla da antosiyanin, flavonol, tanin ve lignin sentezinin arttığı gözlemlenmiştir. *VvMYB5a* geninin aşırı ifadesi flavonol sentezinde rol oynayan genlerden olan kerasiyanin ve kuversetin-3-ramnoglukozun tütünde fazla birikmesini sağladığı

belirlenmiştir. Asmada ise *VvMYB5a* geninin meyve gelişiminin erken evrelerinde kabuk, meyve eti ve tohumlarda ifade edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında *VvMYB5a* geninin doğrudan fenilpropanoid sentez yolunu etkilediği ve antosiyanin sentezini arttırdığı belirlenmiştir.

Walker vd. (2007) yaptıkları bir çalışmada asmalarda renklenmeyle ilişkili olan iki MYB geninin varlığını tespit etmişlerdir. Bu genlerden *VvMYB1* geninin promotör bölgesindeki retrotraspozonlar aracılığıyla meydana gelen mutasyonlardan dolayı beyaz meyve rengine sahip asmalarda anlatımının yapılamadığı anlaşılmıştır. Renklenme ile ilişkili olarak çalışılmış olan ikinci bir gen olan *VvMYB2* geninde de meydana gelen bir mutasyondan dolayı beyaz meyve rengine sahip asmalarda bu genin inaktif durumda olduğu tespit edilmiş ve bundan dolayı bu asma çeşitlerinde kırmızı renklenmenin gözlemlenmediği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *VvMYBF1* geninin meyve gelişiminin farklı dönemlerindeki ifade düzeyindeki farklılıklar real-time PCR yöntemiyle analiz edilmiş ve sonuçta bu genin meyvede renklenmenin artmasıyla birlikte ifadesinde de artışlar olduğu belirlenmiştir (Czemmel vd., 2009).

Palapol vd. (2009) tarafından, mangostan meyvesinin kabuklarında yüksek antosiyanin birikiminden yola çıkılarak, bu meyvede üç adet MYB TF'nün (*GmMYB1*, *GmMYB7*, *GmMYB10*), antosiyanin sentezinden sorumlu genleri etkilediklerini göstermek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Öncelikle yapılan filogenetik analizler sonucunda *GmMYB10* geninin *Arabidopsis*'teki *antosiyanin pigment1* geniyle benzer olduğu gösterilmiştir. *GmMYB10* TF'nün, yapısal bir gen olan *GmUFGT*'yi uyararak antosiyanin birikimini teşvik ettiği anlaşılmıştır. *GmUFGT* transkriptlerinin ve *GmMYB10* geninin kırmızı renklenme sırasında oldukça fazla miktarda ifade edildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak *GmMYB10* geni mangostan meyvesinin kabuğunda antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarken, *GmUFGT* geninin de antosiyanin biyosentezinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir.

Niu vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada Çin koca yemişinin meyvelerinde antosiyanin biyosentez genlerinden *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS* ve *UFGT*'nin ve

antosiyenin biyosentezinde rol oynadığı bilinen *MrMYB1* geninin ifade düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmada üç farklı renk özelliğine sahip olan, beyaz, kırmızı, koyu kırmızı-mor çin koca yemiş meyveleri seçilmiştir. Sonuçta *MrMYB1* geninin beyazdan koyu kırmızı-mora doğru gidildiğinde ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca koyu kırmızı-mor renkli meyvelerde antosiyenin biyosentez genlerinin hepsinin (*F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS* ve *UFGT*'nin) ekspresyon düzeylerinin fazla olduğu belirlenmiştir.

Bir diğer antosiyenin biyosentezi düzenleyicisi olan *PcMYB10* geni kırmızı armut çeşidi olan 'Max Red Bartlett'te ve sarı armut çeşidi olan 'Williams'da Pierantoni vd. (2010) tarafından araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada bu gen hem diğer bitki türlerindeki ortolog genlerle karşılaştırılmış hem de bu iki çeşit armut arasında bu genin anlatım düzeyi belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak bu genin hem sarı armut çeşidinde hem de kırmızı armut çeşidinde aynı düzeyde ifade düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir ve bu genin kırmızı renklenmede doğrudan bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

MYB10 geni ile ilgili olarak yapılan yukarıdaki çalışmaların ardından Lin-Wang vd. (2010) tarafından farklı bitki türlerinde antosiyenin biyosentezini düzenleyen *MYB10* genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Bu çalışmada kirazda *PavMYB10* geninin ekspresyonu; koyu kırmızı renge sahip olan 'Stella' çeşidinde yüksek seviyede iken, daha açık kırmızı renge sahip 'Rainier' çeşidinde daha düşük seviyede bulunduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, *PavMYB10* geninin kırmızı renk oluşumunda etkili olduğunun kanıtı olmuştur.

Ravaglia vd. (2013); 'Stark Red Gold' nektarin çeşidininin meyve gelişimi sırasında antosiyenin ve flavon-3-ol seviyelerinin meyve gelişimiyle birlikte değiştiği gözlemlenmiştir. Bu hipotez flavonoid biyosentezinde rol oynayan genlerin ifade düzeylerinde belirlenen artışlarla doğrulanmıştır. Aynı zamanda antosiyenin biyosentez genlerinin ifade düzeylerinin real-time PCR'dan elde edilen sonuçlarla meyve kabuğunda biriken antosiyenin ve flavanol-3-ol miktarlarının HPLC metoduyla elde edilen sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada *UFGT* geninin antosiyenin birikimine benzer bir grafik çizdiği

gözlenirken, diğer genlerin (*LAR* ve *DFR*) antosiyanin ile değil de flavon-3-ol ile benzer şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu da farklı transkripsiyon faktörlerinin antosiyanin biyosentez genleri üzerinde etkili olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Yapılan bu çalışmaların sonucunda nektarinde bulunan MYB10 transkripsiyon faktörünün *UFGT* geninin promotör bölgesine bağlanarak ifadesini pozitif yönde etkilediği ve antosiyanin birikimini artırdığı belirlenmiştir.

Armutta yapılan bir diğer çalışmada; kırmızı renkli 'Aoguan' armut çeşidinden *PyMYB10* ve *PyMYB10.1* genleri izole edilmiştir. Bu iki genin kırmızı renkli kabuk, yaprak ve çiçeklerde oldukça fazla ifade edildiği gözlemlenirken, kırmızı olmayan meyve etinde yok denecek kadar az ifade edildiği belirtilmiştir. Bu iki genin yapılan çalışmalarla antosiyanin biyosentezinde görevli yapısal bir gen olan *DFR* genini aktive ettikleri gösterilmiştir. Sonuçta *PyMYB10* ve *PyMYB10.1* genlerinin antosiyanin birikimini artırdığı rapor edilmiştir (Feng vd., 2015).

Zhai vd. (2015) armutta flavonoid biyosentezinin nasıl düzenlendiğine dair bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada 18 tane flavonoid senteziyle ilişkili olduğu sanılan MYB TF'nin filogenetik analizleri sonucunda 4'ünün flavonoid biyosenteziyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu MYB TF'den 2 tanesinin (*PbMYB10b* ve *PbMYB9*) spesifik fonksiyonları olduğu ortaya çıkarılmıştır. *PbMYB10b* TF'nün, *PbDFR*'nin ifadesini artırarak antosiyanin ve proantosiyanidin sentez yollarını düzenlediği belirlenmiştir. *PbMYB9* TF'nün ise, bir yandan *PbANR* geninin promotör bölgesine bağlanarak bu genin aktif olmasını sağlayarak proantosiyanidin sentez yolunu düzenlediği, bir yandan da *PbUFGT1* geninin promotör bölgesine bağlanarak antosiyanin ve flavonol sentezini teşvik ettiği belirlenmiştir.

Antosiyanin bakımından oldukça zengin bir meyve olan patlıcanda ise Docimo vd. (2016), patlıcanın farklı dokularında bulunan antosiyanin ve diğer flavonoidleri kütle spektrofotometri yöntemiyle analiz etmişlerdir. Daha sonra antosiyanin biyosentezinde görevli olan *PAL* ve *ANS* yapısal genlerinin aktivasyonunda etkili olduğu düşünülen *SmMYB1* geninin ifadesi yaprak, kök,

çiçek ve meyve olmak üzere farklı organlarda real-time PCR yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçta bu genin; antosiyanin birikiminin ve renklenmenin fazla olduğu çiçek ve meyvelerde fazla ifade edildiği belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar *SmMYB1* geninin antosiyanin biyosentezinde rol oynayan bir gen olduğunu göstermiştir.

Sarıdan kırmızıya kadar meyve kabuğunda renklenme gösteren kirazda yapılan bir çalışmada ise; renklenmenin asıl kaynağı olan antosiyanin biyosentezinde görevli *PavANS* ve *PavUFGT* genlerinin ifade düzeylerini pozitif yönde etkileyen *PavMYB10.1* transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır. *PavMYB10.1* TF'nün, antosiyanin biyosentezinde rol oynayan genleri etkileyerek kirazda kabuk renginin kırmızı olmasına öncülük ettiği belirlenmiştir (Jin vd., 2016).

Değişik meyve türlerinde yukarıda açıklanan çalışmalara benzer pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar Çizelge 2.8'de özetlenmektedir. Bu çizelgede meyve türleri, renklenme üzerine etkili olan MYB TF'leri ve etki ettikleri genler ve ayrıca eğer belirlenmişse hangi doku üzerinde etkili oldukları belirtilmektedir.

Çizelge 2.8. Farklı meyve türlerinde MYB TF'lerin etki ettiği yapısal genler ve meyve dokuları

Meyve Türleri	MYB	bHLH	Etki Ettiği Genler	Etki Ettiği Meyve Dokusu	Kaynaklar
Elma	MdMYB1	MdHLH3, HLH33	<i>ANS</i>	Kabuk	Takos vd., 2006
	MdMYBA			Kabuk	Ban vd., 2007
	MdMYB10			Kabuk/Meyve eti/Yaprak	Espley vd., 2009
Üzüm	VvMYB5b	MYCA1	<i>VvLAR</i> ve <i>VvANR</i>	Kabuk	Deluc vd., 2008
	VvMYB5a		<i>UFGT, C4H, ANS,</i>	Kabuk	Deluc vd., 2006
	VvMYBA1		<i>F3H, CHI, CHS, ACL,</i>	Kabuk	Walker vd., 2007
	VvMYBA2		<i>DFR, ANR</i>		Walker vd., 2007
Armut	PyMYB10		<i>DFR</i>	Kabuk	Feng vd., 2010
	PcMYB10			Kabuk	Pierantoni vd., 2010
	PpyMYB10				Wang vd., 2010
	PbMYB10				Wang vd., 2010
Mangostan	GmMYB10		<i>GmDFR, GmUFGT,</i>	Perikarp	Palapol vd., 2009

Çizelge 2.8. Farklı meyve türlerinde MYB TF'lerin etki ettiği yapısal genler ve meyve dokuları (Devam)

Çilek	FaMYB1		<i>ANS, UFGT</i>	Meyve eti	Aharoni vd., 2001
	FaMYB10		<i>DFR</i>		Wang vd., 2010
	FvMYB10		<i>DFR</i>		Wang vd., 2010
Yaban Mersini	VmTDR4		<i>VmMYB2</i>	Kabuk/Meyve eti	Jaakola vd., 2010
Çin Defne Meyvesi	MrMYB1		<i>AtDFR</i>	Meyve eti	Niu vd., 2010
Yeni dünya	EjMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Muşmula	MgMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Ayva	CoMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Kayısı	ParMYB10		<i>DFR</i>	Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Erik	PiMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
	PdmMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
	PsMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Kiraz	PavMYB10		<i>DFR</i>	Bilinmiyor	Wang vd., 2010
	PcrMYB10		<i>DFR</i>	Bilinmiyor	Wang vd., 2010
	PcfMYB10			Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Badem	PdMYB10		<i>DFR</i>	Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Şeftali	PprMYB10		<i>DFR</i>	Bilinmiyor	Wang vd., 2010
Kırmızı Ahududu	RiMYB10		<i>DFR</i>	Bilinmiyor	Wang vd., 2010

2.7. Elmalarda Renklenmede Etkili Olan MYB Transkripsiyon Faktörleri

Elmalarda renklenmeyle ilgili çalışmalar Cheng vd. (1996) yaptığı çalışmayla başlamıştır. Bu çalışmada kırmızı kabuk rengine sahip elmalara özgü 10 baz çifti uzunluğundaki RAPD markörleri belirlenmiş ve belirlenen bu RAPD primeri ile elmalarda kırmızı kabuk renginin belirlenebileceği kanıtlanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda ise kırmızı kabuk renginin belirlenmesinde rol aldığı düşünülen genler araştırılmıştır.

Takos vd. (2006) yaptığı bir çalışmada Cripps' Pink elma çeşidinden elde edilen *MdMYB1* geni ile diğer bitki türlerinde bulunan antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesinden sorumlu olan genler karşılaştırılmıştır. Yapılan bu karşılaştırmanın sonucunda *Arabidopsis* ve asmada antosiyanin sentezinin düzenlenmesinden sorumlu genler ile *MdMYB1* geninin benzer olduğu bulunmuştur. Ayrıca karanlıkta tutulan elmaların daha sonra güneş ışığına maruz bırakılmasıyla *MdMYB1* geninin transkript seviyesinde artışlar belirlenmiş ve böylece elmada *MdMYB1* geninin ışığın etkisiyle birlikte renklenmede olan etkisi gösterilmiştir. Ayrıca bu genin transkriptlerinin kırmızı elmalarda, kırmızı olmayan elmalara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Ban vd. (2007)'nin yaptığı bir çalışmada ise elmada *MdMYBA* geninin farklı dokularda ekspresyon seviyelerine northern blot analiz yöntemiyle bakılmıştır. Daha sonra ise aynı genin farklı elma çeşitlerindeki ifade düzeyleri incelenmiştir. En son aşamada ise farklı türlerde meyve et ve kabuğunda *MdMYBA* geninin anlatımları arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Sonuçta *MYBA* geninin sadece antosiyanin üretiminin teşvikinde tek başına rol almadığı anlaşılmış, ışık türü ve ışıklenme süresinin de anlatımda rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

Elmalarda antosiyanin biyosentez genlerinin ifade düzeylerinin araştırıldığı Espley vd. (2007)'nin yaptığı bir çalışmada ise beyaz meyve etine sahip 'Pasific Rose™' ve kırmızı meyve etine sahip 'Red Field' elma çeşitleri arasında altı farklı antosiyanin biyosentetik genin karşılaştırılması yapılmış ve kırmızı meyve etine sahip olan elma çeşidinde bu genlerin ekspresyonlarının hem kabukta hem de meyve etinde daha yüksek olduğu kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada *MdMYB10* geninin antosiyanin biyosentezinde düzenleyici olarak rol oynadığı sonucuna varılmıştır. *MdMYB10* geninin antosiyanin üretimiyle olan ilişkisi anlaşıldıktan sonra Telias vd. (2011) bu genin farklı elma çeşitlerindeki ifade düzeylerini karşılaştırmışlardır. *MdMYB10* geninin 'Royal Gala' ve 'Honeycrisp' elma çeşitlerindeki ekspresyonu real-time PCR yöntemi ile incelenmiş ve kırmızı renkli elmada transkript seviyesinin yeşil renkli elmaya göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Tek bir lokusta bulunan, homolog genler olan elma *MdMYB1*, *MdMYBA* ve *MdMYB10* genlerinin promotör bölgelerinde farklı tekrar sayılarına sahip bölgeler içerdiği Mahmoudi vd. (2012) tarafından ortaya konmuştur. Bu tekrarlı diziler *MdMYB10* geni için yüksek ekspresyon seviyesi sağlarken *MdMYB1* ve *MdMYBA*'daki eksik tekrardan dolayı ekspresyon seviyelerini sınırladığı belirtilmiştir. Ayrıca bu genlerin kırmızı ve yeşil elma çeşitlerindeki doku ve genoma özgü ekspresyon seviyeleri diğer yayınlarla karşılaştırılmıştır ve yapılan çalışmayla benzer sonuçların olduğu gözlemlenmiştir. İran bölgesinde bulunan kırmızı meyve etine sahip elmalarda *MdMYB10* geni için promotör

bölgede bulunan tekrar sayılarında bir farklılık gözlenmemiş ve bu da bu dizilerin evrimsel açıdan korunduğunu göstermiştir.

Diğer bir çalışmada mutant elma çeşidi 'Ralls' kullanılarak *MdMYB1* geninin, normal şartlarda ve ışık almayan ortamda olmak üzere iki farklı durumda tutulan genç meyveleri arasındaki anlatım farklılıkları incelenmiştir. Her iki durumda da *MdMYB1* geninin anlatımının yaklaşık olarak aynı olduğu belirlenmiştir. Bu iki durum arasında bulunan renklenme farklılıklarının DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Xu, vd., 2012).

MdMYB1 geniyle ilgili yapılan başka bir çalışmada Li vd. (2012) ışıkta bu genin anlatımının artmasının yanı sıra karanlıkta ubiquitin bağımlı yolda görev alan *MdCOP1* geninin *MdMYB1* genini baskılayıp renklenmenin olmamasına yol açtığını belirtmişlerdir. Change vd. (2013) yeşil yapraklara ve kırmızı meyvelere sahip olan 'Sangrado' elma çeşidinde MYB transkripsiyon faktörlerinde gerçekleşmiş olan bir duplikasyondan dolayı bu fenotipin oluştuğunu öne sürmüşler ve daha sonra kırmızı renkli meyve eti korteksi fenotipinin *MYB19* geninin bir paralogu olan *MYB110a*'nın ekspresyonunun artmasıyla ilişkili olduğunu ispat etmişlerdir. Bu duplikasyonun ise Maloideae ailesiyle birlikte evrimsel gelişim süreci içerisinde elmada meydana geldiği düşünülmektedir.

Elmalarda süren çalışmalarla Vimolmangkang vd. (2013), antosiyanin biyosenteziyle ilişkili yeni bir MYB geni tanımlamışlardır. Bu gen *Arabidopsis thaliana*'daki *AtMYB3* genine benzerliğinden dolayı *MdMYB3* olarak adlandırılmıştır. *MdMYB3* geninin farklı elma çeşitlerinde yaprak, çiçek ve farklı olgunlaşma seviyelerindeki meyvelerdeki ifade düzeyine real-time PCR yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda bu genin kırmızı kabuk rengine sahip elmalarda sarı-yeşil kabuk rengine sahip elmalara göre daha fazla anlatımının gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca *MdMYB3* geninin, antosiyanin biyosentez genleri olan *CHS*, *CHI*, *UFGT* ve *FLS* genlerinin anlatımlarını arttırdığı da belirtilmiştir.

Bai vd. (2016), yeşil kabuk rengine sahip 'Mutsu' elma çeşidinde normal şartlar altında anlatımı yapılmayan *MdMYB1* geninin 2. ve 3. allellerinin, kırmızı renklenme gözlenmeyen ancak ambalajlanıp daha sonra UV-B ışığa maruz bırakılan örneklerde anlatımının yapıldığı ve kırmızı renklenmenin gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu çalışmada *MdMYB1* geninin normal şartlarda UV-B ışığa direkt maruz kaldığında anlatımının baskılandığı, ancak ambalajlama çalışmasıyla ışığa daha az maruz kaldığında genin allellerinin anlatımı yapılarak renklenmenin meydana geldiği anlaşılmıştır.

Meyve olgunlaşması ve renklenmenin artmasıyla yaban elmalarında *McMYB10* geninin ifadesinin arttığını gösteren çalışmada, Lu vd. (2017) meyve olgunlaşmasının 5 farklı evresinde bulunan kırmızı renkli 'Royalty' ve yeşil renkli 'Flame' elma çeşitleri kullanmışlardır. Bu iki elma çeşidinde yapılan karşılaştırmalı analizlerle *McMYB10* geninin yaban elmalarında antosiyanin birikiminin artırdığı kanıtlanmıştır.

Yaban elmasında yapılan başka bir çalışmada, *McMYB12a* ve *McMYB12b* genlerinin elma meyvelerinde antosiyanin birikimini ve kırmızı renklenmeyi arttırdığı gösterilmiştir. Bu iki genin antosiyanin birikimini; *PA* biyosentez geninin promotör bölgesine bağlanarak artırdığı anlaşılmıştır (Tian vd., 2017).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada kullanılan farklı elma çeşitlerine ait kabuk örnekleri Isparta İli Eğirdir İlçesi Kızılçubuk Mahallesi'nde yer alan elma bahçesinden temin edilmiştir. Kullanılan elma çeşitlerine ait örnekler farklı kabuk rengi özelliğine sahip ve MM106 anacı üzerine aşıllı 6 yaşındaki dört elma çeşidinden alınmıştır. Alınan örneklerin tüm laboratuvar çalışmaları Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan elma kabukları farklı düzeylerde renklenme gösteren 4 farklı elma çeşidinden (Scarlet Spur, Galaxy Gala, Golden Delicious ve Granny Smith) alınmıştır. Seçilen bu elma çeşitlerinin kabuk renkleri Tablo 3.1 ve Şekil 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan elma çeşitleri ve kabuk renkleri

NO	ÇEŞİT ADI	MEYVE KABUK RENGİ
1	Scarlet Spur	Koyu kırmızı
2	Galaxy Gala	Sarı zemin üstüne kırmızı
3	Golden Delicious	Sarı
4	Granny Smith	Yeşil



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan elma çeşitleri

3.1.1. Scarlet Spur elma çeşidinin özellikleri

Çalışma için seçilen ilk elma çeşidi Scarlet Spur olup, orijini ABD'dir. Koyu kırmızı kabuk rengine sahip olan Scarlet Spur'un ağaçları orta kuvvette ve yarı dik olarak gelişme göstermektedir (Koyuncu ve Erbaş, 2013). Scarlet Spur'un iri yapıda olan meyveleri tatlı, sulu ve gevrekli. Erken renklenme göstermesinden dolayı üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Meyveler tam çiçeklenmeden 145-150 gün sonra olgunluğa erişmekte ve Eylül-Ekim aylarında hasat edilmektedir. Ayrıca meyveler uzun süre soğuk hava depolarında saklanabilme özelliğine sahiptir.

3.1.2. Galaxy Gala elma çeşidinin özellikleri

Seçilen diğer bir elma çeşidi olan Galaxy Gala'nın orijini Yeni Zelanda'dır. Bu çeşide ait meyvelerin renkleri sarı zemin üzerine kırmızı renkli olup, meyveler orta irilikte, sert, tatlı ve suludur. Yüksek verimlilik özelliğinden dolayı üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Meyveler tam çiçeklenmeden 125-135 gün sonra olgunluğa erişmekte olup hasat zamanı Ağustos ayının sonlarına doğru gerçekleşmektedir.

3.1.3. Golden Delicious elma çeşidinin özellikleri

Çalışmada kullanılan üçüncü elma çeşidi Golden Delicious çeşididir. Golden Delicious çeşidi ABD orijinlidir ve bu çeşide ait meyveler sarı renkli, iri, mayhoş ve suludur. Düzenli ve bol mahsul verdiği için üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Meyveler tam çiçeklenmeden 145-150 gün sonra olgunluğa erişmekte ve meyveler Eylül-Ekim aylarında hasat edilmektedir.

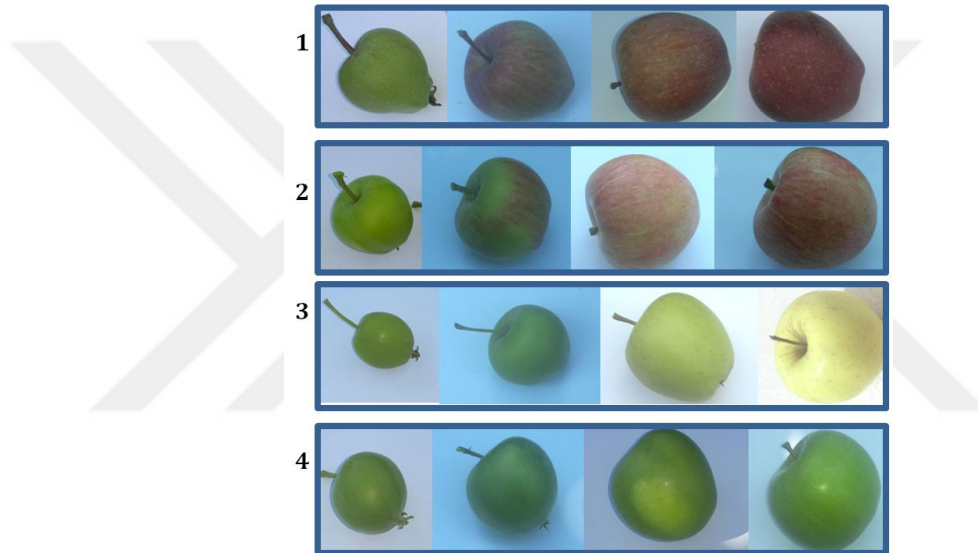
3.1.4. Granny Smith elma çeşidinin özellikleri

Çalışmada kullanılan 4. ve son çeşit Granny Smith elma çeşididir ve orijini Avustralya'dır. Bu çeşidin meyveleri yeşil renkli olup meyveler iri yapıda ve mayhoş bir tada sahiptir. Düzenli ve bol miktarda ürün veriyor olması ve aynı

zamanda depolamaya çok uygun olmasından dolayı üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Meyveler tam çiçeklenmeden 165-175 gün sonra olgunluğa erişmektedir ve hasat zamanı Ekim ayının sonlarına doğru gerçekleşmektedir.

3.1.5. Örnek alım zamanları

Seçilen elma çeşitlerinden meyve örnekleri 2015 yılının bahar ayında her çeşit için genç meyve, olgunlaşan meyve, hasat öncesi meyve ve hasat zamanı meyvesi olacak şekilde dört farklı dönemde alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan elma çeşitlerinin olgunlaşmayla birlikte renk değişimleri (1; Scarlet Spur, 2; Galaxy Gala, 3; Golden Delicious, 4; Granny Smith)

Ayrıca meyve örnekleri her ağaçtan kuzey, güney, doğu ve batı yönlerinden olmak üzere dört adet olarak toplanmıştır. Çeşitlerin her birinin olgun bir meyve oluncaya kadar geçen süreler farklılık gösterdiğinden dolayı meyve örnekleri çeşitler için farklı tarihlerde alınmıştır. Meyve örneklerinin alınma tarihleri Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Farklı elma çeşitlerine ait meyvelerin alım tarihleri

Elma Çeşidi	Örnek Alınan Tarihler (Tam Çiçeklenmeden sonraki gün sayısı)			
	Scarlet Spur	55	92	127
Galaxy Gala	55	92	115	127
Golden Delicious	55	92	127	141
Granny Smith	55	127	154	169

Örnekler meyvenin orta kısmından bir şerit oluşturacak şekilde kabuk kısmı soyularak alınmış, hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurularak -80 °C'de RNA izolasyonu yapılmaya kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.3. Elma bahçesinde meyvelerden kabuk örneklerinin alınması (1,2) ve sıvı azot içinde dondurulması (3)

3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu CTAB-LiCl total RNA izolasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle -80 °C'de saklanan meyve kabuk örnekleri steril havanlar içerisinde sıvı azot yardımıyla ezilmiştir. Ezilen örneklerden 100 mg doku örneği 15 ml'lik falkon tüplere alınmış ve üzerine CTAB solüsyonu eklenmiştir. 65 °C'de 30 dak. inkübasyona tabii tutulduktan sonra, örnekler eşit

hacimlerde steril ependorf tüplerine bölünüp üzerlerine kloroform eklenerek 10000 rpm'de 10 dak. santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra faz ayrımı gerçekleşen örneklerin üst fazları alınarak tekrar kloroform eklenmiş ve 10000 rpm'de 10 dak. daha santrifüj yapılmıştır. Bu aşamadan sonra üste kalan sıvı faz dikkatli bir şekilde alınıp, miktarı belirlenerek üzerine $\frac{1}{4}$ oranında 10 M LiCl solüsyonu eklenerek 12 saat boyunca +4 °C'de bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerden 10000 rpm'de yapılan santrifüj sonunda oluşan pellet SSTE buffer solüsyonu içinde çözdürülmüştür ve ardından 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınarak, üstüne %95'lik etanol çözeltisi eklenmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan 13000 rpm'deki 30 dak. santrifüjden elde edilen pellet %70'lik etanolle yıkanıp kurutularak 75 µl steril saf su içerisinde çözdürülmüş ve -80 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.3. DNase I Uygulaması

Toplam RNA izolasyonu yapılan örnekler içerisinde olabilecek DNA kontaminasyonun önüne geçilmesi için örnekler DNase I (Thermo) uygulaması üretici firmanın önerileri doğrultusunda 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. DNase I uygulaması gerçekleştirilen örnekler 50 mM EDTA eklenerek enzim inaktivasyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Dnase I uygulamasının hemen ardından örnekler spektrofotometre ve/veya nanodropda ölçülerek konsantrasyonları, %1'lik olarak hazırlanan agaroz jel elektroforez yöntemiyle de kaliteleri belirlenmiştir.

3.4. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti (Thermo), oligo (dT) primeri ve her bir örnekten 250 ng RNA kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.5. Real-Time PCR Çalışması

Çalışmada SsoFast EvaGreen Supermix (Biorad) kullanılarak, üretici firmanın protokollerine uygun bir şekilde, real-time PCR uygulaması gerçekleştirilmiştir. Toplamda 20 µl'lik reaksiyon içinde; her bir primerden 1 µl ve hedef cDNA'dan 37,5 ng kullanılmıştır. Real-time PCR; CFX96-Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) kullanılarak, ilk denatürasyon aşamasında 95 °C'de 30 sn, daha sonra 40 döngü olacak şekilde denatürasyon 95 °C'de 30 sn, bağlanma 60 °C'de 30 sn, uzama 72 °C'de 30 sn olarak ayarlanmıştır. Çalışma 96'lık plakelerde gerçekleştirilmiş ve referans gen olarak elma *ubikutin* geni kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan RNA'lar iki farklı zamanda izole edilmiş ve farklı zamanda izole edilen her bir RNA'nın da real time PCR'da iki defa tekrarı yapılmıştır. Ve böylece sonuçlar dört farklı real-time PCR sonucunun ortalaması alınarak analiz edilmiştir.

Referans genin ve çalışmada ifade düzeyleri ölçülen *MdMYBA*, *MdMYB10* ve *MdMYB3* genlerinin spesifik primerleri Çizelge 3.3'te verilmektedir.

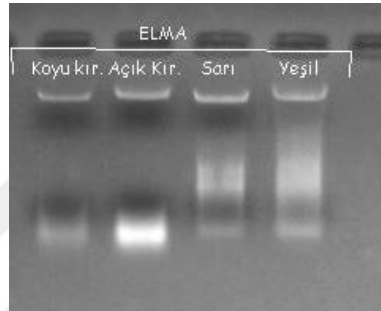
Çizelge 3.3. Real-time PCR uygulamasında kullanılan primer dizileri

Gen Adı	Forward Primer	Reverse Primer
<i>MdUbikutin</i>	5'-TCGCTGGAAAGCAGCTTGAAGA-3'	5'-GCTTCCGGCAAAGATCAGACG-3'
<i>MdMYBA</i>	5'-AGACCAATGTGATAAGACCTCAG-3'	5'-AACCAAAAAGTGTGAAGAGTTC-3'
<i>MdMYB10</i>	5'-TGCCTGGACTCGAGAGGAAGACA-3'	5'-CCTGTTCCCAAAGCCTGTGAA-3'
<i>MdMYB3</i>	5'-GGCAAGAGTTGCAGTTGAG-3'	5'-GTCGCTTGATGTGTGTGTTCC-3'

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

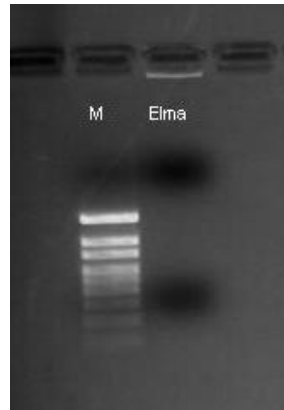
4.1. RNA İzolasyonu

Elma kabuğu kullanılarak yapılan RNA izolasyonlarında çeşitli protokoller ve kitler denenmiştir. Öncelikle CTAB yöntemiyle total nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Ancak Şekil 4.1'de gösterildiği gibi RNA izolasyonu sonucunda parlak ve belirgin bantlar elde edilememiştir.



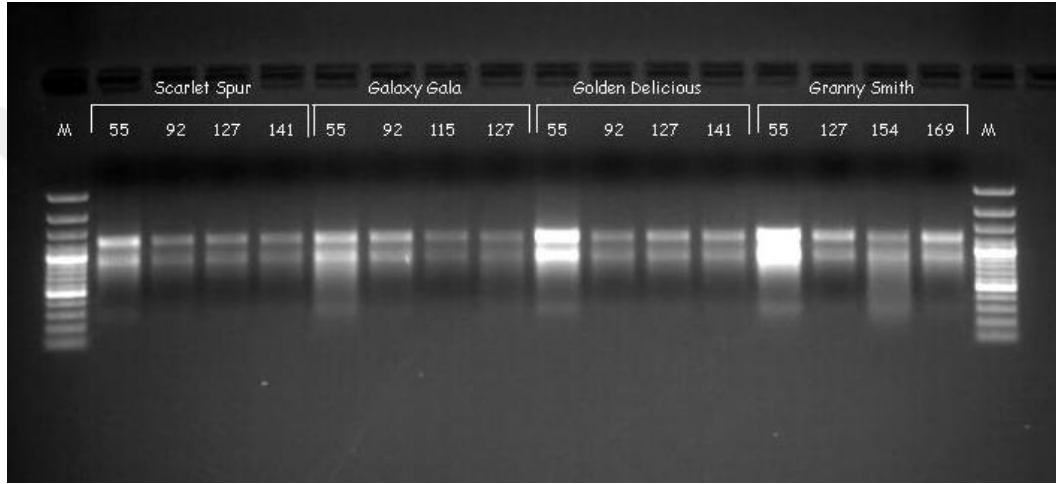
Şekil 4.1. CTAB yöntemiyle kullanılarak elde edilen RNA'nın agaroz jel elektroforez resmi

Daha sonra sıvı azot yardımıyla ezilen meyve kabuğu örneklerinden öncelikle RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak çalışmanın devamında kullanılacak kalitede ve konsantrasyonda RNA izole edilememiştir. Daha sonra Trizol solüsyonu kullanılarak RNA izole edilmeye çalışılmış ancak bu yöntemden de istenilen sonuç alınamamıştır (Şekil 4.2).



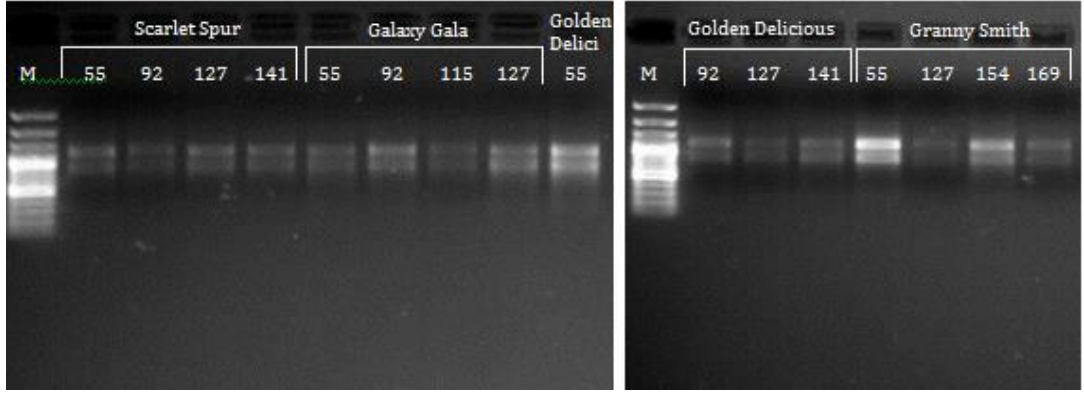
Şekil 4.2. Trizol kullanılarak elde edilen RNA'nın agaroz jel elektroforez resmi

Yukarıda ismi yazılan kit veya solüsyonların kullanımı sonucunda elma kabuklarından RNA izolasyonunun gerçekleşmesi mümkün olamamıştır. Bu nedenle de daha uzun bir protokol olmasına rağmen CTAB-LiCl metodu kullanılarak elma kabuklarından total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan sonra örneklere DNase I uygulanarak herhangi bir DNA kontaminasyonunun önüne geçilmiştir. DNase I uygulamasının hemen ardından örneklerin konsantrasyonları ve kaliteleri sırasıyla spektrofotometre ve/veya nanodrop ve %1'lik agaroz jel içerisinde yürütülerek tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Elma örneklerinden izole edilen toplam RNA'ların DNase I uygulamasından sonra elde edilen agaroz jel görüntüsü

Alınan elma örneklerinde çalışmada kullanılmak üzere farklı zamanlarda iki kere RNA izolasyonu yapılmış ve DNase I uygulanmıştır. İkinci defa yapılan RNA izolasyonlarının DNase I uygulamasından sonra elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4'de gösterilmektedir.

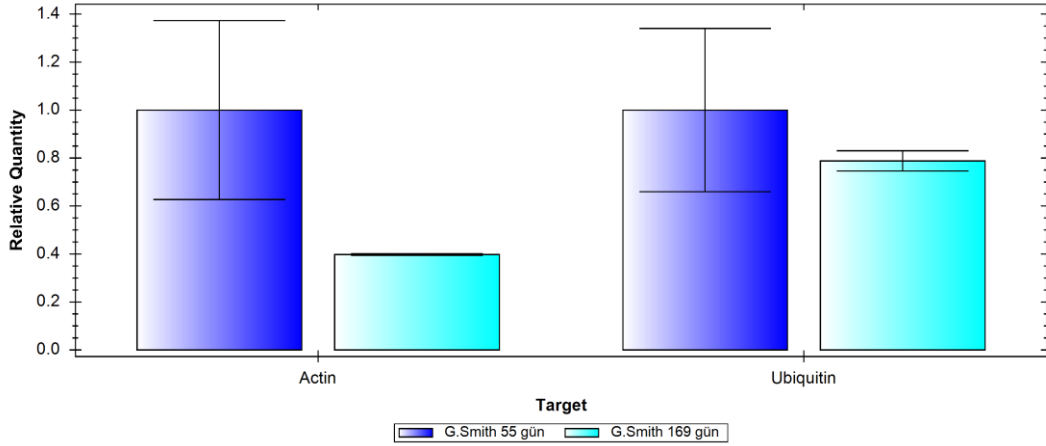


Şekil 4.4. Elma örneklerinden ikinci defa izole edilen toplam RNA'ların DNase I uygulamasından sonra elde edilen agaroz jel görüntüsü görüntüleri

4.2. cDNA Sentezi ve Real-Time PCR Çalışması

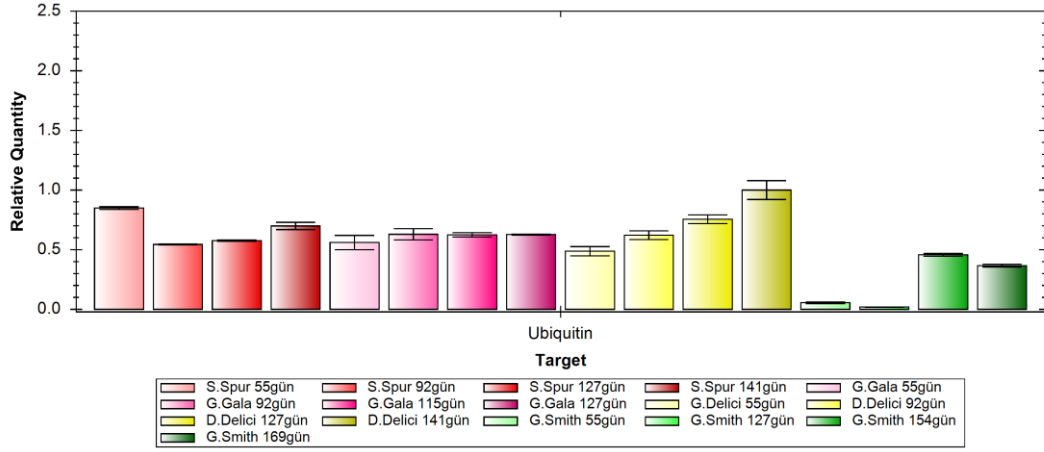
Elmada renklenmeden sorumlu MYB transkripsiyon faktörlerinin meyve olgunlaşmasında veya etkiliyse olgunlaşmanın hangi döneminde etkili olup olmadığını belirlemek üzere öncelikle izole edilen elma örneklerinden elde edilen RNA'lar ve RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti (Thermo) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada real-time PCR çalışmalarında farklı zaman aralıkları için kullanılan RNA örneklerinin eşit olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla aktivitesi hiç bir koşulda değişiklik göstermeyen referans gen olarak isimlendirilen gen kullanma zorunluluğu vardır. Bu amaçla da daha önce yapılmış çalışmalarda kullanılmış referans genler araştırılmış ve sıklıkla kullanılan aktin ve ubikutin genlerinin bu çalışma kapsamında da kullanılabileceği düşünülmüştür. Daha sonra *MdAktin* ve *MdUbikutin* genlerinden hangisinin daha iyi çalışacağını araştırmak amacıyla Granny Smith elma çeşidinin farklı olgunlaşma dönemlerinden (55 ve 169 gün) alınan elma örneklerinin kabuklarından izole edilen toplam RNA'lar ve *MdAktin* ve *MdUbikutin* genleri kullanılarak real-time PCR yöntemiyle gen ifadeleri karşılaştırılarak çalışmamızda hangi referans genin kullanılacağına karar verilmiştir (Şekil 4.5). Birkaç defa yapılan real-time PCR çalışmalarının sonucunda Şekil 4.5'te görüldüğü gibi *MdAktin* geni ile çalışılan örneklerin gen ekspresyon seviyeleri arasındaki farkın, *MdUbikutin* geniyle çalışılan örneklerin arasındaki farktan daha fazla olduğu görülmüştür. Sonuçta *MdUbikutin* geninin

daha iyi sonuç verdiğine ve çalışmada referans gen olarak *MdUbikutin* geninin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.5. *MdActin* ve *MdUbikutin* genleri ile yapılan deneme sonuçları (G. Smith: Granny Smith)

Referans genin hangisi olduğuna karar verildikten sonra, daha önceki basamaklarda elde edilen cDNA'larda herhangi bir sorun olup olmadığını belirlemek ve aynı zamanda cDNA sentezi yapılırken kullanılan RNA miktarlarının bir kez daha karşılaştırılması amacıyla, elde edilen tüm cDNA'lar ve *MdUbikutin* referans geni kullanılarak real-time PCR yapılmıştır. Yapılan bu real-time PCR çalışmasının sonucunda ifade düzeyleri arasında çok farklılık olduğu gözlemlenen örneklerin RNA'ları (Granny Smith elma çeşidinin tam çiçeklenmeden sonraki 55 ve 127 gün örnekleri) tekrar izole edilmiş ve cDNA sentezlerinin ardından referans gen kullanılarak ifade düzeyleri tekrar kontrol edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. cDNA'ların kontrolü için referans gen kullanılarak yapılan real-time PCR çalışması (S.Spur: Scarlet Spur, G. Gala: Galaxy Gala, G. Delici: Golden Delicious, G. Smith: Granny Smith)

cDNA'ların tamamen sorunsuz çalıştığı anlaşıldıktan sonra, sırasıyla *MdMYBA*, *MdMYB10* ve *MdMYB3* genleri için real-time PCR ile çalışmalara başlanmış ve ifade düzeyleri ölçülmüştür. Yapılan real-time PCR çalışmalarının sonuçlarının güvenilirliğini arttırmak amacıyla referans gen kullanımının yanında RNA'lar iki farklı zamanda elde edilmiş ve aynı zamanda her bir RNA izolasyonu için real-time PCR çalışmaları her bir gen için ikişer defa tekrarlanmıştır. Sonuç olarak real-time PCR çalışmalarının sonuçları bilgisayar programı yardımıyla her bir gen için iki farklı RNA izolasyonu kullanılarak ve her bir RNA izolasyonu için ikişer defa yapılan real-time PCR çalışmalarından elde edilen tüm sonuçlar birleştirilerek (gene study sonuçları) elde edilmiştir.

4.3. MdMYB10, MdMYBA ve MdMYB3 Transkripsiyon Faktörlerinin Elmalarda Renklenme Üzerine Olan Etkileri

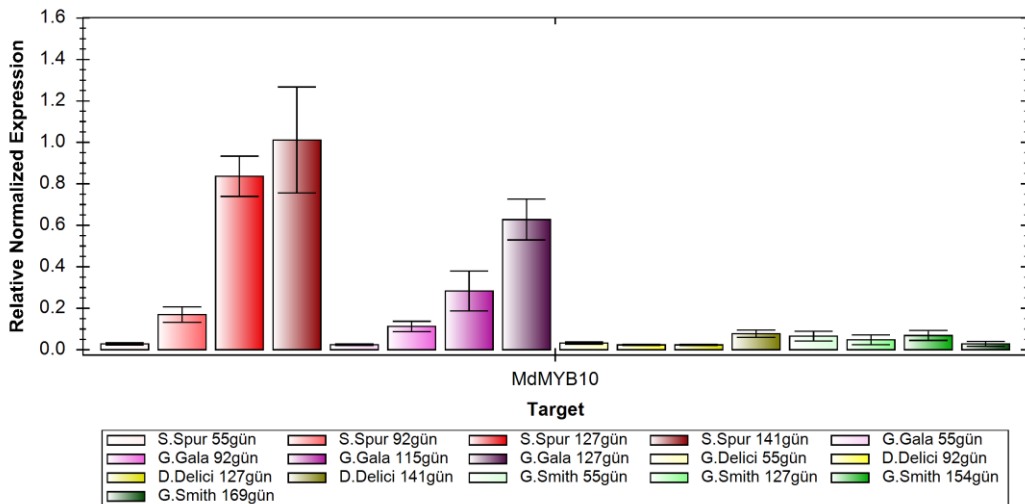
Yapılan real-time PCR çalışmalarıyla MYB transkripsiyon faktörlerinin (*MdMYB10*, *MdMYBA* ve *MdMYB3*) ifade düzeyleri farklı renklenme gösteren dört farklı elma çeşidinde tam çiçeklenmeden meyve olgunlaşmasına kadar geçen dönemde incelenmiştir.

İlk olarak *MdMYB10* geninin, koyu kırmızı (Scarlet Spur), sarı-kırmızı (Galaxy Gala), sarı (Golden Delicious) ve yeşil (Granny Smith) renkli elma çeşitlerinde

ifade düzeyine bakılmıştır. *MdMYB10* geninin ifadesi için dört ayrı tekrarlar yapılan real-time PCR çalışmalarından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Koyu kırmızı renkli meyve kabuğuna sahip Scarlet Spur elma çeşidinde *MdMYB10* geninin ifadesinin olgunlaşmayla birlikte arttığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.7). Bu çeşit için *MdMYB10* geninin ifadesi tam çiçeklenmeden 92 gün sonra olgunlaşmayla birlikte artış göstermiş ve hasat dönemi olan 141. günde genin ifadesinin maksimum düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Diğer bir çeşit olan ve sarı zemin üstüne kırmızı renge sahip Galaxy Gala çeşidinde ise *MdMYB10* geni için yapılan dört farklı real-time PCR çalışmasından da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre *MdMYB10* geninin ifadesinin Galaxy Gala çeşidinde tam çiçeklenmeden 92 gün sonra artış gösterdiği ve hasat döneminde (tam çiçeklenmeden 127 gün sonra) ise genin ifade düzeyinin kırmızı renkli meyve kabuğuna sahip Scarlet Spur elma çeşidinde olduğu gibi en üst seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

Sarı renkli meyve kabuğuna sahip üçüncü çeşit olan Golden Delicious'ta ve yeşil renkli meyve kabuğuna sahip olan Granny Smith elma çeşidinde *MdMYB10* geninin ifadesinin yapılan analizler sonucunda tam çiçeklenmeden meyve olgunlaşması dönemine kadar geçen sürede yok denecek kadar az seviyelerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

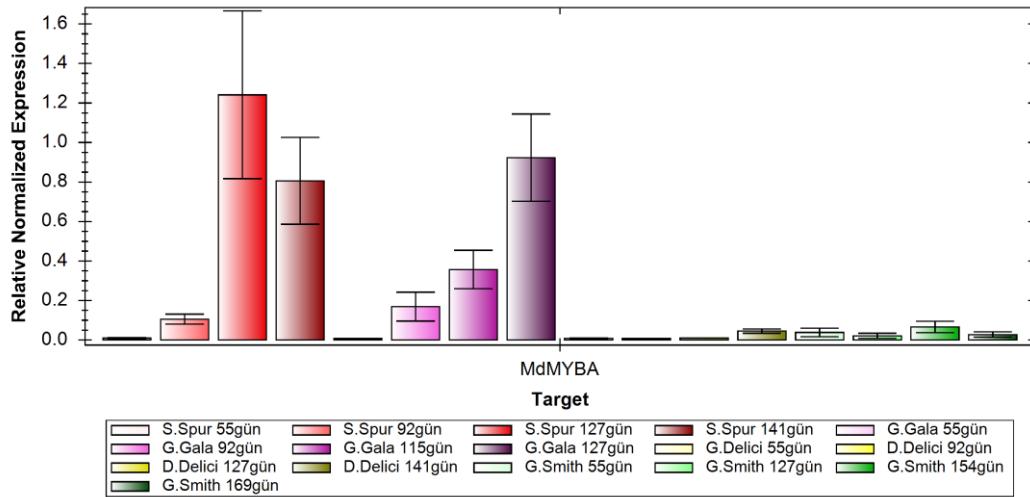


Şekil 4.7. *MdMYB10* geninin real-time PCR sonuçları (S.Spur: Scarlet Spur, G. Gala: Galaxy Gala, G. Delici: Golden Delicious, G. Smith: Granny Smith)

Bir diğ er gen olan *MdMYBA* geninin ifade düzeyi yine aynı elma çeşitlerinin farklı olgunlaş ma dönemlerinde incelenmiştir. Bu genin ifade düzeyi koyu kırmızı kabuk rengine sahip Scarlet Spur elma çeşidinde tam çiçeklenmeden 92 gün sonra artmaya başlamış, 127 gün sonra maksimum seviyesine ulaşmış ve hasat dönemine doğru azalma göstermiştir (Şekil 4.8).

Sarı üstüne kırmızı rene sahip bir çeşit olan Galaxy Gala çeşidinde ise *MdMYBA* geninin ifadesinin olgunlaş mayla beraber arttığı ve hasat döneminde ise genin ifadesinin maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).

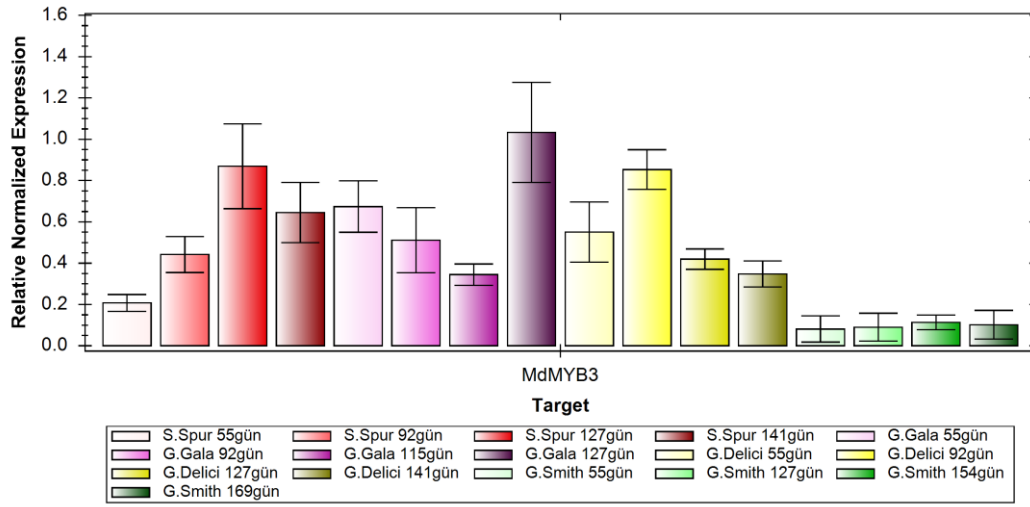
Sarı renkli Golden Delicious ve yeş il kabuk renkli Granny Smith çeşitlerinde ise *MdMYBA* geninin ifadesinin yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *MdMYBA* geninin real-time PCR sonuçları (S.Spur: Scarlet Spur, G. Gala: Galaxy Gala, G. Delici: Golden Delicious, G. Smith: Granny Smith)

Çalışmada kullanılan üçüncü ve sonuncu gen olan *MdMYB3* geninin ifadesinin ise farklı yoğunlukta kırmızı rene sahip iki elma çeşidinde ve sarı renkli elma çeşidinde olgunlaş mayla artışın olduğu ancak artışın belli bir düzen içerisinde olmadığı gözlemlenmiştir. Kırmızı kabuk renkli Scarlet Spur elma çeşidinde *MdMYB3* geninin ifadesinin tam çiçeklenmeden itibaren artış gösterdiği tam çiçeklenmeden 127 gün sonra maksimum seviyesine ulaştığı ve hasat zamanında ise bu genin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Sarı üstüne kırmızı

renkli Galaxy Gala çeşidinde ise *MdMYB3* geninin ifadesinin ham meyveden hasat önu meyvesine kadar az da olsa azaldığı ama daha sonra hasat dönemindeki meyvelerde en yüksek seviyeye ulaştığı sonucuna varılmıştır. Çalışılan diğer genlerden farklı olarak *MdMYB3* geni sarı renkli Golden Delicious çeşidinde de oldukça yüksek düzeyde ifade edilmiştir. Ancak bu genin ifadesi meyve olgunlaşmasıyla birlikte azalma göstermiştir. Yeşil kabuk rengine sahip Granny Smith çeşidinde ise genin ifadesi yok denecek kadar az seviyede gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *MdMYB3* geninin real-time PCR sonuçları (S.Spur: Scarlet Spur, G. Gala: Galaxy Gala, G. Delici: Golden Delicious, G. Smith: Granny Smith)

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada; Isparta İli Eğirdir İlçesi Kızılcubuk Mahallesi'nde bulunan elma bahçesinden farklı kabuk rengi özelliğine sahip dört elma çeşidi seçilmiş ve bu elma çeşitlerinin farklı olgunlaşma dönemlerinde antosiyanin biyosentezinde görev alan MYB TF'lerinden bazılarının ifade düzeylerine bakılmıştır.

MdMYB10 TF'nün elmalarda renklenmedeki rolleri üzerine yapılan bu çalışmada bu genin kırmızı renkli çeşitlerde ifade edildiği ve meyve olgunlaşmasıyla birlikte ifadesinde artışlar olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca bu genin ifade düzeyinin koyu kırmızı kabuklu elma çeşidinde, açık kırmızı kabuklu elma çeşidine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Telias vd. (2011) de bu çalışmaya benzer sonuçlar almışlar ve *MdMYB10* geninin ifadesinin; kırmızı renkli 'Honeycrisp' elma çeşidinde, yeşil renkli 'Royal Gala' elma çeşidine göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmalar *MdMYB10* geninin elmalarda kırmızı renk oluşumunda etkili bir gen olduğunu göstermektedir. *MdMYB10* geninin renklenmeyle olan ilişkisini belirlemek için yapılan çalışmalar elma ile sınırlı kalmamıştır. Farklı meyve türlerinde de bu konu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Palapol vd. (2009) hızlı renklenen mangostan meyvesinde yapmış oldukları çalışmada *GmMYB10* geninin ekspresyon düzeyine olgun yeşil meyveden başlayarak (0. gün) ilk 6 günde hem ağaçtaki hem de toplanmış meyvelerde real-time PCR yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda *GmMYB10* geninin ekspresyonunun renklenmeyle birlikte arttığı gözlemlenmiş ve bu genin antosiyanin biyosentezini teşvik edici özellikte olduğu belirlenmiştir. Armutta Pierantoni vd. (2010)'nin yaptığı çalışmada *MYB10* geninin hem sarı hem de kırmızı armutta anlatımının yapıldığı gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise kirazda Lin-Wang vd. (2010) *MYB10* geninin anlatımının kırmızılıkla birlikte arttığı kanıtlanmışlardır. Pierantoni vd. (2010)'nin yaptığı çalışma ile yapılan bu çalışma karşılaştırıldığında ise *MYB10* geninin ifadesinin meyve çeşidine göre farklılık gösterebileceği düşünülmektedir. Feng vd. (2015) *PyMYB10* geninin ekspresyon seviyesini armutta yaprak, çiçek ve meyve kabuğu ve etinde real-time PCR yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. İncelenen farklı dokularda

PyMYB10 geninin ifadesinin kırmızı dokularda kırmızı olmayan dokulara göre fazla düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. Kirazda yapılan bir diğer çalışmada ise; kiraz meyvelerinde sarıdan kırmızıya doğru renklenmenin artmasıyla *PavMYB10.1* geninin ifadesinin de arttığı real-time PCR yöntemiyle belirlenmiştir (Jin vd., 2016). Ayrıca 2017 yılında yaban elmasında yapılan bir çalışmada ise yeşil elma çeşidi 'Flame' ve kırmızı elma çeşidi 'Royalty' arasında olgunlaşmayla birlikte *McMYB10* geninin ifade düzeyindeki farklılıklar incelenmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda *McMYB10* geninin ifadesinin kırmızı elma çeşidinde meyve olgunlaşmasıyla ve antosiyanin birikimiyle orantılı olarak arttığı ancak, yeşil elma çeşidinde ifadesinin değişmediği gözlemlenmiştir (Lu vd., 2017). Yukarıda açıklanan pek çok çalışma *MYB10* TF'nün kırmızı renklenme üzerinde oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Farklı renkte renklenme gösteren elma çeşitlerinde MYB TF'lerinin rollerinin araştırıldığı bu çalışmada, *MdMYBA* geninin ifade düzeyi meyve olgunlaşmasının farklı dönemlerinde incelenmiştir. *MdMYBA* geni ilk olarak açık kırmızı renkli meyvelere sahip 'Tsugaru' elma çeşidinden izole edilmiştir (Ban vd., 2007). Ban vd. (2007) *MdMYBA* geninin ifadesinin koyu kırmızı renkli Jonathan elma çeşidinde açık kırmızı renkli Tsugaru elma çeşidine göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada da *MdMYBA* geninin ifadesinin koyu kırmızı kabuklu Scarlet Spur elma çeşidinde sarı zemin üstüne kırmızı renge sahip olan Galaxy Gala elma çeşidine göre az da olsa daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *MdMYBA* geninin ifadesinin sarı ve yeşil kabuklu çeşitlerde az olarak belirlenmesi, bu genin kırmızı renklenmede ve dolayısıyla da antosiyanin birikiminde oldukça etkili bir gen olduğunu göstermiştir. *MYBA* geniyle ilgili olarak diğer meyvelerde yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte Kobayashi vd. (2002) asmada yaptıkları bir çalışmada kırmızımsı morumsu meyveye sahip Kyoho asma çeşidinde *VvMYBA* geninin ekspresyonunun olgunlaşmayla birlikte arttığını Northern Blot analiziyle belirlemişlerdir. *MYBA* geni ile ilgili olarak yapılan bu çalışmalar *MYBA* TF'nün renklenmede etkili olduğunu göstermiştir. Ancak bu genle ilgili daha fazla bilgi edinebilmek ve renklenme üzerine olan etkilerini

belirleyebilmek amacıyla daha birçok çalışmanın yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

MYB TF'nün elmalarda renklenmede rollerinin araştırıldığı bu çalışmada kullanılan diğer bir gen *MdMYB3* geni Vimolmangkang vd. (2013) tarafından izole edilmiştir. Bu genin Red Delicious ve Golden Delicious elma çeşitlerinde ifade düzeyleri incelenmiştir. Red Delicious'ta genin ifadesinin tam çiçeklenmeden 104 gün sonra en yüksek seviyeye ulaştığı ve bu günden sonra azalıp artan bir grafik çizdiği gözlemlenmiştir. Bunun yanında *MdMYB3* geni Golden Delicious elma çeşidinde de ifade edilmiş ve bu çeşitteki ifadesi tam çiçeklenmeden 44 gün sonra gözlemlenmiştir. Ancak genin ifade düzeyinin, kırmızı bir çeşit olan Red Delicious ve sarı renkli bir çeşit olan Golden Delicious arasında oldukça farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Red Delicious çeşidinde genin ifade düzeyi Golden Delicious'takine göre neredeyse 4 kat fazla olarak tespit edilmiştir. Bunun nedeninin ise *MdMYB3* geninin antosiyanin biyosentezi sırasında üst basamaklarda görevli enzimlerin aktivasyonunu sağlaması ancak alt basamaklardaki enzimlerin çalışmasını etkilememesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Vimolmangkang vd., 2013). Ayrıca bu genin ifadesine; içinde kırmızı renkli Gala ve sarı renkli Golden Delicious da bulunan 10 farklı elma çeşidinde bakılmış ve kırmızı kabuk rengine sahip elmalarda oldukça yüksek seviyelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Buna karşı kırmızı kabuk rengine sahip olmayan elmalarda genin ifadesi oldukça düşük olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar yakından incelendiğinde ise sarı renkli Golden Delicious elma çeşidinde diğer kırmızı kabuk rengine sahip olmayan çeşitlere göre *MdMYB3* geninin daha fazla ifade edildiği farkedilmektedir. Fakat bu çeşitteki ifade düzeyi kırmızı kabuk rengine sahip çeşitlere kıyasla çok daha azdır (Vimolmangkang vd., 2013). Yapılan bu çalışmada ise *MdMYB3* TF'nün, farklı elma çeşitlerinde yapılan analizlerinde; bu genin kırmızı renkli çeşitlerle birlikte sarı renkli çeşitte de ifade edildiği belirlenmiştir. Koyu kırmızı renkli olan Scarlet Spur elma çeşidinde, *MdMYB3* geninin ifadesi tam çiçeklenmeden 127 gün sonra en yüksek seviyeye ulaşmış ve ardından azalan bir grafik çizmiştir. Diğer bir kırmızı çeşit olan Galaxy Gala'da ise genin ifadesi önce azalmış ancak meyvenin en olgun döneminde (tam çiçeklenmeden 127 gün sonra) en yüksek

seviyeye ulaşmıştır. *MdMYB3* geni çalışmadaki diğer genlerin aksine sarı renkli elma çeşidi olan Golden Delicious'ta da ifade edilmiştir. Ancak kırmızı renkli çeşitlerin aksine, bu genin ifadesi sarı renkli çeşitte azalan bir grafik vermiştir. Bu sonuç da bu genin kırmızı renklenmede ve antosiyanin oluşumunda görev alabileceği sonucunu doğurmuştur ancak sarı renkli Golden Delicious çeşidinde ifade edilmesinden dolayı bu genin antosiyanin biyosenteziyle birlikte başka bir flavonoid sentezinde de görev alabileceği ve bu yüzden sarı renkli çeşitte de ifade edilebileceği belirlenmiştir. *MYB3* geniyle ilgili yapılmış çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bu genin renklenme üzerindeki etkisiyle ilgili olarak farklı meyveler üzerinde yapılmış fazla çalışma bulunmamakla birlikte centiyan bitkisinde (Nakatsuka vd., 2009) ve yer fıstığında (Wan vd., 2016) yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Centiyan bitkisinde yapılan çalışmada; antosiyanin ürünlerinin birikimiyle oluşan mavi renkli çiçekli ve ayrıca beyaz renkli çiçekli bitkiler arasındaki *GtMYB3* geninin ekspresyonundaki farklılıklar incelenmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda mavi renkli çiçeklerde *GtMYB3* geninin ekspresyonunun beyaz renkli çiçeklere göre daha yüksek olduğu ve mavi renkli çiçekli centiyanlarda olgunlaşmayla birlikte bu genin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar *GtMYB3* geninin antosiyanin birikimiyle ve renklenmeyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Nakatsuka vd., 2009). Wan vd. (2016) mutant yer fıstığında yaptıkları bir çalışmada tohum kabuğundaki kahverengi rengin oluşmasına neden olduğu düşünülen *MYB3* geninin ekspresyon düzeyini araştırmışlardır. Yer fıstığında yapılan real-time PCR çalışmalarında beyaz tohum kabuğuna sahip yabani tip ve kahverengi tohum kabuğuna sahip mutant yer fıstığı arasında ekspresyon düzeyleri karşılaştırmıştır. *MYB3* geninin ekspresyon düzeyinin beyaz tohum kabuğuna sahip yabani fıstıkta kahverengi tohum kabuğuna sahip mutant yer fıstığına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bize *MYB3* geninin antosiyanin biyosentezinde rolünün tam olarak tespit edilmesi amacıyla farklı meyvelerde daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Elmada kırmızı rengin insanlara gelen çekici özelliği ve bu kırmızı rengin kaynağı olan antosiyaninlerin insan sağlığı açısından önemli bileşenler olması

nedeniyle, daha kırmızı renkte olan elmaların elde edilmesi elma ıslahında önemlidir. Yapılan tüm bu çalışmalarla elmalarda antosiyanin birikimini ve kırmızı renklenmeyi etkileyen genlerin nasıl çalıştığıyla ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. MdMYB10 ve MdMYBA TF'nin elmalarda kırmızı renklenme üzerine etkilerinin olduğu bu çalışmayla da gösterilmiştir. Bununla birlikte *MdMYB3* geninin elmalarda kırmızı renklenme üzerine etkisinin olduğu anlaşılmış olmakla birlikte bu konuda daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bugüne kadar elmalarda renklenme üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalardan görülmüştür ki elmalarda renklenmeyi etkileyen pek çok etmen ve birçok gen bulunmaktadır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarla daha çekici ve antosiyanince daha zengin elmalar elde edebilmek için gerekli olan genler araştırılmalı ve bu genler tespit edildikten sonra istenen özelliklere sahip elmaların ıslahıyla ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Bu çalışmalara benzer çalışmaların ileride devam etmesiyle, elmada renklenmenin nasıl düzenlendiğine dair çok daha fazla bilginin elde edilmesi mümkündür.

KAYNAKLAR

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D., Shinozaki K., 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB Homologs in Drought and Abscisic Acid Regulated Gene Expression. *Plant Cell*, 9, 1859–1868.
- Aharoni, A., Ric De Vos, C.H., Wein, M., Sun, Z.K., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.M.N., Connell, A.P.O., 2001. The Strawberry FaMYB1 Transcription Factor Suppresses Anthocyanin and Flavonol Accumulation in Transgenic Tobacco. *Plant Journal*, 28(3), 319-332.
- Akbaşı, İ.T., 2013. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Ahmet Yesevi Üniversitesi Dergisi*, 1-2.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., Yadav, R.C., 2013. MYB Transcription Factor Genes as Regulators for Plant Responses: An Overview. *Physiol Molecular Biology Plants*, 19(3), 307-312.
- Avial, J., Nieto, C., Canas, L.A., Paz-Ares, J., 1993. *Petunia hybrida* Genes Related to the Maize Regulatory C1 Gene and To Animal MYB Proto-oncogenes. *Plant Journal*, 3, 553-562.
- Ata, M.Y., 2013. Mikroorganizmalarda Pigment Üretimi ve Eczacılıkta Kullanımı. Erciyes Üniversitesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bitirme Ödevi, 60, Kayseri.
- Aza-González, C., Núñez-Paleniús, H.G., Ochoa-Alejo, N., 2012. Molecular Biology of Chili Pepper Anthocyanin Biosynthesis. *Journal of Mexican Chemical Society*, 56(1), 93-98.
- Bai, S., Tuan, P.A., Saito, T., Honda, C., Hatsuyama, Y., Ito, A., Moriguchi, T., 2016. Epigenetic Regulation of MdMYB1 is Associated With Paper Bagging-Induced Red Pigmentation of Apples. *Planta*, 244(3), 573-586.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Ban, Y., Honda, C., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., Bessho, H., Moriguchi, T., 2007. Isolation and Functional Analysis of a MYB Transcription Factor Gene That is a Key Regulator for the Development of Red Coloration in Apple Skin. *Plant Cell Physiology*, 48(7), 958-970.
- Battersby, A.R., Fookes, C.J., Matcham, G.W., McDonald, E., 1980. Biosynthesis of The Pigments of Life: Formation of The Macrocyclic. *Nature*, 285, 17–21.
- Baumann, K., Perez-Rodriguez, M., Bradley, D., Venail, J., Bailey, P., Jin, H., Koes, R., Roberts, K. and Martin, C., 2007. Control of Cell and Petal

- Morphogenesis by R2R3 MYB Transcription Factors. *Development*, 134, 1691–1701.
- Baysal, T., Ersus, S., 1999. Karotenoidler ve İnsan Sağlığı. *GIDA*, 24(3), 177-185.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., Lamb, C., 2000. Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell*, 12, 2383–2393.
- Brownfield, L., Hafidh, S., Borg, M., Sidorova, A., Mori, T., Twell, D., 2009. A Plant Germline-Specific Integrator of Sperm Specification and Cell Cycle Progression. *PLoS Genetics*, 5(3), 1-10.
- Brzezowski, P., Richter, A.S., Grimm, A., 2015. Regulation and Function of Tetrapyrrole Biosynthesis in Plants and Algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847, 968–985.
- Bureau, S., Renard, K.M.G.C., Reich, M., Ginies, C., Audergon, J.M., 2009. Change in Anthocyanin Concentrations in Red Apricot Fruits During Ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 372–377.
- Changé, D., Carlisle, C.M., Blond, C., Volz, R.K., Whitworth, C.J., Oraguzie, N.C., Crowhurst, R.N., Allan, A.C., Espley, R.V., Hellens, R.P., Gardiner, S.E., 2007. Mapping a Candidate Gene (*MdMYB19*) For Flesh and Foliage Colour in Apple. *BMG Genomics*, 212(8), 1-11.
- Chagné, D., Lin-Wang, K., Espley, R.V., Volz, R.K., How, N.M., Rouse, S., Brendolise, C., Carlisle, C.M., Kumar, S., De Silva, N., Micheletti, D., Mcghe, D., Crowhurst, R.N., Storey, R.D., Velasco, R., Hellens, R.P., Gardiner, S.E., Allan, A.C., 2013. An Ancient Duplication of Apple MYB Transcription Factors is Responsible For Novel Red Fruit-Flesh Phenotypes. *Plant Physiology*, 161, 225-239.
- Chen, R., Ni, Z., Nie, X., Qin, Y., Dong, G., Sun, Q., 2005. Isolation and Characterization of Genes Encoding MYB Transcription Factor in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 169, 1146–1154.
- Cheng, F.S., Weeden, N.F., Brown, S.K., 1996. Identification of Co-dominant RAPD Markers Tightly Linked To Fruit Skin Colour in Apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 222-227.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S., 2002. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions Between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129, 661–677.
- Churin, Y., Adam, E., Kozma-Bognar, L., Nagy, F., Börner, T., 2003. Characterization of Two MYB-Like Transcription Factors Binding to CAB Promoters in Wheat and Barley. *Plant Molecular Biology*, 52(2), 447-462.

- Collett, L., 2011. About The Apple – *Malus domestica*. Compiled, 1-8.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L., Tonelli, C., 2005. A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Curr Biology*, 15(13), 1196-1200.
- Cotroneo, P.S., Russo, M.P., Ciuni, M., Recupero, G.R., 2006. Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase-PCR Profiling of Anthocyanin Biosynthetic Genes During Orange Fruit Ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(4), 537-543.
- Curtin, C., Zhang, W., Franco, C., 2003. Manipulating Anthocyanin Composition in *Vitis vinifera* Suspension Cultures by Elicitation with Jasmonic Acid and Light Irritation. *Biotechnology Letters*, 25(14), 1131-1135.
- Czemmel, S., Stracke, R., Weisshaar, B., Cordon, N., Harris, N.N., Walker, A.R., Robinson, S.P., Bogs, J., 2009. The Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor VvMYBf1 Regulates Flavonol Synthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology*, 151, 1513–1530.
- Çetin, E.S., Göktürk Baydar, N., 2014. Elicitor Applications to Cell Suspension Culture for Production of Phenolic Compounds in Grapevine. *Journal of Agricultural Sciences*, 22, 42-53.
- Dai, X., Wang, Y., Yang, A., Zhang, W.H., 2012. OsMYB2P-1, An R2R3 MYB Transcription Factor, is Involved in The Regulation of Phosphate-Starvation Responses and Root Architecture in Rice. *Plant Physiology*, 159, 169–183.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, Dietary Sources and Bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348–361.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Me´rillon, J.M., Hamdi, S., 2006. Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*, 140, 499–511.
- Deluc, L., Bogs, J., Walker, A.R., Ferrier, T., Decendit, A., Merillon, J.M., Robinson, S.P., Barrieu, F., 2008. The Transcription Factor VvMYB5b Contributes to the Regulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology*, 147, 2041-2053.
- Docimo, T., Francese, G., Ruggiero, A., Batelli, G., De Palma, M., Bassolino, L., Toppino, L., Rotino, G.L., Mennella, G., Tucci, M., 2016. Phenylpropanoids Accumulation in Eggplant Fruit: Characterization of Biosynthetic Genes and Regulation by a MYB Transcription Factor. *Frontier Plant Science*, 6(1233), 1-18.

- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X., Yang, W., Wu, Y., Huang, Y., Tang, Y., 2009. Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. *Biochemistry*, 74, 1-11.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L., 2010. MYB Transcription Factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15, 573-581.
- Espley, R.V., Hellens, R.P., Putterill, J., Stevenson, D.E., Kutty-Amma, S., Allan, A.C., 2007. Red Coloration in Apple Fruit is Due To The Activity of The MYB Transcription Factor, MdMYB10. *The Plant Journal*, 49, 414-427
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E.L., Grotewold, E., 2011. Evolutionary and Comparative Analysis of MYB and bHLH Plant Transcription Factors. *The Plant Journal*, 66, 94-116.
- Feng, S., Chen, X., Zhang, C., Liu, X., Liu, Z., Wang, H., Wang, Y., Zhou, C., 2008. Relationship Between Anthocyanin Biosynthesis and Related Enzymes Activity in *Pyrus pyrifolia* Mantianhong and Its Bud Sports Aoguan. *Agricultural Sciences in China*, 7(11), 1318-1323.
- Feng, S.Q., Wang, Y.L., Yang, S., Xu, Y.T., Chen, X.S., 2010. Anthocyanin Biosynthesis in Pears is Regulated by A R2R3-MYB Transcription Factor PyMYB10. *Planta*, 232, 245-255.
- Feng, S., Sun, S., Chen, X., Wu, S., Wang, D., Chen, X., 2015. PyMYB10 and PyMYB10.1 Interact with bHLH to Enhance Anthocyanin Accumulation in Pears. *PLoS ONE*, 10(11), 1-16.
- Food and Agriculture Organization Of The United Nations (FAOSTAT), 2014. Ülkelere Göre Elma Üretim Miktarları. Erişim Tarihi: 21.10.2016. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- Foos, G., Grimm, S., Klempnauer, K.H., 1992. Functional Antagonism Between Members of The MYB Family: B-MYB Inhibits v-MYB-Induced Gene Activation. *The EMBO Journal*, 11, 4619-4629.
- Franceschi, V.R., Grimes, H.D., 1991. Induction of Soybean Vegetative Storage Proteins and Anthocyanins by Low-Level Atmospheric Methyl Jasmonate. *Plant Biology*, 88, 6745-6749.
- Geffer, R., Wingender, E., 2015. Gene Regulation Controlled By MYB Related Factors in Plants. Erişim Tarihi: 22.09.2015. gene-regulation.com/info/plant.html
- Gläßgen, W.E., Rose, A., Madlung, J., Koch, W., Gleitz, J., Seitz, H.U., 1998. Regulation Of Enzymes Involved In Anthocyanin Biosynthesis In Carrot

Cell Cultures In Response To Treatment With Ultraviolet Light And Fungal Elicitors. *Planta*, 204, 490-498.

Golay, J., Basílico, L., Loffarelli, L., Songia, S., Broccoli, V., Introna, M., 1996. Regulation of Hematopoietic Cell Proliferation and Differentiation by The MYB Oncogene Family of Transcription Factors. *International Journal of Clinic and Laboratory Research*, 26(1), 24–32.

Golden Rice Project, 2005. Metabolic Engineering. Erişim Tarihi: 16.08.2016. http://www.goldenrice.org/Content2-How/how1_sci.php

Gonzalez, S., Mazzucato, A., Perata, P., 2009. Purple as a Tomato, Towards High Anthocyanin Tomatoes. *Trends in Plant Science*, 14, 237-241.

Grotewold, E., Athma, P., Peterson, T., 1991. Alternatively Spliced Product of The *Mazie P* Gene Encode Proteins with Homology to The DNA Binding Domain of MYB-Like Transcription Factors. *Proceeding of The National Academy of Science*, 88, 4587-4591.

Großkinsky, D.K., Graaff, E., Roitsch, T., 2012. Phytoalexin Transgenics in Crop Protection—Fairy Tale with a Happy End?. *Plant Science*, 195(2012) 54–70.

Gül, M., Akpınar, M.G., 2006. Dünya ve Türkiye Meyve Üretimindeki Gelişmelerin İncelenmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1), 15-27.

Hall, W.J., Bean C.W., Pollard, M., 1941. Transmission of Fowl Leucosis Through Chick Embryos and Young Chicks. *American Journal of Veterinary Research*, 2, 272–279.

Hepsağ, F., Hayoğlu, İ., Hepsağ, B., 2012. Karadut Meyvesinin Antosiyanin İçeriği ve Antosiyaninlerin Gıda Sanayinde Renk Maddesi Olarak Kullanım Olanakları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 9-19.

Holton, T.A., Cornish, E.C., 1995. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1071-1083.

Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., Yamazaki, T., 2002. Molecular Structure of The GARP Family of Plant MYB-Related DNA Binding Motifs of The Arabidopsis Response Regulators. *Plant Cell*, 14, 2015–2029.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2009. A Critical Review of Methods For Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables. *Food Chemistry*, 126(2011), 1821–1835.

Irchhaiya, R., Kumar, A., Yadav, A., Gupta, N., Kumar, S., Gupta, N., Kumar, S., Yadav, V., Prakash, A., Gurjar, H., 2014. Metabolites in Plants and Its

Classification. World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, 4(1), 287-305.

- Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A.M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., Hohtola, A., 2002. Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in Relation to Anthocyanin, Proanthocyanidin, and Flavonol Levels during Bilberry Fruit Development. *Plant Physiol*, 130(2). 729–739.
- Jaakola, L., Poole, M., Jones, M.O., Karppinen, T.K., Koskimmäki, J.J., Hohtola, A., Häggman, H., Fraser, P.D., Manning, K., King, G.J., Thomson, H., Seymour, G.B., 2010. A Squamosa MADS Box Gene Involved in The Regulation Of Anthocyanin Accumulation in Bilberry Fruit. *Plant Physiology*, 153, 1619-1629.
- Jaakola, L., 2013. New Insights into the Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Fruits. *Trends in Plant Science*, 18(9), 477-483.
- Jackson, D., Culianez-Macia, F., Prescott, A.G., Roberts, K., Martin, C., 1991. Expression Patterns of MYB Genes From *Antirrhinum* Flowers. *Plant Cell*, 3, 115-125.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R.F., Octavianti, F., 2011. Carotenoids: Sources, Medicinal Properties and Their Application in Food and Nutraceutical Industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), 7119-7131.
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., Esaka, M., 2004. Effects of Plant Hormones and Shading on the Accumulation of Anthocyanins and The Expression of Anthocyanin Biosynthetic Genes in Grape Berry Skins. *Plant Science*, 167, 247–252.
- Jia, L., Clegg, M.T., Jiang, T., 2004. Evolutionary Dynamics of The DNA-binding Domains in Putative R2R3-MYB Genes Identified From Rice Subspecies *indica* and *japonica* Genomes. *Plant Physiology*, 134, 575-585.
- Jin, W., Wang, H., Li, M., Wang, J., Yang, Y., Zhang, X., 2016. The R2R3 MYB Transcription Factor PavMYB10.1 Involves in Anthocyanin Biosynthesis and Determines Fruit Skin Colour in Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Biotechnology*, 14, 2120–2133.
- Johnson, E.T., Dowd, P.F., 2004. Differentially Enhanced Insect Resistance, At a Cost, in *Arabidopsis thaliana* Constitutively Expressing a Transcription Factor of Defensive Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5135–5138.
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R., He, X., 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2014), 377-392.

- Kanei-Ishii, C., Sarai, A., Sawazaki, T., Nakagoshi, H., He, D.N., Ogata, K., Nishimura, Y., Ishii, S., 1990. The Tryptophan Cluster: A Hypothetical Structure of The DNA-binding Domain of The MYB Protooncogene Product. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 19990-19995.
- Kim, S., Lee, J., Hong, S., Yoo, Y., An, G., Kim, S., 2003. Molecular Cloning and Analysis of Anthocyanin Biosynthesis Genes Preferentially Expressed in Apple Skin. *Plant Science*, 165(2), 403-413.
- Kobayashi, S., Ishimaru M., Hiraoka K., Honda C., 2002. MYB-Related Genes of The Kyoho Grape (*Vitis Labruscana*) Regulate Anthocyanin Biosynthesis. *Planta*, 215, 924-933.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., 1994. The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: Function and Evolution. *BioEssays*, 16, 123-132.
- Koes, R., Verweij, W., Quattrocchio, F., 2005. Flavonoids: A Colorful Model For The Regulation and Evolution of Biochemical Pathways. *Trends in Plant Science*, 10(5), 236-242.
- Koyuncu, M.A., Erbaş, D., 2013. Scarlet Spur Elma Çeşidinin Normal ve Kontrollü Atmosfer Koşullarında Depolanması. *Anadolu Tarım Bilim Dergisi*, 28(2), 71-76.
- Lee, D.K., Geisler, M., Springer, P.S., 2009. LATERAL ORGAN FUSION1 and LATERAL ORGAN FUSION2 Function in Lateral Organ Separation and Axillary Meristem Formation in Arabidopsis. *Development*, 136(14), 2423-2432.
- Lee, M.M., Schiefelbein, J., 1999. WEREWOLF, A MYB Related Protein in Arabidopsis, is a Position Dependent Regulator of Epidermal Cell Patterning. *Cell*, 99, 473-483.
- Li, Y., Mao, K., Zhao, C. Zhao, X., Zhang, H., Shu, H., Hao, Y., 2012. Mdcop1 Ubiquitin E3 Ligases Interact with MdMYB1 to Regulate Ligh-Induced Anthocyanin Biosynthesis and Red Fruit Coloration in Apple. *Plant Physiology*, 160, 1011-1022.
- Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T.K., Espley, R.V., Hellens, R.P., Allan, A.C., 2010. An R2R3 MYB Trancription Factor Associated with Regulation of the Anthocyanin Biosynthesis Pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*, 10(50), 1-17.
- Liu, J., Osbourn, A., Ma, P., 2015. MYB Transcription Factors As Regulators Of Phenylpropanoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8, 689-708.
- Lu, S.X., Knowles, S.M., Andronis, C., Ong, M.S., Tobin, E.M., 2009. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL Function

- Synergistically in The Circadian Clock of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 150, 834–843.
- Lu, Y., Hao, S., Bu, S., Yang, S., Zhang, J., Liu, L., Yao, Y., 2017. McMYB10 Regulates Anthocyanins and Quercetin Accumulation During The Fruit Development of Crabapples. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(4), 358–366.
- Luscher, B., Eisenman, R.N., 1990. New light on Myc and MYB. II. MYB. *Genes and Development*, 2, 2235–2241.
- Mahmoud, S.S., Croteau, R.B., 2002. Strategies For Transgenic Manipulation Of Monoterpene Biosynthesis in Plants. *Trends in Plant Science*, 7, 366-373.
- Mahmaudi, E., Soltani, B.M., Yadollahi, A., Hosseini, E., 2012. Independence of Color Intensity Variation in Red Flesh Apples From The Number of Repeat Units in Promoter Region of The *MdMYB10* Gene as an Allele to *MdMYB1* and *MdMYBA*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(3), 153-160.
- Marocco, A., Wissenbach, M., Becker, D., Paz-Ares, J., Saedler, H., Salami, F., Rohde, W., 1989. Multiple Genes are Transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* That Carry The DNA-binding Domain of The MYB Oncoproteins. *Molecular and General Genetics*, 216, 183-187.
- Martin, C., Paz-Ares, J., 1997. MYB Transcription Factors in Plants. *Trends Genetic*, 13, 67-73.
- Matsui A., Ishida J., Morosawa T., Mochizuki Y., Kaminuma E., Endo T.A., Okamoto M., Nambara E., Nakajima M., Kawashima M., Satou M., Kim J.M., Kobayashi N., Toyoda T., Shinozaki K., Seki M., 2008. Arabidopsis Transcriptome Analysis Under Drought, Cold, High-Salinity and ABA Treatment Conditions Using A Tiling Array. *Plant Cell Physiology*, 49(8), 1135-1146.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., Weisshaar, B., 2005. The Arabidopsis Transcription Factor MYB12 is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 138, 1083–1096.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A., 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with The Environment. *Molecules*, 19, 16240-16265.
- Millar, A.A., Gubler, F., 2005. The Arabidopsis *GAMYB*-Like Genes, *MYB33* And *MYB65*, are MicroRNA-Regulated Genes that Redundantly Facilitate Anther Development. *Plant Cell*, 17, 705–721.
- Milli Eğitim Bakanlığı (MEB), 2011. Bahçe Bitkileri. Erişim Tarihi: 23.09.2016. http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Bah%C3%A7e%20Bitkileri.pdf

- Moyano, E., Martinez-Garcia, J.F., and Martin, C., 1996. Apparent Redundancy in MYB Gene Function Provides Gearing For The Control of Flavonoid Biosynthesis in *Antirrhinum* Flowers. *Plant Cell*, 8, 1519–1532.
- Muthamilarasan, M., Khandelwan, R., Yadav, C.B., Bonthala, V.S., Khan, Y., Prasad, M., 2014. Identification and Molecular Characterization of MYB Transcription Factor Superfamily in C4 Model Plant Foxtail Millet (*Setaria italica* L.). *Plos One*, 9, 1-14.
- Nakata, Y., Shetzline, S., Sakashita, C., Kalota, A., Rallapalli, R., Rudnick, S.I., Zhang, Y., Emerson, S.G., Gewirtz, A.M., 2007. c-MYB Contributes To G2/M Cell Cycle Transition In Human Hematopoietic Cells By Direct Regulation Of Cyclin B1 Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2048-2058.
- Nakatsuka, T., Haruta, K.S., Pitaksutheepong, C., Abe, Y., Kakizaki, Y., Yamamoto, K., Shimada, N., Yamamura, S., Nishihara, M., 2009. Identification and Characterization of R2R3-MYB and bHLH Transcription Factors Regulating Anthocyanin Biosynthesis in Gentian Flowers. *Plant Cell Physiology*, 49(12), 1818–1829.
- Niu, S.S., Xu, C.J., Zhang, W.S., Zhang, B., Li, X., Lin-Wang, K., Ferguson, I.B., Allan, A.C., Chen, K.S., 2010. Coordinated Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Chinese Bayberry (*Myrica rubra*) Fruit by a R2R3 MYB Transcription Factor. *Planta*, 231, 887–899.
- Noda, K.I., Glover, B.J., Lindstead, P., Martin, C., 1994. Flower Colour Intensity Depends on Specialized Cell Shape Controlled by a MYB-related Transcription Factor. *Nature*, 369, 661-664.
- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, N., Sarai, A., 1996. The Cavity in The Hydrophobic Core of MYB DNA Binding Domain is Reserved For DNA Recognition and Trans-Activation. *Nature Structural Biology*, 3, 178–818.
- Oğuz, C., Karaçayır, H.F., 2009. Türkiye’de Elma Üretimi, Tüketimi, Pazar Yapısı ve Dış Ticareti. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2(1), 41-49.
- Oskay, D., Oskay, M., 2009. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi. *Journal of New World Sciences Academy*, 4(2), 1306-3111.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L. Sivakuaran, S., Esch, J., Marks, M.D., 1991. A MYB Gene Required For Leaf Trichome Differentiation in Arabidopsis is Expressed in Stipules. *Cell*, 67, 483-493.
- Ortega-Rodés, P., Grimm, B., Ortega, E., 2014. Evolutionary, Physiological and Biotechnological Aspects of Ferrochelatase and Heme in Higher Plants. *Bioteconología Aplicada*, 31:176-186.

- Palapol, Y., Ketsa, S., Lin-Wang, K., Ferguson, I.B., Allan, A.C., 2009. A MYB Transcription Factor Regulates Anthocyanin Biosynthesis in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Fruit During Ripening. *Planta*, 229, 1323–1334.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., Saedler, H., 1987. The Regulatory C1 Locus in *Zea mays* Encodes a Protein with Homology to MYB Proto-oncogene Products and with Structural Similarities to Transcriptional Activators. *The EMBO Journal*, 6, 3553-3558.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A.M., Fischer, M., 2009. Breeding Apple (*Malus Domestica* Borkh). *Breeding Plantation Tree Crops. Temperate Species*, 10, 33-82.
- Pierantoni, L., Dondini, L., De Franceschi, P., Musacchi, S., Winkel, B.S.J., Sansavini, S., 2010. Mapping of an Anthocyanin-Regulating MYB Transcription Factor and Its Expression in Red and Green Pear, *Pyrus communis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 1020-1026.
- Piero, A.R.L., Puglisi, I., Rapisarda, P., Petrone, G., 2005. Anthocyanins Accumulation and Related Gene Expression in Red Orange Fruit Induced by Low Temperature Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9083–9088.
- Pirie, A., Mullins, M.G., 1976. Changes in Anthocyanin and Phenolics Content of Grapevine Leaf and Fruit Tissues Treated with Sucrose, Nitrate, and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 58, 468-472.
- Qu J.G., Zhang, W., Jin, M.F., Yu, X.J., 2006. Effect of Homogeneity on Cell Growth and Anthocyanin Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(5), 805-810.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H.T.C., Mol, J.N.M., and Koes, R.E., 1993. Regulatory Genes Controlling Anthocyanin Pigmentation are Functionally Conserved Among Plant Species and Have Distinct Sets of Target Genes. *Plant Cell*, 5, 1497–1512.
- Rail, S., Hemleben, V., 1984. Characterization And Expression Of Chaicone Synthase In Different Genotypes Of *Matthiola Incana* R.Br. During Flower Development. *Plant Molecular Biology*, 3, 137-145.
- Ravaglia, D., Espley, R.V., Henry-Kirk, R.A., Andreotti, C., Ziosi, V., Hellens, R.P., Costa, G., Allan, A.C., 2013. Transcriptional Regulation of Flavonoid Biosynthesis in Nectarine (*Prunus persica*) by a Set Of R2R3 MYB Transcription Factors. *BMC Plant Biology*, 13(68), 1-14.
- Rodríguez-Concepción, M., 2010. Supply of Precursors for Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 118–122.

- Romero, F., Benito, M., Leyva, P., 1998. More Than 80 R2R3-MYB Regulatory Genes in The Genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 14, 273–284.
- Ross, J.A., Kasum C.M., 2002. Dietary Flavonoids: Bioavailability Metabolic Effects and Safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J., Bovy, A.G., 2004. Modification of Flavonoid Biosynthesis in Crop Plants. *Phytochemistry*, 65(2004), 2631–2648.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I., Paz-Ares, J., 1995. Dual DNA Binding Specificity of a Petal Epidermis-Specific MYB Transcription Factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *The EMBO Journal*, 14, 1773–1784.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B., 2001. The R2R3-MYB Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion Plant Biology*, 4, 447-456.
- Stracke, R., Holtgrawe, D., Schneider, J., Pucker, B., Sorensen, T.R., Weisshaar, B., 2014. Genome-Wide Identification and Characterisation of R2R3-MYB Genes in Sugar Beet (*Beta vulgaris*). *BMC Plant Biology*, 14(249), 1-17.
- Takos, A. M., Jaffe, F. W., Jacob, S.R., Bogs, J., Robinson, S.P., Walker, A.R., 2006. Light-Induced Expression of a MYB Gene Regulates Anthocyanin Biosynthesis in Red Apples. *Plant Physiology*, 142, 1216-1232.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., Murphy. A., 2015. *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates, 761, USA&Canada.
- Telias, A., Lin-Wang, K., Stevenson, D.E., Cooney, J.M., Hellens, R.P., Allan, A.C., Hoover, E.E., Bradeen, J.M., 2011. Apple Skin Patterning is Associated with Differential Expression of MYB10. *BMC Plant Biology*, 11(93), 1-14.
- Tian, J., Zhang, J., Han, Z.Y., Song, T.T., Li, J.Y., Wang, Y.R., Yao, Y.C., 2017. McMYB12 Transcription Factors Co-regulate Proanthocyanidin and Anthocyanin Biosynthesis in Malus Crabapple. *Scientific Report*, 7, 1-11.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK), 2013. Türkiye’de Üretilen Elma Çeşitleri ve Üretim Miktarları. Erişim Tarihi: 21.10.2016. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Türkiye Ziraat Odaları Birliği (TZOB), 2003. Elma. Erişim Tarihi: 12.06.2016. http://www.tzob.org.tr/Portals/0/Dokumanlar/FaaliyetRaporlari/docs/elma_calisma_grubu_2004.pdf
- Ubi, B.E., Honda, C., Bessho, C., Kondo, S., Wada, M., Kobayashi, S., Moriguchi, T., 2006. Expression Analysis of Anthocyanin Biosynthetic Genes in Apple Skin: Effect Of UV-B and Temperature. *Plant Science*, 170(3), 571–578.

- United States Department of Agriculture (USDA), 2016. Taze Yaprak Döken Meyveler: Dünya Pazarı ve Ticareti (Elma, Üzüm ve Armut). Erişim Tarihi: 30.09.2017. <https://www.fas.usda.gov/data/fresh-deciduous-fruit-apples-grapes-pears-world-markets-and-trade>
- Xie, R., Zheng, L., He, S., Zheng, Y., Yi, S., Deng, L., 2011. Anthocyanin Biosynthesis in Fruit Tree Crops: Genes and Their Regulation. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19890-19897.
- Xu, Y. Feng, S., Jiao, Q., Liu, C., Zhang, W., Chen, W., Chen, X., 2012. Comparison of MdMYB1 Sequences and Expression of Anthocyanin Biosynthetic and Regulatory Genes between *Malus domestica* Borkh. Cultivar 'Ralls' and Its Blushed Sport. *Euphytica*, 185, 157-170.
- Vimolmangkang, S., Han, Y., Wei, G., Korban, S.S., 2013. An Apple MYB Transcription Factor, MdMYB3, is Involved in Regulation of Anthocyanin Biosynthesis and Flower Development. *BMC Plant Biology*, 13(176), 1-13.
- Vimolmangkang, S., Zheng, D., Han, Y., Khan, M.A., Soria-Guerra, R.E., Korban, S.S., 2014. Transcriptome Analysis of the Exocarp of Apple Fruit Identifies Light-Induced Genes Involved in Red Color Pigmentation. *Gene*, 534, 78-87.
- Vitrac X., Larronde F., Krisa S., Decendit A., Deffieux G., Mérillon J.M., 2000. Sugar Sensing and Ca²⁺-Calmodulin Requirement in *Vitis Vinifera* Cells Producing Anthocyanins. *Phytochemistry*, 53(6), 659-665.
- Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A., Thomas M.R., Robinson S.P., 2007. White Grapes Arose Through The Mutation of Two Similar and Adjacent Regulatory Genes. *Plant Journal*, 49(5), 772-785.
- Wan, L., Li, B., Pandey, M.K., Wu, Y., Lei, Y., Yan, L., Dai, X., Jiang, H., Zhang, J., Wei, G., Varshney, R.K., Liao, B., 2016. Transcriptome Analysis of a New Peanut Seed Coat Mutant for the Physiological Regulatory Mechanism Involved in Seed Coat Cracking and Pigmentation. *Frontiers in Plant Science*, 7(1491), 1-15.
- Wang, H., Arakawa, O., Motomura, Y., 2000. Influence of Maturity and Bagging on The Relationship between Anthocyanin Accumulation and Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) Activity in 'Jonathan' Apples. *Postharvest Biology and Technology*, 19(2), 123-128.
- Wang, S., Hubbard, L., Chang, Y., Guo, J., Schiefelbein, J., and Chen, J.G., 2008. Comprehensive Analysis of Single-Repeat R3 MYB Proteins in Epidermal Cell Patterning and Their Transcriptional Regulation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 8, 81.

- Wang, K.L., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T.K., Espley, R.V., Hellens, R.P., Allan, A.C., 2010. An R2R3 MYB Transcription Factor Associated with Regulation of The Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*,10, 50-58.
- Wang, P., Grimm, B., 2015. Organization of Chlorophyll Biosynthesis and Insertion of Chlorophyll into The Chlorophyll-Binding Proteins in Chloroplasts. *Photosynth Res*, 126, 189–202.
- Wei, Y.Z., Hu, F.C., Hu, G.B., Li, X.L., Huang, X.M., Wang, H.C., 2011. Differential Expression of Anthocyanin Biosynthetic Genes in Relation to Anthocyanin Accumulation in the Pericarp of *Litchi chinensis* Sonn. . *PLoS ONE*, 6(4), 1-11.
- Wester, K., Digiuni, S., Geier, F., Timmer, J., Fleck, C., Huelskamp, M.,2009. Functional Diversity of R3 Single-Repeat Genes in Trichome Development. *Development*, 136, 1487–1496.
- Williams, C.E., Grotewold, E.,1997. Differences Between Plant and Animal MYB Domains are Fundamental for DNA Binding Activity, and Chimeric MYB Domains have Novel DNA Binding Specificities. *Journal Biological Chemistry*, 272, 563–571.
- Yuan, H., Zhang, Y., Nageswaran, D., Li, L., 2015. Carotenoid Metabolism and Regulation in Horticultural Crops. *Horticulture Research*, 2, 1-11.
- Zhai, R., Wang, Z., Zhang, S., Meng, G., Song, L., Wang, Z., Li, P., Ma, F., Xu, L., 2015. Two MYB Transcription Factors Regulate Flavonoid Biosynthesis in Pear Fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1275–1284.
- Zhang, Y., Butelli, E., Martin, C., 2014. Engineering Anthocyanin Biosynthesis in Plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 19, 81-90.
- Zoratti, L., Karppinen, K., Escobar, A.L., Häggman, H., Jaakola, L., 2014. Light-Controlled Flavonoid Biosynthesis in Fruits. *Frontiers in Plant Science*, 5(534), 1-16.
- Zhu, H.F., Fitzsimmons, K., Khandelwal, A., Kranz, R.G., 2009. CPC, a Single-Repeat R3 MYB, is a Negative Regulator of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2(4), 790–802.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine Ece MERCAN

Doğum Yeri ve Yılı :Giresun, 1990

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : emine.ece28@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Yalova Fen Lisesi, 2008

Lisans : İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik