ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe Nur ÜNAL

BAZI NAR GENOTİPLERİNDE ANTOSİYANİN SENTEZİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI NAR GENOTİPLERİNDE ANTOSİYANİN SENTEZİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe Nur ÜNAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 20/02/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

……	……...	……..
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR	Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ	Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2019-11669

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS

BAZI NAR GENOTİPLERİNDE ANTOSİYANİN SENTEZİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADE SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe Nur ÜNAL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2020, Sayfa: 67
Jüri : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK

Nar (*Punica granatum* L.), barındırdığı değerli sekonder metabolitlerden dolayı antioksidan içeriği zengin, antitümör ve antikanser aktiviteleri yüksek bir meyvedir. Birçok farklı alanda kullanılıyor olması nar meyvesine olan talebi arttırmış ve bu durum üretime olumlu yansımıştır. Bu çalışmada, besin kompozisyonuna etki eden antosiyanin sentezi ile ilişkili bazı genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Nar Genetik Koleksiyonunda yer alan "33N53", "İzmir-1479" ve "19/147" genotiplerine ait yaprak, tohum ve meyve kabuğu dokuları kullanılarak qRT-PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve dokulara ait gen ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Analizlerde CHS, CHI, F3H ve PAL genlerinin ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Analizler sonucunda CHS ve CHI genlerine ait ekspresyon düzeyi üç genotipe ait yaprak, dane ve kabuk dokusunda yüksek çıkmıştır. Fakat F3H ve PAL genlerine ait ekspresyon düzeyi yalnızca 19/147 genotiplerine ait dokularda yüksek çıkmıştır. Kabuk ve dane rengi bakımından koyu kırmızı renge sahip olan 19/147 genotipinin antosiyanin içeriği ve gen ekspresyon düzeylerinin uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antosiyanin, Gen ekspresyonu, Nar, Real-Time PCR

ABSTRACT

MSc. THESIS

THE EXPRESSION LEVELS OF GENES RELATED TO ANTHOCYANINE SYNTHESIS IN SOME POMEGRANATE GENOTYPES

Ayşe Nur ÜNAL

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2020, Pages: 67
Jury : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Assoc Prof. Dr. Özhan ŞİMŞEK

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit with high antioxidant content and high antitumor and anticancer activities due to its valuable secondary metabolites. The fact that it is used in many different fields has increased the demand for pomegranate fruit and this has positively reflected on the production. In this study, it was aimed to determine the expression levels of some genes related to anthocyanin synthesis affecting the nutritional composition. For this purpose, qRT-PCR reactions were performed using leaf, seed and fruit peel tissues belonging to "33N53", "İzmir-1479" and "19/147" varieties in the Pomegranate Genetics Collection of Cukurova University Faculty of Agriculture, Department of Horticulture and gene expression of tissues. level has been determined. In the analysis, the expression level of CHS, CHI, F3H and PAL genes was determined. As a result of the analysis, the expression level of CHS and CHI genes was high in leaf, grain and shell tissue of three varieties. However, the expression level of F3H and PAL genes was high only in tissues of 19/147 variety. The varieties of 19/147, which have a dark red color in terms of shell and grain color, were found to be compatible with the anthocyanin content and gene expression levels.

Keywords: Anthocyanin, Gene expression, Pomegranate, Real-Time PCR

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Nar (*Punica granatum* L.) tropik ve subtropik iklim kuşağında yayılış gösteren, çok yıllık bir bitki türü olup ticari değeri kadar kültürel hayatta da önemli bir yer tutmaktadır. Narın anavatanı Güney Kafkasya, Güney Asya, İran, Afganistan, Batı Asya, Anadolu ve Akdeniz arasındaki bölgeleri kapsamaktadır. Ayrıca Avrupa ve Afrika'nın Akdeniz sahil bölgelerinde, Çin, Hindistan, Arabistan, Şili, Arjantin, Kaliforniya, Arizona ve Kuzey Meksika'da da yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Nar, Punicaceae familyasına ait çok yıllık bir bitki türüdür. Genellikle tropik ve subtropik bölgelerde yetiştirilmektedir. Meyveleri demir, potasyum ve C vitamini içeriği bakımından zengindir. Dünyanın birçok bölgesinde farklı kültürlerde şifalı bitki olarak tanımlanan nar, tedavi amacıyla geçmişten günümüze yoğun olarak kullanılmıştır. Son yıllarda yaşam standartlarının, teknolojiye ve beslenme koşullarına bağlı olarak değişmesi, stres faktörleri ve ekolojik kirlilikler nedeniyle serbest radikallerin artması, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına neden olmuştur. Özellikle serbest radikaller doku ve hücrelerde dejenerasyonlara yol açmaktadır. Bu nedenle serbest radikaller ve antioksidan maddeler arasındaki dengenin sağlanabilmesi amacıyla gıdalara dışarıdan selenyum, vitamin E, alfa tokoferol, karnitin, arı sütü, elajik asit, nar çekirdeği ve nar suyu gibi antioksidan içeriği zengin maddelerin katılması yoluna gidilmektedir.

Nar, antosiyanin, ellagitanen ve diğer fenolik maddelerce zengin bir meyvedir. Narın sahip olduğu flavanoid ve antosiyanin içeriğine bağlı olarak gösterdiği antioksidan aktivite, kırmızı şarap ve yeşil çaydan 3 kat daha fazla iken nar suyunun antioksidan düzeyi yaban mersini ve portakaldan da yüksek bulunmuştur. Nar çekirdekleri fito-östrojenlerin iyi bir kaynağıdır. Narda bulunan temel fenolik bileşikler; antosiyaninler, hidrolize olabilen tanenler, ellagik asit ve bunun türevleridir. Antosiyaninler, gıdalara parlak kırmızı rengini veren en iyi

doğal gıda renklendiricileridir ve birçok gıdanın renklendirilmesinde kullanılarak sentetik boyalara karşı önemli bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Bitkilerden izole edilen 500'ün üzerinde antosiyaninin temel yapı taşı flavilyum iyonudur. Antosiyanin grubu pigmentler; böğürtlen, ahududu, nar, kırmızı lahana, siyah ve kırmızı kuş üzümü, ağaç çileği, fransız fasulyesi, erik gibi birçok meyve ve sebzenin pembeden mora kadar değişen renklerini veren maddelerdir.

Antosiyanin içeriği zengin gıdaların antioksidan kapasiteleri oldukça yüksektir. Antioksidan maddeler doku ve hücrelerde oluşan serbest radikalleri elimine etmektedir. Serbest radikaller, DNA'nın parçalanmasına ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle gıdaların antioksidan kapasitesini arttıran antosiyaninlerin insanlarda kronik kalp hastalıkları riskini azaltma, görsel aktiviteyi arttırma ve antiviral aktiviteyi geliştirme gibi etkileri bulunmaktadır. İçeriğindeki punicalagin ve punicic asit narın yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasını sağlamaktadır. Nar ve nar suyunun, antioksidan kapasitesinin zengin olması ve bu özelliğinin başta stres olmak üzere, yanlış beslenme ve olumsuz çevre koşullarının vücudumuzda yarattığı hasarı önlemeye yardımcı olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda kırmızı gıdalara olan talep artmış ve nara olan talebi de etkilemiştir. Son yıllarda nar ile ilgili gen ekspresyon çalışmaları da dahil olmak üzere birçok moleküler çalışma bildirilmektedir.

Gen ekspresyonu, DNA'da mevcut olan genetik bilginin mRNA ve protein düzeyinde ifade edilmesidir. Hücreler, eksprese olan genlerin regülasyonu ve kontrolü için özel fonksiyonlara sahiptirler. Hücrelerde genetik bilgi akışı DNA=RNA=Protein şeklindedir. Bir organizmanın genetik yapısını DNA'da bulunan organik bazlar belirler ve bu bilginin ifade edilmesi de mRNA sayesinde gerçekleşir. Hücre ve dokularda fizyolojik bir etki veya gelişimin incelenebilmesi amacıyla mRNA ekspresyon çalışmaları yürütülmektedir. mRNA ekspresyon analizleri Northern blot, RT-PCR, qRT-PCR, Mikroarray ve RNA Sekanslama (RNA-Seq) analizleriyle gerçekleştirilebilmektedir.

Kantitatif Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir PCR teknolojisidir. Hücrelerden izole edilen total RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini temel alarak, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az miktarda RNA ile hücrelerde oluşan gen ekspresyon miktarı tespit edilebilir. DNA sarmalına bağlanarak floresan ışıma yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile amplifikasyon miktarı belirlenebilir.

İnsan sağlığı açısından son derece önemli olan, yüksek antosiyanin içerikli meyve türlerinin tüketiminde yoğun bir şekilde artış görülmesi ve nar meyvelerinin antosiyanin içeriği bakımından oldukça zengin olması nedeni ile bu tez çalışmasında 3 farklı nar genotipinde, antosiyanin sentezi ile ilişkili 5 farklı genin ifade seviyeleri qRT-PCR tekniği ile araştırılmıştır. Nar genotiplerine ait yaprak, dane ve kabuk dokuları öğütülerek RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA kalite ve miktarı belirlenerek cDNA sentezi yapılmıştır. Primerlerin optimizasyonu sağlanarak qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve ifade seviyelerini belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda antosiyanin sentezi ile ilgili gen ekspresyon profilleri beyaz çeşitte az miktarda, pembe çeşitte orta miktarda ve kırmızı çeşitte ise yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmüştür.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşturulmasında ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin değerlendirilmesinde bana zaman ayıran ve bilgilerini paylaşan Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ ve Doç. Dr. Özhan ŞİMŞEK hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar uygulamalarında ve tez yazım aşamalarında değerli zamanını ve bilgilerini paylaşan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Biyolog Emine AÇAR'a, tez yazım sürecimde hiçbir desteği esirgemeyen ve fikirlerine saygı duyduğum Zir. Yük. Müh. Melike CENGİZ'e, teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni en iyi şekilde yetiştiren, her anlamda destek olup hedeflerimden geri bırakmayan, hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her şeyin en iyisine layık olan Babam İlhan ÜNAL'a, Annem Gülşen ÜNAL'a ve diğer aile bireylerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 13
2.1. Antosiyanin Tayini İle İlgili Çalışmalar 13
2.2. Antosiyanin Biyosentezi İle İlgili Moleküler Çalışmalar 15
3. MATERYAL ve METOT 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. Bitkisel materyal 23
3.1.2. Çalışmada Yer Alan Nar Genotipleri ve Özellikleri 23
3.1.2.1. 33N53 23
3.1.2.2. 19/147 24
3.1.2.3. İzmir 1479 24
3.2. Metot 25
3.2.1. Genotilere Ait Doku Örneklerinin Toplanması 25
3.2.2. RNA İzolasyonu 25
3.2.3. RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi 29
3.2.4. cDNA Kütüphanelerinin Hazırlanması 30
3.2.5. cDNA Döngü Programı 30
3.2.6. Primerlerin Optimizasyonu 31
3.2.7. qRT-PCR Analizleri 31

3.2.8. Realtime-PCR Amplifikasyonu 32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 35
4.1 RNA İzolasyonuna Ait Sonuçlar 35
4.2. cDNA Sentezi ve Primer Optimizasyonuna Ait Sonuçlar 37
4.3.Çeşitlere Ait Dokuların Gen Ekspresyon Profilleri 38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
KAYNAKLAR 57
ÖZGEÇMİŞ 67

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Türkiye'nin nar üretim değerleri (ton) 3
Çizelge 3.1. cDNA sentez karışımı reaktifleri 30
Çizelge 3.2. PCR için kullanılan reaktifler ve miktarları 31
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılacak genlere ait bilgiler 32
Çizelge 3.4. Realtime-PCR için kullanılan reaktifler ve miktarları 32
Çizelge 3.5. Real Time PCR Döngü Programı 32
Çizelge 4.1. RNA Örneklerine Ait Konsantrasyonlar 36
Çizelge 4.2. Primerlere ait Tm sıcaklıkları 38

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Nar Üretiminin İllere Göre Dağılımı 2
Şekil 1.2. Antosiyanidinin genel formülü 5
Şekil 1.3. Antosiyanin biyosentez yolu 6
Şekil 1.4. RT-PCR İşlem basamakları 10
Şekil 3.1. 33N53 genotipine ait meyve görüntüsü 23
Şekil 3.2. 19/147 genotipine ait meyve görüntüsü 24
Şekil 3.3. İzmir-1479 genotipine ait meyve görüntüsü 24
Şekil 3.4. A-B-C) Nar parselinden çeşitlerin toplanması D-E-F) Genotiplere ait yaprak, dane ve kabuk görüntüleri 25
Şekil 3.5. A) Nar yapraklarının havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi B) Nar danelerinin havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi C) Nar kabuklarının havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi 28
Şekil 3.6. A-B) Ekstraksiyon Buffer eklenmesi C) Örneklerin ısı bloğunda bekletilmesi D-E) Supernatant fazın alınması F) Kloroform/izoamil alkol eklenmesi G) Örneklerin santrifüj edilmesi H) Alkolün uzaklaştırılıp kurumaya bırakılması 29
Şekil 3.7. A) Agarozun tartılması B) Agaroz ve TBE karışımının mikrodalgaya konulması C) Örneklerin jele yüklenmesi D) Örneklerin elektroforez tankında koşturulması 30
Şekil 3.8. A) RT-PCR amplifikasyonu için reaktiflerin hazırlanması B) Mix hazırlanması C) RT-PCR için plate hazırlanması 33
Şekil 4.1. RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü 37
Şekil 4.2. 33N53 genotipine ait dokuların CHS ve CHI genlerindeki ekspresyon seviyeleri 39
Şekil 4.3. 33N53 genotipine ait dokuların F3H ve PAL genlerindeki ekspresyon seviyeleri 40

Şekil 4.4.. İZMİR-1479 genotipine ait dokuların CHS ve CHI genlerindeki ekspresyon seviyeleri 41
Şekil 4.5. İZMİR-1479 genotipine ait dokuların F3H ve PAL genlerindeki ekspresyon seviyeleri 42
Şekil 4.6. 19/147 genotipine ait dokuların CHS ve CHI genlerindeki ekspresyon seviyeleri 43
Şekil 4.7. 19/147 genotipine ait dokuların F3H ve PAL genlerindeki ekspresyon seviyeleri 44
Şekil 4.8. CHS geninin tüm dokularda ifade seviyeleri 47
Şekil 4.9. CHI geninin tüm dokularda ifade seviyeleri 48
Şekil 4.10. F3H geninin tüm dokularda ifade seviyeleri 49
Şekil 4.11. PAL geninin tüm dokularda ifade seviyeleri 50
Şekil 4.12. 33N53 genotipine ait tüm genlerin ekspresyon seviyeleri 51
Şekil 4.13. İzmir-1479 genotipine ait tüm genlerin ekspresyon seviyeleri 51
Şekil 4.14. 19/147 genotipine ait tüm genlerin ekspresyon seviyeleri 52

SİMGELER VE KISALTMALAR

m	: Metre
°C	: Santigrat derece
mg	: Miligram
L	: Litre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
g	: Gram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
M	: Molarite
dk	: Dakika
rpm	: Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
ddH_2O	: Deiyonize su
LiCl	: Lityum klorür
EDTA	: Ethilendiamin tetraasetik asit
TE	: Tris EDTA
CTAB	: Cetyltrimeyhhylamonium bromide
NaCl	: Sodyum klorür
PVP	: Polivinilpirolidon
NaOAc	: Sodyum Asetat
TBE	: Tris Borate EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
PPO	: Polifenol oksidazın
$CaCl_2$	: Kalsiyum Klorür
Gb	: Giga baz çifti
Mb	: Mega baz çifti
bç	: Baz çifti

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	: Kantitatif real time PCR
Tm	: Erime Sıcaklığı
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
SSR	: Sımple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
SNP	: Sıngle Nucleotide Polymorphısm (Tek Nükleotid Farklılıkları)
PAL	: Fenialanin amonyum lipaz
CHS	: Kalkon sentaz
CHI	: Kalkon izomeraz
ANS	: Antosiyanidin sentaz
C4H	: Sinnamat 4-hidroksilaz
4CL	: 4-kumarat-CoA ligaz
F3H	: Flavanon 3-hidroksilaz
DFR	: Dihidroflavonol 4-redüktaz
UFGT	: Flavonoid 3- O-glukoziltransferaz
mRNA	: Mesajcı RNA
tRNA	: Taşıyıcı RNA
rRNA	: Ribozomal RNA
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

1. GİRİŞ

Nar, Punicaceae familyasının, *Punica* cinsinden çok yıllık bir bitki olup ticari değeri kadar kültürel hayatta da önemli bir meyvedir. Narın kültür tarihi oldukça eskilere dayanmaktadır. Çeşitli kaynaklarda yetiştiricilik geçmişinin 5000 yıl öncesine kadar uzandığı belirtilmektedir. Nar, boyları 2 ile 5 m arasında değişen çalı formunda bir bitkidir. Meyveleri çok daneli ve etli tohumlardan oluşarak, beyazdan koyu kırmızıya kadar değişik tonlarda renklere sahiptir. Meyveler tatlı, ekşi ve mayhoş olarak gruplandırılır ve buna göre pazarlaması yapılır. Birçok ürün yapımında kullanıldığından dolayı tercihler değişmektedir (Kurt ve Şahin, 2013).

Narın anavatanı, İran başta olmak üzere Türkiye'nin güneydoğusunu kapsayacak şekilde Ortadoğu, Kafkasya ve Hindistan'ın kuzeyi ile ifade edilmektedir. Çoğu kaynakta İran, Kafkasya ve Kuzey Hindistan çevresi narın anavatanı olarak işaret edilmektedir. Anadolu ve bütün Akdeniz Havzası'nı da içine alan çok daha geniş bir bölgede nar bitkisi binlerce yıldır tanınmaktadır. Günümüzde Avustralya'dan Güney Afrika'ya, ABD'den Çin'e kadar çok geniş bir alanda nar yetiştiriciliği yapılmaktadır (Kurt ve Şahin, 2013).

Nar bitkisinin dünya üzerinde yaygın olarak yetiştirildiği bölgeler genelde dönenceler ile 40° enlemleri arasında kalan ve Akdeniz yağış rejiminin etkili olduğu kışları yağışlı, yazları sıcak ve kurak olan bölgelerdir. Nar, tropikal ve subtropikal iklimlerin bitkisi olup ülkemizde de Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde kıyıdan 1000 m yükseltiye kadar olan sahalarda yaygın yetişme ortamı bulmaktadır (Şekil 1.1) (TÜİK, 2020).



Şekil 1.1. Nar Üretiminin İllere Göre Dağılımı (TÜİK, 2020)

Günümüzde nar yetiştiriciliği yapan ülkeler arasında ABD, Rusya, Afganistan, Çin, Fas, Filistin, Hindistan, Irak, İran, Peru, İsrail, İtalya, İspanya, Kıbrıs, Suriye, Mısır, Suudi Arabistan, Tayland, Tunus, Türkiye ve diğer bazı ülkeler yer almaktadır (FAO, 2020).

Dünya nar üretimi yaklaşık 3 milyon ton civarındadır. Nar üretimine öncülük eden ülkeler sırasıyla Hindistan, İran ve Türkiye'dir. Türkiye'de nar üretimi 2009 yılında 170.963 ton iken son 10 yılda sürekli artış göstermiştir (Çizelge 1.1). Ülkemizde nar üretimi en fazla Akdeniz bölgesinde olup diğer bölgelerde de nar üretimi yapılabilmektedir (Şekil 1.1) (TUİK 2020).

Çizelge 1.1. Türkiye'nin nar üretim değerleri (ton)

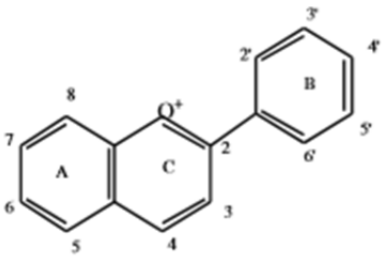
Yıllar	Üretim değeri (ton)
2010	208.502
2011	217.572
2012	315.150
2013	383.085
2014	397.335
2015	445.750
2016	465.200
2017	502.606
2018	537.847
2019	561.206

Tropik ve subtropik iklim meyvesi olarak bilinen narın sıcak ve ılıman iklim bölgelerinde de sınırlı bir şekilde yetiştiriciliği yapılmakta, dünyada ve ülkemizdeki üretim ve tüketimi her geçen gün artış göstermektedir (Tamer, 2006). Özellikle son yıllarda kapama nar bahçelerinin Akdeniz ve Ege Bölgesi'nde artış gösterdiği görülmektedir. Ayrıca zengin fenolik madde içeriği ile insan sağlığına olumlu etkileri nedeniyle son yıllarda üzerinde önemle durulan meyvelerden biridir. Kandaki oksitlenmeyi önleyen nar, kan yapıcı hücreleri arttırarak, kalp ve damar sağlığını korur. Sağlık açısından nar meyveleri özellikle demir, potasyum ve C vitamini içeriği bakımından oldukça zengindir (Şimşek ve ark, 2017). Meyveye kırmızı rengini veren antosiyanin sayesinde bağışıklık sistemini güçlendirir. Antioksidanlar sayesinde enfeksiyonlara neden olan patojen etkiyi azaltarak dirençli hücrelerin sayısını çoğaltır. Grip ve üst solunum yolları hastalıklarının yaşanma riskini azaltır. Kandaki trombosit hücrelerini yenileyen bu besin ödem gibi rahatsızlıkları engellediğinden romatizma ve eklem ağrılarını giderir. Tansiyonu düzenlediğinden kansızlığa bağlı olan bayılmaları da azaltır. Tonik etkisine sahip olduğundan dolayı ciltteki ölü deriyi yenilemektedir. Güçlü bir antioksidan olduğundan kanserli hücrelerin oluşumunu önler. Mide ve bağırsakları temizleyerek besin atıklarını vücuttan atmaktadır. Düzenli tüketildiğinde bölgesel zayıflamayı destekler, böbrek ve mesanede taş oluşumunu engeller. Kalp damar

hastalıkları, Alzheimer, Tip 2 diyabet ve obezite gibi pek çok hastalığa karşı koruyucudur (Şimşek ve ark, 2017).

Nar; antosiyaninler, ellagitanenler, antioksidan ve antitümör aktiviteleri ispatlanmış diğer fenolik maddelerce zengin bir meyvedir (Karaca, 2011). Bu fenoliklerin ve özellikle de yüksek molekül ağırlığı olan fenoliklerin önemli bir bölümü kabuk kısmında bulunmaktadır (Afaq ve ark, 2005). Nar çekirdekleri fito-östrojenlerin iyi bir kaynağıdır (Mori- Okamato ve ark, 2004; Anon, 2006a). Narın içerdiği önemli fenolik bileşenler antosiyaninler, flavonol glikozitleri, prosiyanidinler, ellajik asit ve türevleridir. Narın yüksek antioksidan kapasitesi tanenler, flavonoidler ve antosiyaninler gibi değerli fenolik bileşenleri içermesinden kaynaklanmaktadır. Sahip olduğu bu değerli sekonder metabolitler antioksidan aktiviteleri nedeniyle önemli antimutajenik ve antikanserojenik özelliklere sahiptir (Şengül, 2015).

Antosiyanin, Latincede çiçek ve mavi anlamına gelmektedir. Suda çözünebilen doğal pigmentler olan antosiyaninler yapılarında bir veya birden fazla şeker içermekte olan antosiyanidinlerden oluşmaktadırlar (Jaakola, 2013). Bitkilerden izole edilen antosiyaninlerin temel yapı taşı flavilyum iyonudur. Antosiyaninlerin bitkilerde antioksidan ve UV ışığından koruma görevlerinin yanında savunma, tozlaşma ve üreme fonksiyonlarında önemli yerleri vardır (Kolaç ve ark, 2017). Hücre sitoplazmasında glikozit formda bulunan antosiyaninler bazı şekerler ve şeker olmayan (aglikon) maddelerden meydana gelmiştir. Aglikon kısmını antosiyanidinler oluşturmaktadır. Antosiyaninlerin aglikon kısmını oluşturan antosiyanidinler ile bunlara bağlanan şeker gruplarının yeri ve sayısı antioksidan aktivite üzerine etki etmektedir. Yapıdaki hidroksil sayısının artışı, B halkasındaki o-dihidroksi yapı, 3'. ve 4'. karbona hidroksillerin bağlanması antioksidan aktiviteyi arttırmaktadır (Şekil 1.2). Genel olarak 3. karbona glukoz bağlanmasıyla oluşan antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi daha yüksektir. Yapıya katılan şeker sayısı değiştikçe antioksidan aktivite de değişir. Üç ve daha fazla şeker ilavesi antioksidan aktiviteyi azaltır (Koca ve ark, 2006).



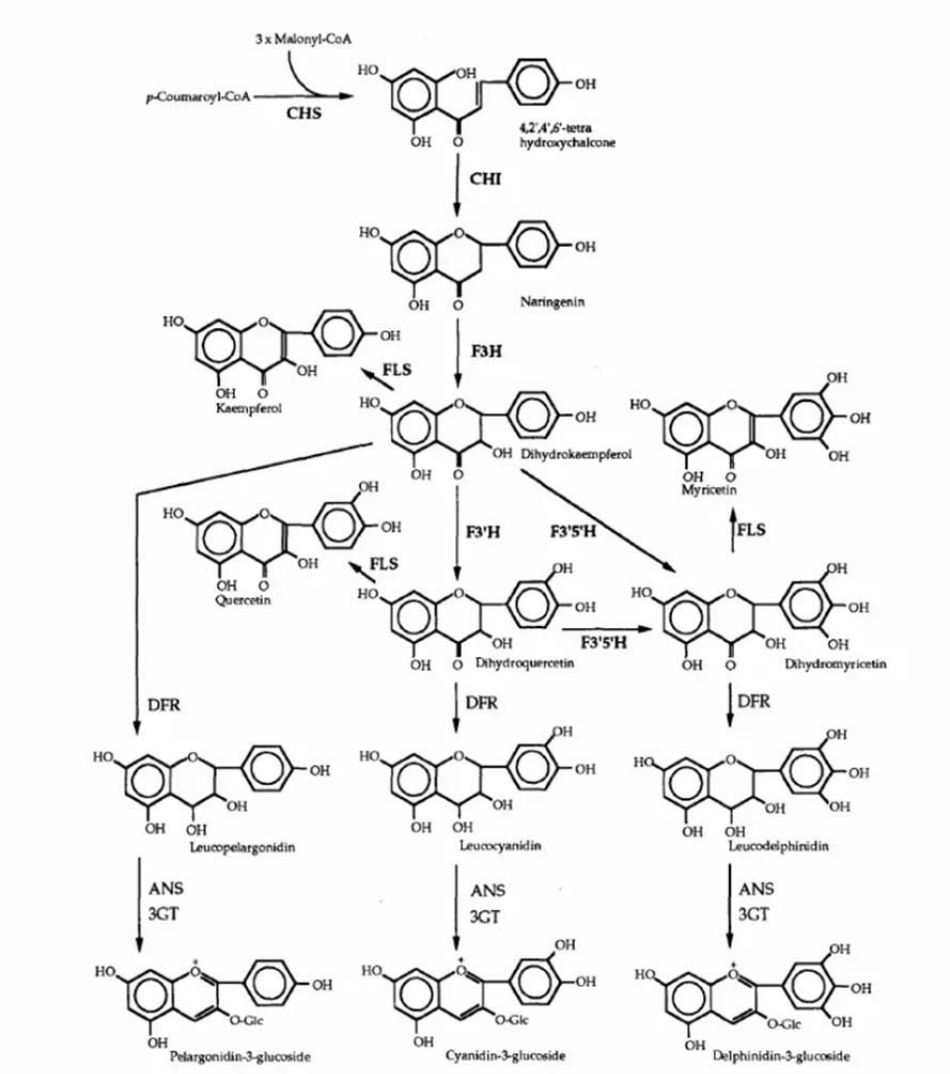
Aglikon	3,5,7	3'	4'	5'
Delfinidin	OH	OH	OH	OH
Siyanidin	OH	OH	OH	H
Pelargonidin	OH	H	OH	H
Malvidin	OH	OCH_3	OH	OCH_3
Peonidin	OH	OCH_3	OH	H
Petunidin	OH	OCH_3	OH	OH

Şekil 1.2. Antosiyanidinin genel formülü (Koca ve ark, 2006).

Fenilpropanoid yoluyla üretilen antosiyaninlerin, biyosentez basamakları çok iyi bilinmektedir. Antosiyanin biyosentezi temel olarak fenilalanin amino asiti ile başlar. Antosiyanin biyosentezinde birçok farklı gen rol almaktadır. Bunlar fenilalanin amonyum liyaz (PAL), kalkon sentaz (CHS), antosiyanidin sentaz (ANS) gibi çeşitli yapısal genlerdir. Fenilalanin bu sentezin öncülüdür ve fenilalaninden antosiyaninlere dönüşme, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucu oluşmaktadır.

İlk olarak fenilalanin, PAL aracılığıyla amonyumunu kaybederek sinnamik aside dönüşür. Sonra sinnamik asit sinnamat 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 (Şekil 1.3) (Xie ve ark, 2011).

Antosiyaninler, meyvelerin kalitesine büyük katkıda bulunan sağlığı geliştiren önemli pigmentlerdir. Antosiyaninlere yol açan biyosentetik yol iyi bilinmelidir (Jaakola, 2013).



Şekil 1.3. Antosiyanin biyosentez yolu (Jaakola, 2013).

Kalkon sentaz (CHS), tüm bitki türlerinde bulunan bir tip III poliketid sentazdır. Bu enzimler benzer dizilim, yapı ve genel katalitik prensipler sergilerler (Wang ve ark, 2018). Flavonoid biyosentezinde anahtar bir enzim olan CHS, üç malonil-CoA'nın, bir başlangıç substratı olarak bir 4-koumaroil-CoA molekülü ile naringenin kalkonisini oluşturmak üzere yoğunlaşmasını katalize eder. Kalkon sentaz (CHS) antosiyaninin biyosentezinde rol oynar. CHS genleri iki ekson ve bir intron içermektedir. Kalklon sentaz (CHS), flavonoid biyosentetik yolağındaki ilk kararlı adımı katalize eden önemli bir enzimdir. *CHS* genlerinin ekspresyon seviyeleri flavonoidlerin biyosentezi ile yüksek derecede ilişkilidir (Lu ve ark, 2009). Kalkon izomeraz (CHI), bitkiler ve çevre arasındaki etkileşim için önemli olan bitki sekonder metabolizmasında kritik roller oynar. CHI genleri çeşitli yüksek bitkilerde yaygın olarak incelenir. Kalkon izomeraz (CHI), çeşitli flavonoidler üreten fenilalanin metabolizma yolunun anahtar enzimidir. Örneğin, özellikle bitki ve meyvelerde, farklı bitki dokularında yaygın olarak dağıtılan önemli bir pigment olan antosiyanin, bir tür flavonoiddir. CHI peptit zincirleri birçok bitki türünde yüksek homoloji gösterir. CHI, pigment sentezi ve çiçek, meyve ve tohum rengi oluşumunda önemli bir rol oynar. Flavonoid pigmentlerinin bölgesel dağılımı, birçok bitkinin böcekleri, tozlayıcıların dağılımı ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, CHI aktivitesi dolaylı olarak bitki üreme sürecini etkileyebilir (Liu ve ark, 2015).

Flavanon 3-hidroksilaz (F3H), bitki flavonoidlerinin biyosentetik yolundaki önemli bir enzimdir. Üç eksona bölünen kodlama dizisinin uzunluğu 1047 bp'dir. Bitkilerde, *F3h* geni flavonoid biyosentez yolunun, yani flavanon 3-hidroksilazın anahtar bir enzimini kodlar (Khlestkina ve ark, 2013). İkincil metabolitler arasında, flavonoidler özellikle bitki büyümesi, gelişimi ve üremesi için çok önemlidir ve aynı zamanda insan sağlığının korunması için faydalıdır (Yu ve ark, 2013). PAL geni, fenilpropanoid yolağındaki ilk ve aynı zamanda hız sınırlayıcı bir adımı katalize eder, bu da flavonoidler dahil olmak üzere çeşitli ikincil metabolitler için öncüler sağlamakta ve genel olarak bitkiler ve çevre

arasındaki etkileşim için önemli olan bitki sekonder metabolizmasında kritik görevler üstlenmektedir (Liu ve ark, 2006).

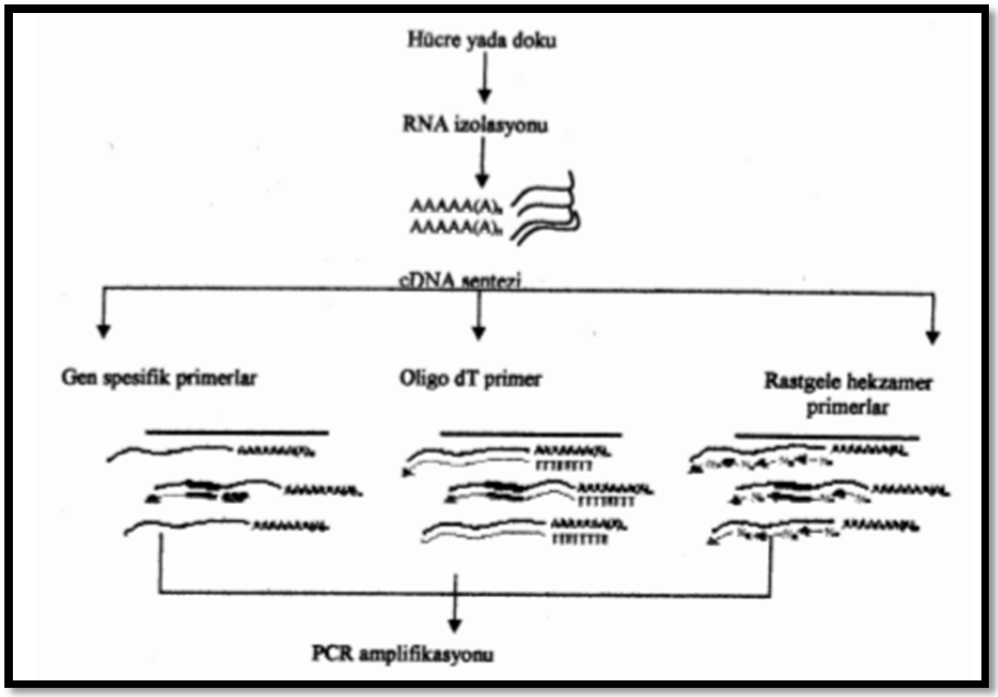
Meyve ve sebzelerde bulunan antosiyaninlerin stabilitesi pH, sıcaklık, konsantrasyon, oksijen, ışık, enzimler, askorbik asit, şekerler, metal iyonlarının varlığı gibi faktörlere bağlı olarak değişse de daha çok sıcaklık ve pH'dan etkilenmektedirler (Yılmaz, 2012). Günümüzde 22 tane antosiyanidin ve 275 tane antosiyanin olduğu belirlenmiştir. Antosiyaninler arasındaki farklılıklar; moleküldeki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve konumu, moleküle bağlanan şekerlerin sayısı, türü ve bağlanış pozisyonu, moleküldeki şekerlere bağlı bileşiklerin türünden kaynaklanmaktadır. Antosiyaninler doğada meyve ve sebzelere çekici rengi kazandırma yanında antioksidan özellikleriyle de ön plana çıkmaktadırlar. Antosiyanidinler yapılarındaki elektron eksikliği nedeniyle serbest radikallere karşı çok aktif bir konumda yer almaktadır. Antosiyaninlerin antioksidan aktivitesi yapısına bağlı olarak değişmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, antosiyaninlerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduklarını ve bu özellikleri nedeniyle serbest radikallerle ilişkili olan kanser, kardiovasküler hastalıklar, eklem iltihabı gibi çeşitli hastalıklara karşı olumlu yönde etkide bulunduğunu ortaya koymuştur (Koca ve ark, 2006). Bununla ilgili olarak yapılan çalışmaların başında ekspresyon çalışmaları gelmektedir.

Gen ekspresyonu; DNA'dan alınan bilgilerin transkripsiyonla mRNA'ya ve sonrasında translasyonla proteine akışını ifade eder (Yüzbaşıoğlu, 2008). DNA'da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) sentezi suretiyle kopyalanması veya yazılmasına transkripsiyon adı verilir. Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan, bir protein molekülüne ait genetik bilgilerin okunması veya bir protein molekülü haline çevrilmesine translasyon denir. Transkripsiyon ve translasyon olaylarının toplamı, gen ifadesi (gen ekspresyonu) olarak tanımlanmaktadır. Gen ekspresyon analizleri bir hücrede belirli bir anda sentezlenen mRNA moleküllerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesine

dayanmaktadır ve analizler Northern blot, RT-PCR, qRT-PCR, Mikroarray ve RNA dizileme (RNA-Seq) teknikleri ile gerçekleştirilebilmektedir (Başaran, 2010).

Real-time PCR, DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan popüler bir metotdur. DNA ürünlerinin çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, DNA'nın oluşan floresanın ışımalarla doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (Günel, 2007).

Kantitatif Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezine yardımcı olarak gen ekspresyon analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntem çok az miktarda RNA ile hücrede belirli bir anda oluşan transkript düzeyinin saptanmasına ve ekspresyon profilinin tespit edilebilmesine olanak tanımaktadır (Bustin ve Mueller, 2005; Nolan ve ark, 2006).



Şekil 1.4. RT-PCR İşlem basamakları (Okutucu ve Pehlivan, 2003)

Genler etkilerini mRNA sentezi ile ortaya çıkarmaktadırlar. Normal koşullarda RNAz enzimlerinin aktivitesi ile çok çabuk ve kolay parçalandıklarından, mRNA'lar ile laboratuvar koşullarında çalışılması oldukça güçtür. Bu nedenle mRNA preparatları mRNA'nın DNA karşılığı olan cDNA'ya çevrilirler ve bu halde kullanılırlar (Başaran, 2010).

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından dolayı çoğalan DNA miktarındaki artışla beraber olarak "real-time" PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. "SYBR Green I" en fazla tercih edilen boya çeşididir. Reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığı anda boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan

yayılımı başlar (Cotroneo ve ark, 2006). Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır. Ancak ürün miktarı arttıkça floresan ışımada hızla artar ve bu artış "real-time" cihazının ekranından izlenebilmektedir. Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin ("melting curve") yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= Tm) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (Tm) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında aradığımız DNA parçasının Tm derecesi arasında farklılık olacaktır (Günel, 2007).

İnsan sağlığı ve beslenmesi için son derece önemli olan yüksek antosiyanin içerikli meyve türlerinin tüketiminde yoğun bir şekilde artış görülmesi ve nar meyvelerinin antosiyanin içeriği bakımından oldukça zengin olması nedeni ile bu tez çalışmasında, 3 farklı nar genotipinde meyve kabuğu, dane ve yaprak dokusunda, antosiyanin sentezi ile ilişkili 5 farklı genin ifade seviyeleri qRT-PCR tekniği ile araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Antosiyanin Tayini İle İlgili Çalışmalar

Hernandez ve ark (1999), homojen koşullar altında kültüre alınmış beş yeni nar klonunun, olgunlaşma sırasında meyve sularındaki antosiyanin içeriklerinin değişimini incelemişlerdir. Altı antosiyanin pigmentinin nar suyunun kırmızı renginden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Kantitatif ve kalitatif olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analiz edilmiş ve delphinidin 3-glukozit ve 3,5-diglukozit, siyanidin 3-glukozit ve 3,5-diglukozit ve pelargonidin 3-glukozit ve 3,5-diglukozit olarak tanımlanmıştır. Genel olarak, meyve olgunlaşması sırasında meyve suyu pigmentasyonunda bir artış meydana gelmiştir. Erken meyve olgunlaşma aşamalarında, ana pigment olan delphinidin 3,5-diglukozit, ardından siyanidin 3,5-diglukozit, daha sonraki aşamalarda, monokosid türevleri siyanidin 3-glukozit ve delfinidin 3-glukozit önemli ölçüde artmıştır. Pelargonidin türevleri her zaman küçük miktarlarda bulunmuştur.

Gil ve ark (2000), yapmış oldukları çalışmada, nar suyunun antioksidan aktivitesini dört farklı yöntemle (ABTS, DPPH, DMPD ve FRAP) değerlendirmişlerdir ve kırmızı şarap ile yeşil çay infüzyonuyla karşılaştırmışlardır. Ticari nar suları, kırmızı şarap ve yeşil çaydan (6-8 TEAC) üç kat daha yüksek bir antioksidan aktivite (18-20 TEAC) göstermiştir. Meyve sularının HPLC-DAD ve HPLC-MS analizleri, ticari meyve sularının nar tanen punikalajini (1500-1900 mg/L) içerdiğini ortaya koymuştur. Ek olarak meyve sularında, antosiyaninler, ellagik asit türevleri ve hidrolize edilebilir tanenler tespit edilmiştir.

Ophir ve ark (2014), yürüttükleri çalışmada, fenotip olarak farklılık gösteren iki farklı nar genotipinde, yeni nesil dizileme teknolojisi kullanarak RNA dizileme çalışmaları yürütmüşlerdir. Dizileme çalışmalarında yaprak, kök, çiçek ve meyve örneklerini kullanmışlardır. Analiz sonucunda 7155 SSR ve 6500 SNP markörü belirlemişlerdir. Elde ettikleri bu SNP markörleri arasından 450 tanesini 105 farklı nar genotipinin genetik çeşitliliğini belirlemek amacı ile kullanmışlardır.

Miguel ve ark (2004), farklı uygulamalardan sonra soğuk depolama koşulları altında Algarve'de (Güney Portekiz) yetişen tatlı bir Portekiz çeşidi olan "Assaria" narının meyvelerindeki antosiyaninlerin konsantrasyonunu araştırmışlardır. Meyveler, balmumu ile püskürtme, % 1.5 $CaCl_2$ ile püskürtme, balmumu ve % 1.5 $CaCl_2$ ile püskürtme, 25 kalınlığında kaplama kutuları düşük yoğunluklu polietilen film uygulamalarından sonra soğuğa (5°C) maruz bırakılmıştır. İşlenmemiş meyveler kontrol olarak kullanılmıştır. Antosiyanin seviyeleri harici bir siyanidin 3-rutinosid standardıyla (pik bölgeye göre) veya pik bölgelere göre bireysel hesaplama ile ölçülmüştür. Depolama süresi ve depolamadan önce meyve muamelesi toplam antosiyanin içeriğini etkilemiştir. En yüksek seviyeler, $CaCl_2$ ile muamele edilmiş meyveler hariç, ilk depolama ayı sonunda gözlenmiştir. İkinci ayın sonunda azami değerler elde edilmiştir.

Alighourchi ve ark (2008), yapmış oldukları çalışmada, Yezd ilinden elde edilen 15 nar çeşidinin antosiyanin miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan çeşitlerde tespit edilen başlıca antosiyaninler; delphinidin 3-glukozit (2.19–16.29 mg/L), delphinidin 3,5-diglukozit (2.36–63.07 mg/L), pelargonidin 3-glukozit (0.26-1.66 mg/L), pelargonidin 3,5-diglukozit (0.01–8.11 mg/L), siyanidin 3-glukozit (5.78–30.38 mg/L) ve siyanidin 3,5-diglukozit (4.39-166.32 mg/L) olarak belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca işlenmemiş ve pastörize edilmiş meyve sularının depolama süresinin seçilmiş dört çeşidin antosiyanin içeriği üzerine etkisi de incelenmiştir. Her antosiyaninin ortalama bozulma süresi 4°C'de 10 gün boyunca % 23.0 ile % 83.0 arasında değişmiştir. Pastörize meyve sularındaki antosiyaninlerin ortalama bozulması 4°C'de 10 hafta depolamadan sonra % 42.8 olarak belirlenmiştir.

Francis (2010), Domates gen kaynaklarında, genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla altı domates çeşidinin kök, yaprak, çiçek, meyve ve kallus dokularından cDNA kütüphanesi oluşturmuştur. Çalışmada Illumina GAII yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak her domates çeşidi için toplam dizinin 2.5 Gb'dan fazlası ortaya çıkarılmıştır. Tek ve eşleştirilmiş 60 bç'lik okuma ile domateslerin 32.5 Mb

transkriptom dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Bu yeni dizilerin, türler arasında gen duplikasyonlarının belirlenmesi, domates tek nükleotid polimorfizmlerinin incelenmesi için araç olacağı belirtilmiştir.

Kelebek ve Canbaş (2010), Hicaz narından elde edilen meyve suyunun organik asit, şeker, fenol bileşikleri ve antioksidan kapasitelerini araştırmışlardır. Bu bileşiklerin analizinde yüksek performanslı sıvı kromatografisini kullanmışlardır. Şırada 3 adet organik asit, 3 adet şeker, 6 adet antosiyanin ve 8 adet renksiz fenol bileşiği belirlenmiştir. Şırada sitrik asitin baskın organik asit, fruktozun baskın şeker, siyanidin-3,5-diglikozitin baskın antosiyanin ve α-punikalajinin baskın renksiz fenol bileşiği olduğu saptanmıştır. Şıradaki EC50 değerinin 11 ml/mg DPPH olduğu ve antioksidan kapasitenin ise 6.49 (AEx10-3) olduğu belirlenmiştir.

Jaiswal ve ark (2010), yapmış oldukları çalışmada, kurutmanın nar tanelerinde antosiyaninler ve polifenol oksidazın (PPO) aril antosiyanin oksidasyonundaki rolünü araştırmışlardır. Nar kuru tanelerinde beş antosiyanin tespit edilmiştir. Kurutma, antosiyaninlerin miktarını olumsuz yönde etkilemiştir. Polifenol oksidazın, antosiyaninlerin oksidatif bozunmasında olası bir rol oynadığı tespit edilmiştir.

Karanjalker ve ark (2017), yeşil, sarı ve kırmızı renkli mango çeşitlerinin kabuğunda qRT-PCR yöntemiyle antosiyaninlerde yer alan genlerin ifadesini araştırmışlardır veBu çalışmada üç farklı mango çeşidinde olgunlaşma aşamasındaki meyve kabuklarını kullanılmıştır. qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi ile kırmızı renkli çeşitlerde daha yüksek antosiyanin miktarı olduğu ortaya konulmuştur.

2.2. Antosiyanin Biyosentezi İle İlgili Moleküler Çalışmalar

Yıldız (2009), Bu çalışmada havuç kök bölgesindeki mor renkten sorumlu P1 geni, kök ksilem bölgesindeki sarı renkten sorumlu Y2 geni ve antosiyanin biyosentez döngüsünde yer alan bazı yapısal genlerin havuç genetik haritasındaki

lokasyonları AFLP, SSR, SNP ve SCAR moleküler markır teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Araştırmada geliştirilen iki havuç ıslah hattı arasında yapılan melezlemeden elde edilen F2 generasyonundan 72 birey kullanılmıştır. Oluşturulan harita LOD= 4.00 ve maksimum rekombinasyon değeri θ=0.25'de havucun sahip olduğu 9 bağlantı grubunu kapsamaktadır. Ayrıca Ereğli (mor), 7262 (Mor/Turuncu) ve 0493 (Turuncu) nolu havuç genotiplerinin dört farklı kök gelişim aşamasında antosiyanin biyosentez döngüsünde görev alan altı yapısal genin (PAL3, CHS1, F3H, DFR1, LDOX2 ve UFGT) ekspresyon deseni Real Time RT-qPCR tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Turuncu renkli genotipin (0493) dört gelişim aşamasında da CHS1, F3H, DFR1 ve LDOX2 genleri ekspresyon göstermemişken, dışı mor içi turuncu genotipte (7262) antosiyanin birikiminin başlamasıyla birlikte bu genlerin ekpresyonu başlamıştır. Turuncu renkli genotipte UFGT gen ekspresyonu tüm gelişim aşamalarında yüksek dalgalanmalar sergilemiştir. UFGT geninin havuç kök bölgesinde antosiyanin oluşumunda anahtar gen olmadığı, antosiyanin oluşumu için CHS1, F3H, DFR1 ve LDOX2 genlerinin etkin bir görevde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, havuç kök bölgesinde antosiyanin oluşumundan sorumlu farklı düzenleyici mekanizmaların olabileceği belirlenmiştir.

Wei ve ark (2011), Li-çi meyvesinde antosiyanin birikimi ile ilişkili olarak antosiyanin biyosentez genlerinin diferansiyel ekspresyonunu araştırmışlardır. Çalışma esnasında 12 çeşit Li-çi kullanılmıştır. Kalkon sentaz (CHS), kalkon izomeraz (CHI), flavanon-3-hidroksilaz (F3H), dihidroflavonol 4-redüktaz (*DFR*), anthocyanidin sentaz (ANS), Dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR), flavonol 3-Oglukosiltransferaz (UFGT) genleri kullanılmıştır. Kırmızı Li-çi çeşidinde 734 mg fark gözlenmiştir. F3H, DFR, ANS ve UFGT genlerinde kırmızı olmayan çeşitlerin perikarpındaki ekspresyon seviyesi kırmızı çeşitlerle kıyaslandığında çok zayıf olduğu bildirilmiştir. Özellikle DFR ve UFGT ekspresyonları, perikarptaki antosiyanin konsantrasyonları ile pozitif korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu

sonuçlar antosiyanin biyosentetik yolağındaki genlerin, Li-çi meyvelerinde kırmızı renk oluşumu sırasında koordineli olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu altı gen arasında UFGT ekspresyonunun perikarp antosiyanin konsantrasyonu ile önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Ono ve ark (2011), yürüttükleri çalışmada insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan narda, doğal ürünlerin biyosentezi ile ilgili çok az bilginin bulunduğunu bildirmişlerdir ve nar meyve kabuğu cDNA'sının transkriptom analizi için Illumina Genom Analyzer platformu kullanılarak dizileme çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda hidrolize edilebilir tanen, antosiyanin, terpenoid ve flavonoid biyosentez yolağı ile ilişkili aday genler tespit edilmiş ve aday genlere ait ifade seviyeleri belirlenmiştir.

Zhao ve ark (2015), kalkon sentaz, kalkon izomeraz, flavanon 3-hidroksilaz, dihidroflavonol 4-redüktaz, antosiyanidin sentaz (ANS), UDP-glukoz-flavonoid 3-O-glukosiltransferaz ve R2R3 MYB transkripsiyon faktörü PgMYB gibi antosiyanin biyosentezi ile ilişkili enzimleri kodlayan tam uzunlukta cDNA klonlarını meyve kabuğundan izole etmişlerdir. Ek olarak, antosiyanin biyosentetik genlerinin transkript seviyeleri, kırmızı ve beyaz meyvelerdeki gerçek zamanlı PCR ile kantitatif olarak ölçmüşlerdir. Her iki çeşitte de yapısal genler için iki ifade seviyesi meyve gelişimi sırasında tespit edilirken, PgMYB için erken gelişim sırasında sadece bir pik gözlenmiştir. PgMYB flavonoid biyosentezi için önemli iken, antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesi için diğer transkripsiyon faktörleri de gerekli görünmektedir. Beyaz çeşidinde hiç antosiyanin saptanmamıştır. Beyaz meyvelerin kabukları, PgANS dışındaki tüm tanımlanmış genlerin transkriptlerini içermiştir. Bu PgANS ekspresyonunun eksikliğinin, beyaz nardaki antosiyaninlerin yokluğundan sorumlu ana faktör olabileceğini düşündürmüştür. PgANS geninin, nar meyvesinde antosiyanin biyosentezinde rol oynayan kilit gen olabileceği düşünülmektedir.

Wei ve ark (2015), kırmızı ve sarı kiraz (*P. avium* L.) meyvelerinde antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genlerin transkriptom analizlerini karşılaştırmalı olarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada *P. avium* L.'nin referans transkriptom (Re-sequencing) dizilenmiş ve meyve renginin oluşumuna neden olan transkriptler tespit edilmiştir. Kırmızı ve sarı meyvelerden oluşturulan cDNA kütüphaneleri yeni nesil Illumina/Solexa platformu kullanılarak dizilenmiştir. RNA-Seq analizleri sonucunda 43.128 unigen içeren 66 milyonun üzerinde okuma gerçekleştirilmiştir. Meyve olgunlaşmasının dört aşaması arasındaki transkriptom farklılıkları analiz edilmiştir. Antosiyanin biyosentezi ile ilişkili olan 72 unigeni biyolojik yolak analizleri ile ortaya koyulmuştur. Fenilalanin amonyak-liyaz (PAL), 4-kumarat-CoA ligaz (4CL), kalkon sentaz (CHS), kalkon izomeraz (CHI), flavanon-3-hidroksilaz (F3H), dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR), anthocyanidin sentaz (ANS) ve flavonol 3-Oglukosiltransferaz (UFGT) kodlayan unigenlerin ifade şablonu meyve olgunlaşması sırasında kırmızı ve sarı meyveler arasında farklılık göstermiştir. Ayrıca, antosiyanin biyosentezini kontrol edebilen bazı transkripsiyon faktör aileleri (MYB, bHLH ve WD40) tespit edilmiştir. Antosiyanin enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan ifade seviyesi değişmiş 18 unigen qRT- PCR analizleri ile doğrulanmıştır.

Ben-Simhon ve ark (2015), nardaki rengi kontrol eden genetik faktörlerin anlaşılması için "beyaz" bir narın kimyasal, moleküler ve genetik karakterizasyonunu yapmışlardır. Bu kalıtım, çiçekler, meyveler (kabuk ve aril) ve yapraklar dahil olmak üzere bitkinin tüm dokularında antosiyaninlerin oluşturduğu tipik nar renginden yoksundur. Gen ekspresyonu analizi, analiz edilen "beyaz" nar dokularının hiçbirinin, antosiyanin-biyosentez yolağındaki merkezi yapısal genlerden biri olan PGLDOX genine karşılık gelen mRNA'yı sentezleyemediğini göstermiştir. HPLC analizleri, "beyaz" nar dokularının hiçbirinin antosiyanin biriktirmediğini, oysa LDOX'un üstündeki biyokimyasal reaksiyonlara karşılık gelen diğer flavonoidlerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Beyaz narın moleküler analizi, PgLDOX'in kodlama bölgesinde tek baz mutasyonuna dayalı SNP varlığını

ortaya koymuştur. Tek bazın eklenmesi sonucu SNP' nin amino asit sekansını değiştirmediği tespit edilmiştir. Öte yandan, beyaz fenotip için toplama ve ayrılma gruplarından nar kalıtımlarının genotiplenmesi, girintili tek-gen özelliği olarak ekleme ile tam bağlantısını göstermiştir. Sonuçlar ele alındığında, PgLDOX'a eklenen tek bazın "beyaz" antosiyaninsiz fenotipten sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu veriler, LDOX genindeki doğal bir modifikasyonun, meyve veren odunsu çok yıllık yaprak döken bir ağaçta renk birikimi üzerindeki etkisine ilişkin ilk doğrudan moleküler, genetik ve kimyasal kanıtları sağlamaktadır.

Akgöl (2017), nar meyvelerinde tohum sertliği ve yumuşaklığının oluşmasından sorumlu aday genleri RNA sekanslama yöntemi ile araştırmıştır. Bu çalışmada yumuşak çekirdekli “33N26” ve sert çekirdekli “Hicaznar” çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmada her iki çeşitten de meyveler, tozlanma ve döllenmenin ardından, meyve tutumunu takiben belirli aralıklarda alınmış ve meyveler açılarak ilgili çeşitlere ait tohumlar çalışmada kullanılmıştır. Toplanan tüm örneklerde çekirdek oluşum mekanizmasının histolojik olarak belirlenebilmesi için mikroskobik gözlemler yapılmıştır. Bu gözlemler sonucunda belirlenen dönemlere ait örnekler RNA sekanslama analizlerinde kullanılmıştır. Moleküler analizler için seçilen örneklerden Total RNA izolasyonunun ardından RNA dizileme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tüm dizilemeler sonucunda toplam olarak 59.264 unigen tespit edilmiştir. GO analizleri sonucunda 12.328 unigenin fonksiyonu belirlenmiştir. KEGG analizleri sonucunda ise 27.698 unigenin hangi yolaklarda görev aldığı tespit edilmiştir.

Yuan ve ark (2017) yapmış oldukları çalışmada, tahmini 336 Mb genomunun yaklaşık % 81.5'ini kaplayan, N50 büyüklüğü 1.7 Mb olan 2.177 iskeleden oluşan ve 30.903 gen içeren 274 Mb yüksek kaliteli bir taslak nar genom sekansını rapor etmişlerdir. Filogenomik analiz, narın monogenerik Punicaceae familyasından farklı olarak Lythraceae familyasına ait olduğunu desteklemiştir. Entegre genomik ve transkriptomik analizler, ellagitanin bazlı bileşiklerin biyosentezini, nar meyvesi gelişimi sırasında hem soyulmalarda hem de arillerde

renk oluşumunu ve narın karakteristik özelliği olan eşsiz ovül geliştirme proseslerinin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında bilgi vermiştir. Bu genom dizisi, Lythraceae'deki ilk referansı temsil etmekte, bazı benzersiz biyolojik süreçler hakkındaki anlayışımızı genişletmek ve hem karşılaştırmalı biyoloji çalışmalarını hem de ürün ıslahını kolaylaştırmak için önemli bir kaynak sunmaktadır.

Mercan (2017), 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.

Şimşek ve ark (2018), yapmış oldukları çalışmada, narda SSR bölgelerini, yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak tanımlamayı amaçlamışlardır. Bu amaçla RNA-seq çalışmaları yapmışlardır. RNA seq analizlerinde 'Hicaznar' ve '33N26' çeşitlerini kullanmışlardır. Biyoinformatik çalışmalarının sonucunda, DNA üzerindeki SSR bölgelerinin tanımlanması sağlanmıştır. Çalışmanın sonunda yaklaşık 19.000 mikrosatellit belirlenmiştir. Bu bölgelerden rastgele seçilen 20 SSR primer çifti, 40 farklı nar genotipinde test edilmiştir. Analiz sonucunda 20

SSR primer çifti başarıyla amplifiye olmuş ve bunlardan 5 tanesi polimorfik sonuçlar vermiştir.

Harel-Beja ve ark (2019), nar meyvelerinde, narın ana pigmeti olan antosiyaninlerin ve shikinat yolağının bir ara maddesinden sentezlenen yüksek derecede biyoaktif olarak hidrolize olabilen bir tanen olan punikalajin üretimini değerlendirmiş ve karşılaştırmışlardır. Gen ekspresyonu ve metabolit (antosiyaninler ve punikalajin) birikimi, meyve gelişiminin üç aşamasında, sırasıyla yüksek ve düşük antosiyaninler içeren kırmızı ve pembe çeşitlerin kabuğunda belirlenmiştir. Kırmızı ve pembe nar çeşitleri, erken dönemden geç meyve gelişim aşamalarına geçiş sırasında gen ekspresyonunda en yüksek farkı gösterirken, çeşitler arasındaki fark her gelişim aşamasında nispeten küçük olmuştur. Antosiyanin ve total punicalagin içeriği arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Diferansiyel olarak eksprese edilen kontiglerden 3093 ve 312 contig'ler sırasıyla antosiyaninler ve punikalagin içeriği ile ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, 143 contig hem antosiyanin hem de punikalajin ile pozitif korelasyon göstermiştir. Diferansiyel olarak eksprese edilen contigler ayrıca analiz edilen metabolitlerin her biri ile ayrı bir karakteristik korelasyonu temsil eden beş gruba ayrılmıştır. Genel olarak, sunulan bilgilerde hidrolize edilebilir tanen ve antosiyanin yolakları arasındaki etkileşimin var olduğunu tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, 3 farklı nar genotipinde meyve kabuğu, dane ve yaprak dokusunda, antosiyanin sentezi ile ilişkili 5 farklı genin ifade seviyeleri qRT-PCR tekniği ile araştırılmıştır.

3.1.1. Bitkisel materyal

Tez kapsamında kullanılan genotipler Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü bünyesinde yer alan Nar Genetik Koleksiyonu'ndan seçilmiştir. Genetik koleksiyonda yer alan ''33N53", "İzmir-1479" ve "19/147" genotiplerine ait yaprak, dane ve meyve kabuğu dokuları kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Yer Alan Nar Genotipleri ve Özellikleri

3.1.2.1. 33N53

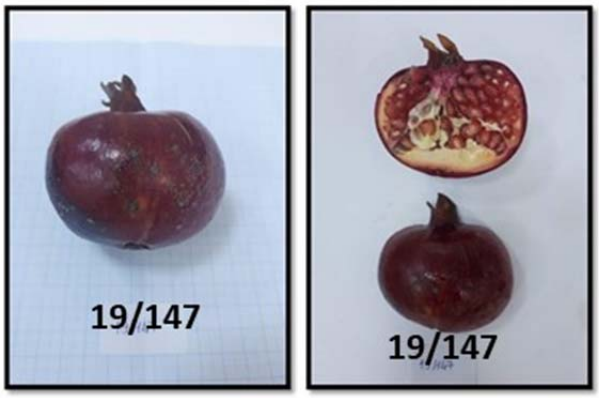
Dane rengi beyaz, kabuk rengi pembedir. Ekşi nar grubu arasında yer almaktadır.



Şekil 3.1. 33N53 genotipine ait meyve görüntüsü

3.1.2.2. 19/147

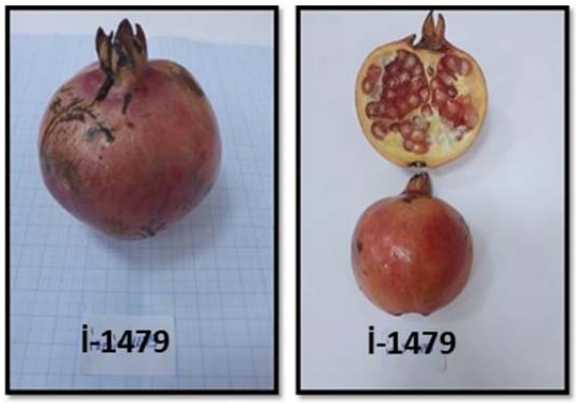
Dane rengi ve kabuk rengi koyu kırmızıdır. Tatlı nar grubu arasında yer almaktadır.



Şekil 3.2. 19/147 genotipine ait meyve görüntüsü

3.1.2.3. İzmir 1479

İzmir'in Ödemiş yöresinden selekte edilmiş bir çeşittir. Orta kuvvetli gelişim gösteren bir ağaç yapısına sahiptir. Dane rengi ve kabuk rengi kırmızıdır. Tatlı nar grubu arasında ve yumuşak çekirdeğe sahip bir çeşittir (Yılmaz, 2007).

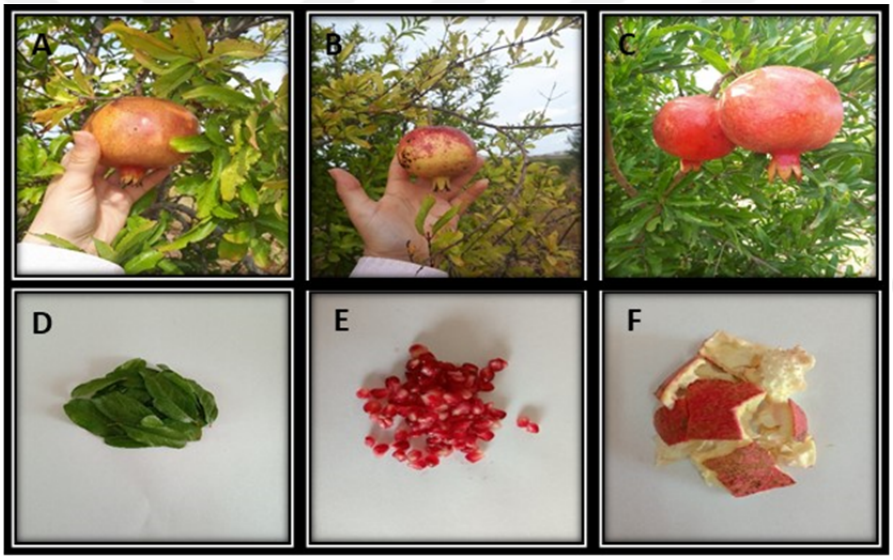


Şekil 3.3. İzmir-1479 genotipine ait meyve görüntüsü

3.2. Metot

3.2.1. Genotiplere Ait Doku Örneklerinin Toplanması

Tez çalışmasında farklı düzeylerde renklenme gösteren 3 farklı nar genotipinde antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla tam olgunluk döneminde 3 farklı doku kullanılmıştır (Şekil 3.4). Genotiplere ait dokular Ekim 2019 tarihinde alınmıştır. Genotiplere ait dokular 50 g alınarak alkol ile silindikten sonra etiketlenmiş alüminyum folyoya sarılarak sıvı azot içerisine alınmıştır. Sıvı azot içerisinde dondurulan doku örnekleri RNA izolasyonu aşamasına kadar -80ºC'de depolanmıştır.



Şekil 3.4. A-B-C) Nar parselinden çeşitlerin toplanması D-E-F) Genotiplere ait yaprak, dane ve kabuk görüntüleri

3.2.2. RNA İzolasyonu

RNA İzolasyonu için -80°C'de depolanan dokular kullanılmıştır. Dokular havanda sıvı azot yardımı ile öğütülmüş ve 100 mg olacak şekilde ependorf tüplere alınarak izolasyon için hazır hale getirilmiştir. Ayrıca izolasyon için iki farklı ekstraksiyon buffer hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon Buffer I: Bu solüsyonun hazırlanmasında %2 CTAB (Cetyltrimeyhhylamonium bromide), 25 mM EDTA (Etilen daimin tetra asedik asit), 100 mM Tris-HCL (Merck) (pH:8), 2.0 M NaCl (Merck), 0.5 g/L Spermidin (Sigma Aldrich) ve % 2 PVP (Polivinilpirolidon) MA: 2.5 g/mol (Merck) kullanılmıştır. Solüsyon 121°C'de 20 dakika otoklav edilmiştir. Kullanılmadan önce 50 µg/ml proteinaz K (Qiagene) eklenmiştir.

Ekstraksiyon Buffer II: Bu solüsyonun hazırlanmasında % 2 CTAB, 1 mM, 10 mM Tris-HCL (Merck) (pH:8), 1.0 M NaCl (Merck), 0.5 g/L Spermidin (Sigma Aldrich) ve % 0.5 Sodyum doesil sulfat (SDS Merck) kullanılmıştır. Ekstraksiyon Buffer II 121 °C'de 20 dakika otoklav edilerek ve kullanılmadan önce 65°C'ye kadar ısıtılmıştır.

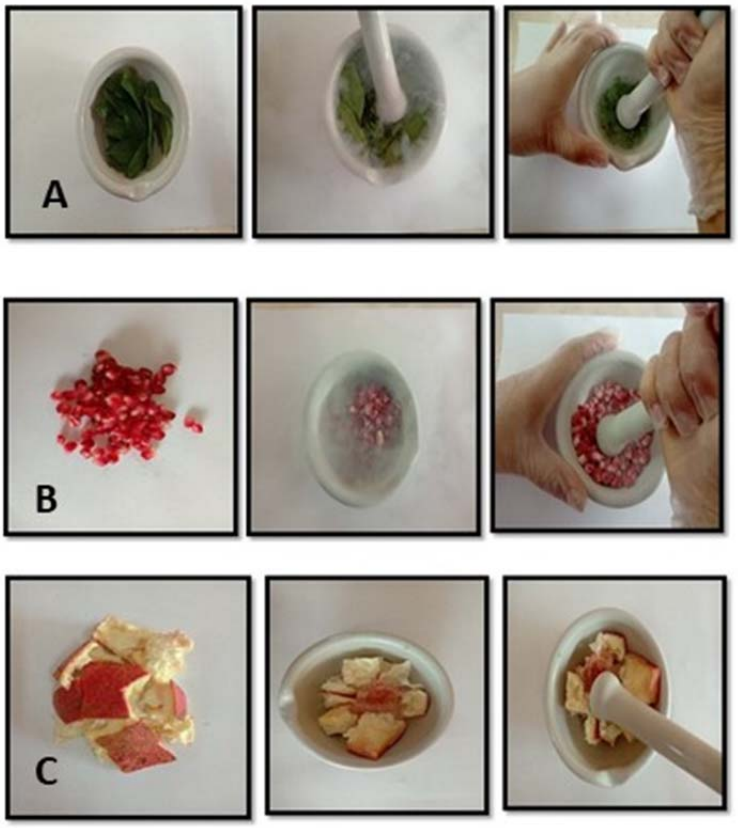
Diğer Solüsyonlar (Merck): RNA izolasyonunda ayrıca Kloroform İzoamil alkol (24:1), 10 M Lityum Klorit, % 70'lik Etanol (DEPC ile hazırlanmış saf etanol), İzopropanol (DEPC ile hazırlanmış) 3 M Sodyum Asetat (NaOAc, pH:5.2) solüsyonları kullanılmıştır.

RNA İzolasyon Aşamaları

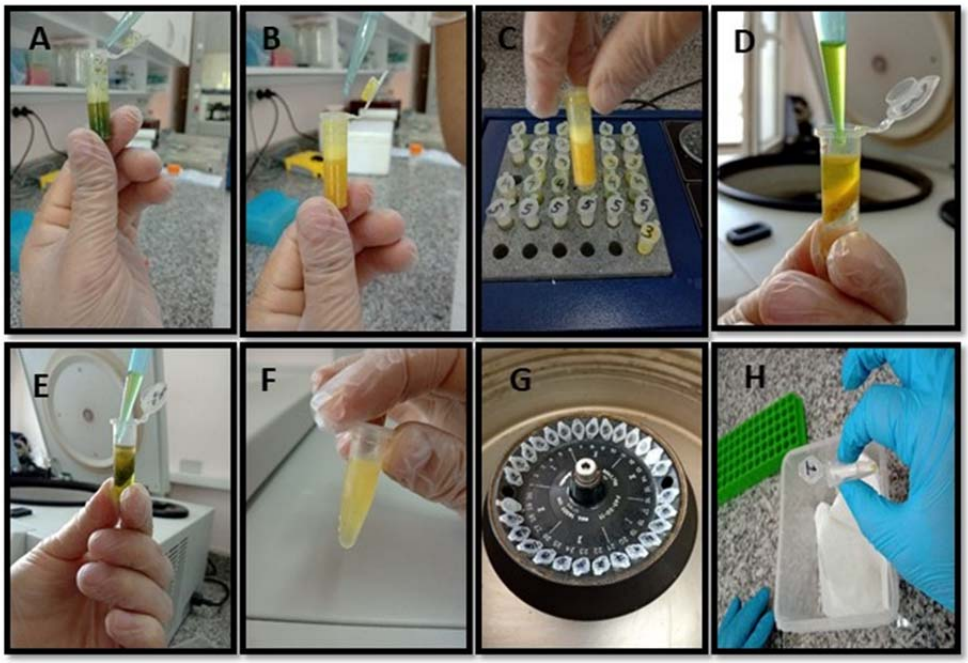
- Genotiplere ait yaprak, dane ve kabuk dokuları havanda sıvı azot yardımı ile öğütülmüştür.
- Öğütülen örnekler 150 mg PVP (Polivinilpirolidon) bulunan ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Her bir tüpün üzerine 65°C de ısıtılan Ekstraksiyon Buffer I 'den 1mL eklenmiştir. Tüpler hızlıca karıştırılarak 65°C, 40 dk süre ile inkübe edilmiştir. Tüpler her 5 dk da bir hızlıca karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.
- Süre sonunda tüplere 24:1 (v/v) kloroform/izoamilalkol eklenmiştir ve tüpler iyice karıştırılmıştır.

- Tüpler 20.000 q'de 60 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant 1,5 tüplere aktarılmıştır.
- Tüplerin üzerine 3:1 oranında Lityum Klorür (LiCl) eklenerek +4°C'e en az 16 saat olacak şekilde inkübasyona alınmıştır.
- İnkübasyondan alınan örnekler 20.000 q'de 60 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dikkatlice dökülerek, pellete 1 mL % 96 etanol eklenmiştir.
- Örnekler 20.000 q'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Alkol uzaklaştırılarak, pellet bırakılmıştır. Pellete 750 µl 65°C inkübe edilen ekstraksiyon buffer II eklenmiştir.
- 30 dk 65°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Tüplerdeki miktar üzerine 750 µl 24:1 (v/v) oranında kloroform/izoamil alkol eklenmiştir.
- Örnekler 20.000 q'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınıp, yeni tüplere aktarılmıştır.
- Süpernatanta 100 µl sodyum asetat (NaOAc) ve 600 µl izopropanal eklenmiştir. Örnekler yavaşça karıştırılmıştır.
- Örnekler en az 2 saat -20°C'de bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan örnekler 20.000 q'de 60 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım dökülmüştür.
- Pellete 1 mL % 70 etanol ve 30 µl NaOAc eklenmiştir.
- 15.000 q'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım dökülerek pellete tekrar 1 mL % 70 etanol eklenmiştir.
- 5 dk 15.000 q'de santrifüj yapılmıştır. Alkol uzaklaştırılarak, pellet kurumaya bırakılmıştır.
- Pellete 30 µl TE Buffer eklenerek çözdürülmüştür.
- İzole edilen örnekler -80 °C'de stoklanmıştır.

  İzolasyon aşamalarına ait görüntüler Şekil 3.5'de ayrıntılı olarak verilmiştir.



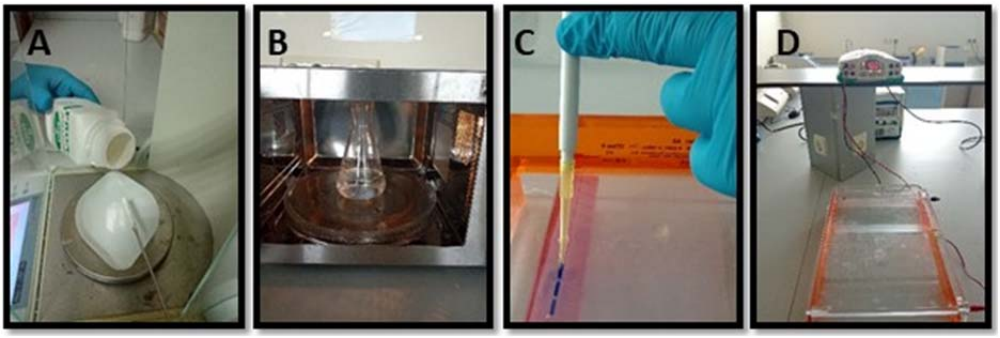
Şekil 3.5. A) Nar yapraklarının havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi B) Nar danelerinin havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi C) Nar kabuklarının havanda sıvı azot yardımıyla öğütülmesi



Şekil 3.6. A-B) Ekstraksiyon Buffer eklenmesi C) Örneklerin ısı bloğunda bekletilmesi D-E) Supernatant fazın alınması F) Kloroform/izoamil alkol eklenmesi G) Örneklerin santrifüj edilmesi H) Alkolün uzaklaştırılıp kurumaya bırakılması

3.2.3. RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre ile ölçülmüştür. RNA kalitesi ise 28S ve 18S ribozomal RNA alt birimlerinin varlığı ile değerlendirilmiştir. RNA'nın alt birimlerinin varlığı agaroz jel elektoroforezi ile belirlenmiştir. Bu amaçla % 1,5 konsantrasyona sahip agaroz jel hazırlanmıştır. İzole edilen RNA örneklerinden ise 5 µl alınarak üzerine 1 µl 6X yükleme boyası ve 5 µl ddH_2O eklenmiştir. 100 voltta 60 dk süreyle koşturulmuştur. Süre sonunda agaroz jel UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.7. A) Agarozun tartılması B) Agaroz ve TBE karışımının mikrodalgaya konulması C) Örneklerin jele yüklenmesi D) Örneklerin elektroforez tankında koşturulması

3.2.4. cDNA Kütüphanelerinin Hazırlanması

cDNA sentezinde Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.1'de verilen reaktifler, 0.2'lik ependorf tüpler içerisinde birleştirilmiş ve cDNA sentezi için karışım hazırlanmıştır. cDNA sentez karışımı için kullanılan reaktifler ve hacimleri Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. cDNA sentez karışımı reaktifleri

REAKTİF	**1X (µl)**
10x RT Buffer	2
dNTP Mix	0,8
Random Primer	2
Reverse Transkriptaz	1
H_2O	4,2
Toplam	10

3.2.5. cDNA Döngü Programı

cDNA sentezinde PCR döngü koşullarında, Applied Biosystem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protokolü kullanılmıştır. Uygulanan

PCR protokolü 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 80°C 5 dk ve +4°C ∞'dur. Sentezlenen cDNA kütüphaneleri Real Time PCR reaksiyonlarına kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Primerlerin Optimizasyonu

Real time PCR reaksiyonlarında kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi amacı ile klasik PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Primer optimizasyonunda sentezlenen cDNA kütüphaneleri kullanılmıştır. PCR için kullanılan reaktifler ve hacimleri Çizelge 3.2'de verilirken PCR döngü koşulları 94°C 2 dk (ön denatürasyon), 35 döngü olacak şekilde 94°C 1 dk (DNA'nın çift iplikçiğinin ayrılması), 54°C 1 dk (primer bağlanması), 72°C 1 dk (yeni iplikçiğin yazılımı), 72°C 5 dk (son yazılım) ve 4°C ∞ olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen PCR ürünleri % 2'lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi sonrasında jel UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.2. PCR için kullanılan reaktifler ve miktarları

REAKTİF	**1X (µl)**
Master Mix	25
MgCl2	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,5
Forward Primer	1
Rewerse Primer	1
cDNA	1
TOPLAM	29

3.2.7. qRT-PCR Analizleri

Kantitatif Real time PCR çalışmalarında antosiyanin biyosentezi ile ilişkili olduğu bildirilen 4 farklı gen kullanılmıştır. Endojen kontrol olarak ise PgRPSII geni kullanılmıştır. İlgili genlere ait primerler Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan genlere ait bilgiler (Ben-Simhon ve ark, (2015)

Gen İsmi	Forward Primer	Rewers Primer
PAL	5'-TGGAGTGTCTCAGCAGTTGG-3′	5'-CGGAACAGCATAGGATGGAT-3′
CHS	5'-CCCACTAAAGCGACCCATT-3′	5'-AGACCACAAAATGCCTCCAC-3′
CHI	5'-ACTACCATTGACGGGTGCTC-3′	5'-GTGTAAGTGCCCACGGATTT-3′
F3'H	5'-CGAGTTGATACCGTTTGGG-3′	5'-GTTCAGCTTCTCGGGCAT-3′.
PgRPSII	5'TCAATTTGTGAGGGTCGTTCT-3′	5'-GATTCAAGAGTAGTAACCGATTCCA-3′

3.2.8. Realtime-PCR Amplifikasyonu

Real time PCR aşamasında SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit protokolü kullanılmıştır. Realtime-PCR için kullanılan reaktifler ve miktarları Çizelge 3.4'de verilirken PCR döngü koşulları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

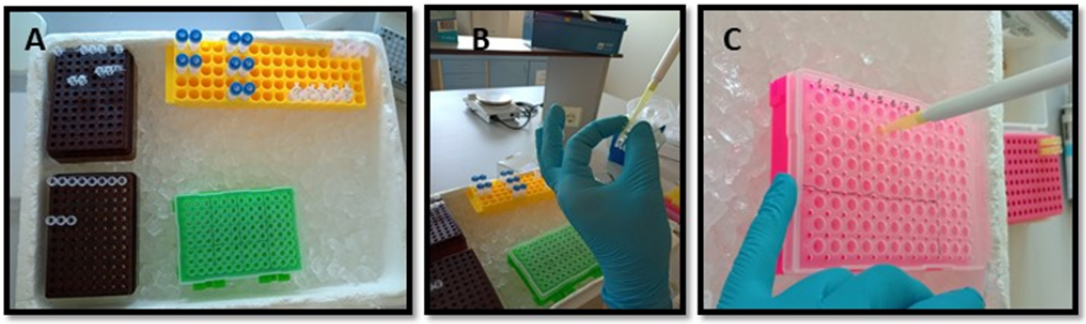
Çizelge 3.4. Realtime-PCR için kullanılan reaktifler ve miktarları

REAKTİF	**1X(µl)**
SYBR Green	10
Forward Primer	0.8
Rewerse Primer	0.8
Template	6
H_2O	2.4
TOPLAM	20

Çizelge 3.5. Real Time PCR Döngü Programı

50°C	95°C	95°C	60°C	95°C	60°C	95°C	60°C
2dk	10dk	15sn	1dk	15sn	1dk	30sn	15sn

PCR reaksiyonunda kullanılan cDNA kütüphanesine ait reaksiyonlar üç tekerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu için hazırlanan karışımlar Real-Time PCR aparatlarına yüklenerek cihaza yerleştirilmiştir (Şekil 3.10). Reaksiyon sonucu elde edilen CT değerleri 2-ΔΔCt formülüne göre değerlendirilerek örnekler arasındaki gen ifadesi farklılıkları belirlenmiştir.



Şekil 3.8. A) RT-PCR amplifikasyonu için reaktiflerin hazırlanması B) Mix hazırlanması C) RT-PCR için plate hazırlanması

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Nar Genetik Koleksiyonunda yer alan toplam 90 adet nar (*P. granatum*) genotipinin arasından 3 farklı nar genotipinde meyve kabuğu, dane ve yaprak dokusunda, antosiyanin sentezi ile ilişkili 5 farklı genin ifade seviyeleri qRT-PCR tekniği ile araştırılmıştır.

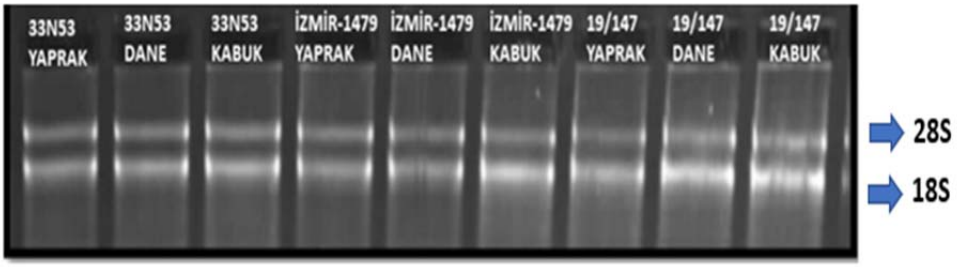
4.1 RNA İzolasyonuna Ait Sonuçlar

Moleküler çalışmalar için Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Nar Genetik Koleksiyonunda bulunan 3 nar genotipine ait yaprak ve meyve örnekleri toplanmış ve sıvı azota (-196°C) daldırılıp, dondurulmuştur. Doku örnekleri RNA izolasyon sürecine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. CTAB yöntemine göre izole edilen RNA örneklerinin kalite ve kantite tayini NanoDrop spektrofotometre ölçümleri ile yapılmıştır. RNA örneklerine ait konsantrasyonlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ayrıca izole edilen RNA örneklerinin kalitesinin, 28S ve 18S ribozomal RNA alt birimlerinin varlığının değerlendirildiği agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. RNA Örneklerine Ait Konsantrasyonlar

NO	GENOTİP VE DOKU	KONSANTRASYON (ng/µl)	A260/A280
1	33 N 53 YAPRAK	944,9	2.10
2	33 N 53 TOHUM	208,5	1.80
3	33 N 53 KABUK	276,5	1.83
4	İZMİR-1479 YAPRAK	1847,8	2.25
5	İZMİR-1479 TOHUM	204,8	1.80
6	İZMİR-1479 KABUK	248,3	1.81
7	19/147 YAPRAK	725,3	2,12
8	19/147 TOHUM	247,5	1.80
9	19/147 KABUK	713,1	2.06

Moleküler biyoloji çalışmalarında en kritik aşamalardan biri RNA izolasyonudur. RNA, DNA kadar kararlı bir molekül olmadığından dolayı izolasyonu çok zordur. İzolasyon sırasında RNA'ların parçalanması çok sık karşılaşılan bir durumdur. Çünkü RNA stabil olmayan bir moleküldür. Kolay yıkılır. RNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli RNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir. Tez çalışması kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen RNA'ların saflık oranları 1,80-2,25 arasında değişmiştir. En yüksek konsantrasyon İzmir-1479 genotipine ait yaprak dokusunda görülmüştür. En düşük konsatrasyon ise İzmir-1479 genotipine ait dane dokusunda olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

RNA kalite kontrolünün yapıldığı yöntemlerden birisi de agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesidir. Agaroz jelde 28S ve 18S RNA yoğun bir şekilde görülüyorsa total RNA izolasyonu başarılı olmuştur. Total RNA izolasyonu sonucu eğer RNA degrede olmuşsa agaroz jelde smear görüntüsü oluşur. Bu durumla karşılaşıldığında yeniden izolasyon yapmak gerekir. Tez çalışması kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen genotiplerde 28S ve 18S RNA görüntüsü net bir şekilde elde edilmiştir.

4.2. cDNA Sentezi ve Primer Optimizasyonuna Ait Sonuçlar

Sentezlenen cDNA kütüphanelerinin kontrolü endojen kontrol olarak kullanılan PgRPSII genine ait primerle gerçekleştirilmiştir. cDNA kütüphaneleri ve PgRPSII primeri kullanılarak PCR reaksiyonu yapılmıştır. PCR ürünleri %2'lik konsantrasyona sahip agaroz jelde koşturulmuştur. Elektroforez işlemi sonrasında jel UV ışık altında görüntülenmiştir.

cDNA sentezinin doğrulanmasının ardından, gen ekspresyonu için kullanılacak primerlerin optimizasyonu yapılmıştır. Klasik PCR reaksiyonu ile bağlanma sıcaklıkları belirlenen primerlerin erime sıcaklıkları (Tm) Çizelge 4.2 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Primerlere ait Tm sıcaklıkları

PRİMERLER	Tm (Erime Sıcaklığı)
PAL	56 °C
CHS	54 °C
CHI	56 °C
F3'H	56 °C
PgRPSII	54 °C

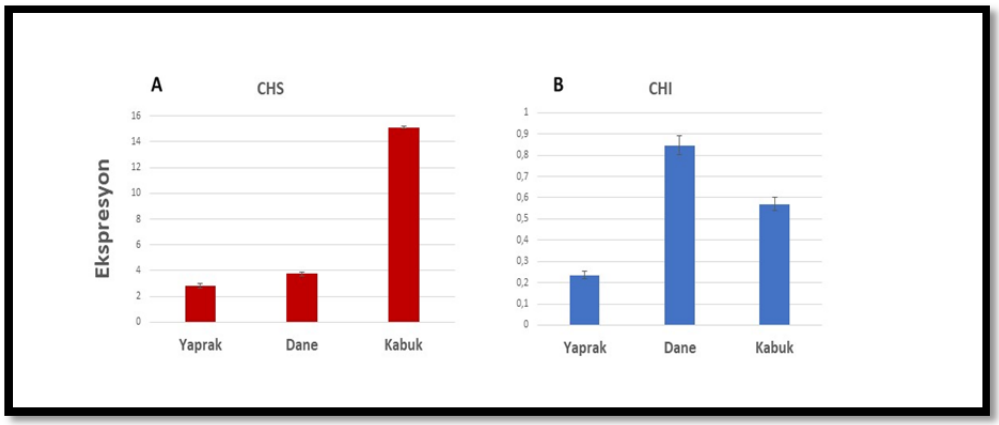
İyi bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta RNA ile çalışılmalıdır. RNA spektrofotometrik olarak ölçülerek saflık miktarı kontrol edilir. Ayrıca RNA çalışmaya uygun uzunlukta olmalı ve EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ya da SDS (Sodyumdodesilsülfat) gibi Revers transkriptaz enzimini inhibe eden inhibitörleri içermemelidir (Okutucu, 2003). mRNA'yı cDNA'ya çevirmenin amacı mRNA'yı daha dayanıklı cDNA sayesinde daha kolay ve ayrıntılı inceleyebilmektir. RT-PCR ile klonlanan cDNA sayesinde genlerin ekspresyonu RNA ve protein seviyesinde daha ayrıntılı incelenebilir.

4.3.Genotiplere Ait Dokuların Gen Ekspresyon Profilleri

Birçok bitkide antosiyanin biyosentez yolağı ile ilişkili bazı genlere ait ekspresyon çalışmaları mevcut olmasına karşın narda antosiyanin biyosentezi ile ilgili gen ekspresyon çalışmaları sınırlıdır. Antosiyanin, meyve kompozisyonuna ve kalitesine olan etkilerinin yanı sıra insan sağlığını pozitif yönde etkileyebilen biyoaktif maddelerdir. Bu nedenle, son yıllarda antosiyanin biyosentezi ve biyosentez yolağı ile ilişkili moleküler çalışmalar önem kazanmıştır. Yapılan literatür taramalarında antosiyanin ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmının nar suyu antosiyanin miktarının belirlenmesine yönelik olduğu görülmüştür Narda antosiyanin biyosentez mekanizması ile ilgili moleküler çalışmaların sınırlı olmasından dolayı bu çalışmada 3 farklı nar genotipinde ve genotiplere ait farklı dokularda antosiyanin biyosentez yolağı ile ilişkili 5 önemli genin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş ve özellikle dokulara ait renklenme ile gen ekspresyon düzeyi ilişkilendirilmiştir. Çalışmada, dane rengi beyaz, kabuk rengi yeşil

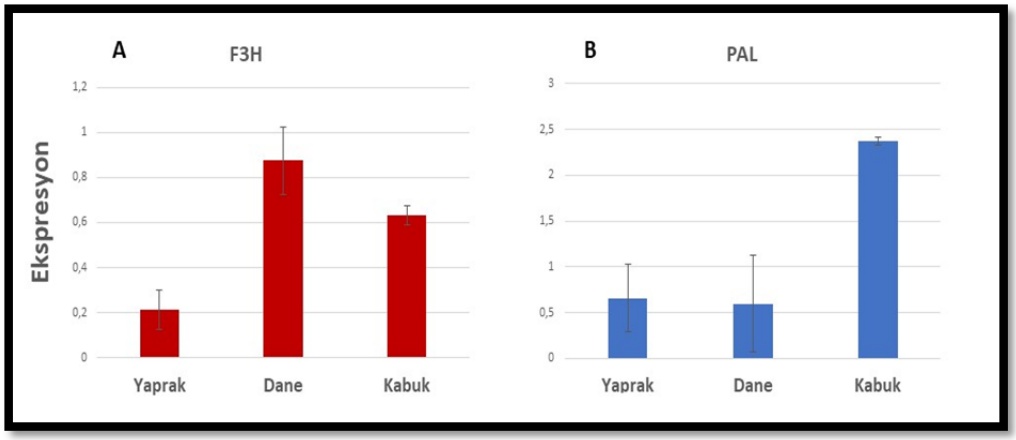
"33N53", kabuk ve dane rengi pembe olan "İzmir-1479 ile dane ve kabuk rengi koyu kırmızı olan 19/147" genotiplerine ait dokuların ekspresyon düzeyi analiz edilmiştir.

Real time PCR analizleri ile dokularda ilgili genlerin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Analizlerde 2-ΔΔCt formülü kullanılarak genotiplere ait dokular arasındaki gen ifade düzeyleri Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 33N53 genotipine ait dokuların CHS ve CHI genlerindeki ekspresyon seviyeleri

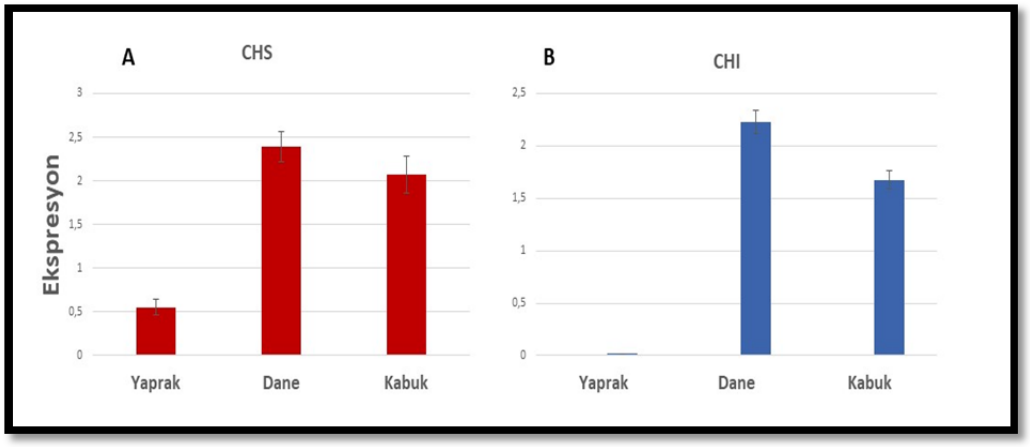
Analizler sonucunda 33N53 genotipine ait farklı dokularda CHS geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifadenin yaprak dokusunda olduğu gözlenmiştir. Yaprak dokusunda ifade seviyesi 3, kabukta ise 15 olarak belirlenmiştir. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 5 kat daha fazla ifade olan kabukta olduğu gözlenmiştir. CHI geninin ifadesi incelendiğinde ise yine en düşük ifadenin yaprak dokusunda olduğu gözlenmiştir. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 3 kat daha fazla ifade olan danede olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.3. 33N53 genotipine ait dokuların F3H ve PAL genlerindeki ekspresyon seviyeleri

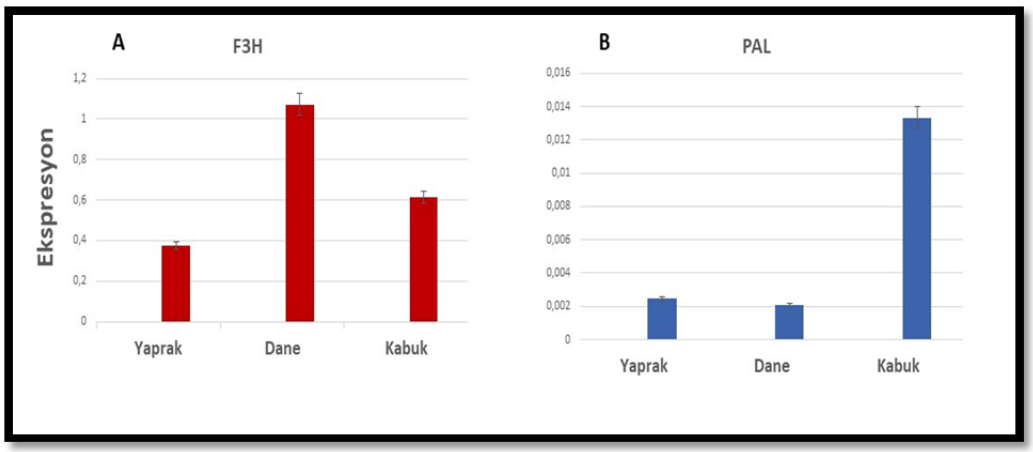
33N53 genotipine ait farklı dokularda F3H geninin ifadesi incelendiğinde en düşük yaprak dokusunda olduğu gözlenmiştir. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 4 kat daha fazla ifade olan dane dokusunda olduğu gözlenmiştir. Son olarak PAL geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifade seviyesinin yaprak ve danede olduğu görülmüştür. En yüksek ifade seviyesinin yaprak ve dane dokusuna göre 5 kat daha fazla ifade olan kabukta olduğu gözlenmiştir. Yapılan analizler neticesinde 33N53 çeşidinde kabukta CHS ve PAL genlerinin ekspresyon düzeyinde artış görülürken, danede CHI ve F3H genlerinin ekspresyon düzeyinde artışlar gözlenmiştir. Dane rengi beyaz, kabuk rengi yeşil olmasına karşın antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinde çok azda olsa artışlar gözlenmiştir. Zhao ark, (2015), narda beyaz renkli meyvelerde antosiyanin sentezi ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyinde farklılıkların olmadığını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise ilgili genlerin ekspresyon düzeyinde farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Özellikle farklı genotip ve dokuların kullanılması sebebiyle farklılıklar ortaya çıkmıştır. Özellikle CHS geninin ekspresyon düzeyindeki yüksek artışlar flavonoid yolağının başlatıcı anahtar geni olmasından kaynaklanmaktadır. CHS ve CHI flavonoid yolağında başlatıcı

konumdaki anahtar genlerdir. CHI geninin katalizörlüğünden sonra flavonoid yolağı polifenol ve antosiyanin biyosentezinden sorumlu iki yolağa ayrılmaktadır (Nabavi, 2020). Bu nedenle CHS veya CHI genlerinin ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların yalnızca antosiyanin biyosentezi ile ilişkilendirilemeyeceğini düşünülmektedir.



Şekil 4.4.. İZMİR-1479 genotipine ait dokuların CHS ve CHI genlerindeki ekspresyon seviyeleri

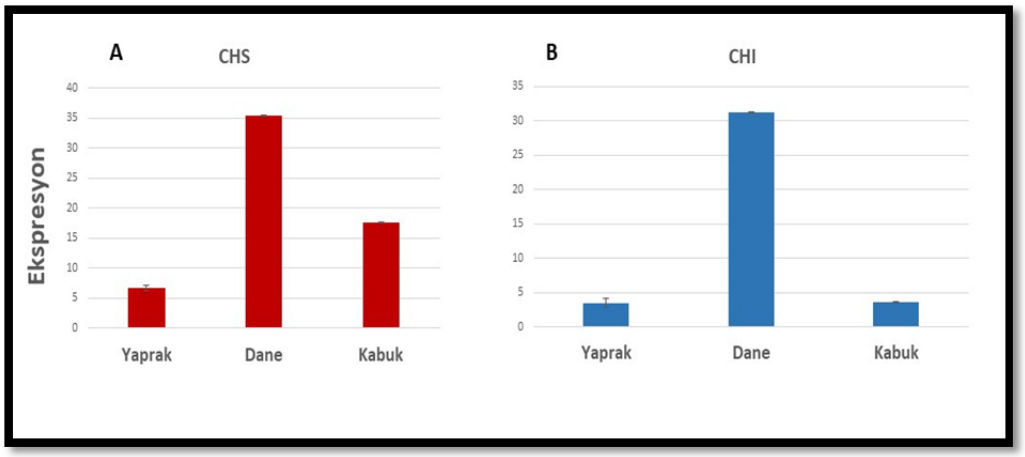
İzmir-1479 genotipine ait yapılan analizlerde farklı dokularda CHS geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifadenin yaprakta olduğu gözlenmiştir. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 5 kat daha fazla ifade olan kabukta olduğu gözlenmiştir. CHI geninde farklı dokularda yapılan analizler sonucunda en düşük ifade seviyesinin yaprakta olduğu gözlenmiştir. Yaprak dokusunda ifade seviyesi 0.1 ve danede 2,3 olduğu görülmüştür. Bundan dolayı en yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 23 kat daha fazla ifade olan danede olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5. İZMİR-1479 genotipine ait dokuların F3H ve PAL genlerindeki ekspresyon seviyeleri

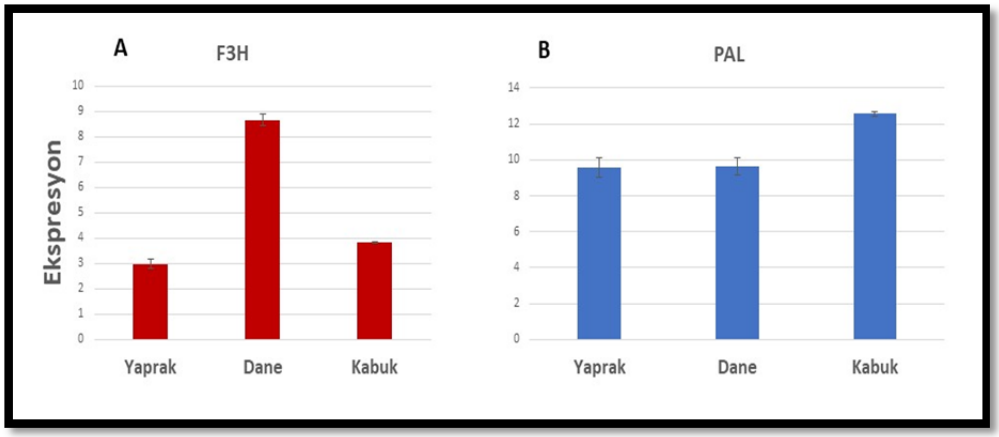
İzmir-1479 genotipinde F3H geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifadenin yaprak dokusunda olduğu gözlenmiştir. En yüksek ifadenin ise yaprağa göre 3 kat daha fazla ifade olan danede olduğu gözlenmiştir. PAL geninin ifade seviyesinde ise en düşük ifadenin yaprak ve danede olduğu görülmüştür. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 6.5 kat daha fazla ifade olan kabukta olduğu gözlenmiştir. Dane ve kabuk rengi pembe olan İzmir-1479 genotipinde CHS, CHI ve F3H geninde danede ekspresyon seviyesi yüksek çıkarken, kabukta PAL geninde ekspresyon düzeyi yüksek çıkmıştır. CHS ve CHI flavonoid yolağının katalizleyen genler olmasına karşın F3H ve PAL genleri antosiyanin biyosentez mekanizmasında CHI genlerinden sonra yolağın aktivasyonundan sorumlu olan genlerdir. Bu nedenle F3H ve PAL genlerinin ekspresyon profili CHS genine ait ekspresyon düzeyine oranla daha düşük düzeyde kalabilmektedir. F3H, bitki flavonoidlerinin biyosentetik yolundaki önemli bir enzimdir. Bitkilerde, F3H geni flavonoid biyosentez yolunun, yani flavanon 3-hidroksilazın enzimini kodlarken (Yu ve ark, 2013), PAL geni, fenilpropanoid yolağındaki ilk ve aynı zamanda hız sınırlayıcı bir adımı katalize eder, bu da flavonoidler dahil olmak üzere çeşitli ikincil metabolitler için öncüler sağlamakta (Liu ve ark, 2006) ve genel olarak

bitkiler ve çevre arasındaki etkileşim için önemli olan bitki sekonder metabolizmasında kritik görevler üstlenmektedir. Farklı sekonder metabolit yolaklarını katalizlemek için ekspresyon düzeyinde düşüşler görülmüş olabilir.



Şekil 4.6. 19/147 genotipine ait dokuların CHS ve CHI genlerindeki ekspresyon seviyeleri

Analizler sonucunda 19/147 genotipine ait farklı dokularda CHS geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifadenin yaprak dokusunda olduğu gözlenmiştir. Yaprak dokusunda ifade seviyesi 5 iken danede 35 olduğundan dolayı en yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 7 kat daha fazla ifade olan danede olduğu gözlenmiştir. CHI geninin ifadesi incelendiğinde ise en düşük ifadenin yaprak dokusunda olduğu görülmüştür. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 10 kat daha fazla olan dane dokusunda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.7. 19/147 genotipine ait dokuların F3H ve PAL genlerindeki ekspresyon seviyeleri

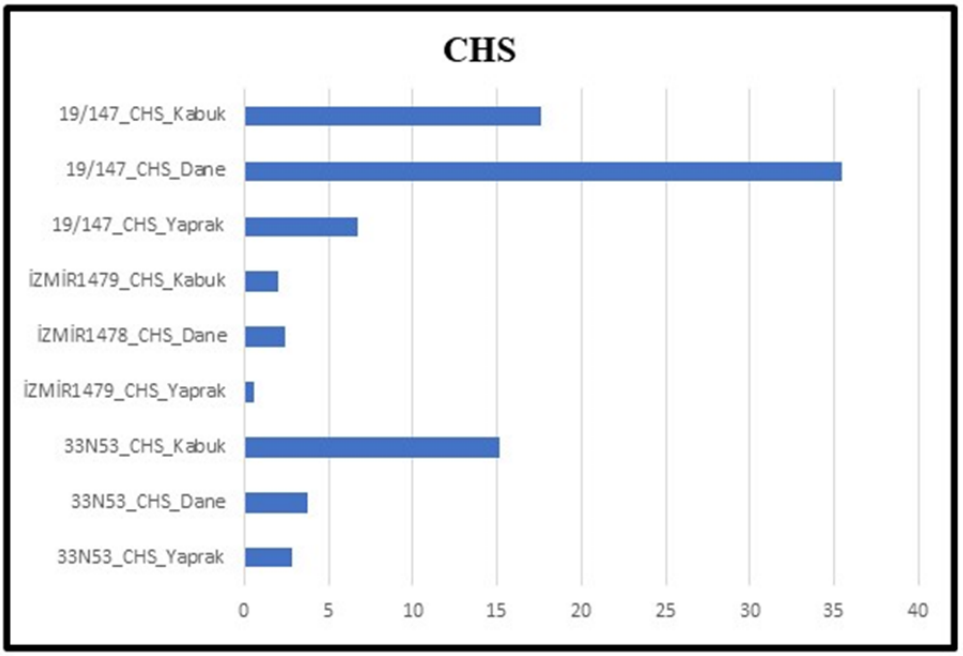
19/147 genotipinde F3H geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifadenin yaprak dokusunda olduğu gözlenmiştir. Yaprak dokusunda ifade seviyesi 3 iken danede 9 olduğundan dolayı en yüksek ifadenin ise yaprağa göre 3 kat daha fazla ifade olan dane de olduğu gözlenmiştir. Son olarak PAL geninin ifadesi incelendiğinde en düşük ifadenin yaprak ve dane dokusunda olduğu gözlenmiştir. En yüksek ifade seviyesinin ise yaprağa göre 1.5 kat daha fazla ifade olan kabuk dokusunda olduğu gözlenmiştir. Koyu kırmızı dane ve kabuk dokusuna sahip 19/147 genotipinde danede, CHS, CHI ve F3H genlerinde ekspresyon seviyesi yüksek iken kabukta, PAL geninde ekspresyon düzeyi yüksek bulunmuştur. Ekspresyon seviyeleri göz önüne alındığında en yüksek antosiyanin miktarı 19/147 genotipinde CHS geninde danede iken en düşük antosiyanin miktarı 33N53 çeşidinde CHI geninde yaprakta görülmüştür. Araştırılan genlerdeki antosiyanin miktarının kırmızı renkli çeşitlerde çok yüksek ifade seviyelerine ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca bazı genlerde gen ekspresyon seviyesi dane de daha yüksek bulunmuştur. Bu durum çeşitler arasında ve dokular arasında antosiyanin miktarı bakımından farklılıkların kaynağı olabilir.

Antosiyanin biyosentezinde iki sınıf gen önemli rol oynamaktadır. Bunlar yapısal genler ve yapısal genlerin ekspresyon düzeyini kontrol eden düzenleyici genler yani Transkripsiyon faktörleridir (Aza-Gonzalez, 2012). Renk yoğunluğundaki değişiklikler, yapısal ve düzenleyici genlerin ekspresyon seviyelerinde görülen farklılıklardan kaynaklanabilir.

CHI, çeşitli flavonoidler üreten fenilalanin metabolizma yolunun anahtar enzimidir. Pigment sentezi, çiçek, meyve ve tohum rengi oluşumunda önemli bir rol oynar (Liu ve ark, 2015). CHS, spesifik flavanoid yolunun başlangıcını temsil eder ve falavanoid iskeletin (C6-C3-C6) iki fenil halkasını oluşturmak için bir Þ-koumaroil-CoA ve üç malonil- CoA molekülünden bir kalkon oluşumundan sorumludur (Nabavi, 2020). Flavonoid biyosentetik yolağındaki ilk kararlı adımı katalize eden önemli bir enzimdir (Lu ve ark. 20019). Bu nedenle bu genlerin ekspresyon düzeyi direk antosiyanin sentezi ile ilişkili olmamakla birlikte antosiyanin biyosentez yolağında önemli fonksiyonlara sahip diğer genlerin katalizlenmesinde sorumludur. Bu nedenle ekspresyon düzeyinde değişimler görülebilir. F3H, bitki flavonoidlerinin biyosentetik yolundaki önemli bir enzimdir. Bitkilerde, F3H geni flavonoid biyosentez yolunun, yani flavanon 3-hidroksilazın enzimini kodlar (Yu ve ark, 2013).

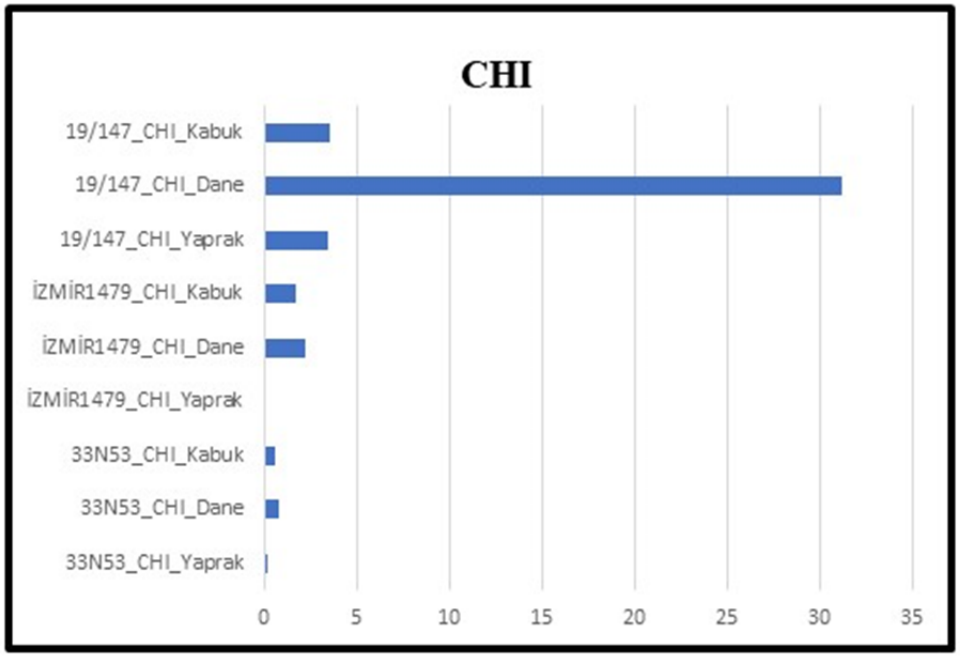
Zhao ve ark, (2015), antosiyanin biyosentez genlerinin transkript seviyeleri, kırmızı ve beyaz meyvelerde gerçek zamanlı PCR ile kantitatif olarak ölçmüşlerdir. Beyaz çeşidinde hiç antosiyanin saptanmamıştır. Beyaz çeşitte antosiyanin saptanmamasının nedeni; ANS ekspresyonunun eksikliğinin beyaz narda antosiyaninlerin bulunmamasından sorumlu ana faktör olabileceğini düşündürmektedir. Beyaz meyvelerin kabuklarında, pgANS hariç tüm tanımlanmış genlerin transkriplerini içeriyordu. Bundan dolayı pgANS ekspresyonunun eksikliğinin beyaz narda antosiyaninlerin bulunmamasından sorumlu ana faktör olabileceğini düşündürmektedir. Harel-Beja ve ark, (2019), yapmış oldukları çalışmada nar da antosiyanin ve punikalajin miktarını araştırmışlardır. Gen ekspresyonu ve metabolit (antosiyaninler ve punikalajin) birikimi meyve

gelişiminin üç aşamasında, sırasıyla yüksek ve düşük antosiyaninler, kırmızı ve pembe çeşitlerin kabuğunda belirlenmiştir. Kırmızı ve pembe nar türleri erken meyve gelişim aşamasından geç meyve gelişim aşamalarına geçiş sırasında gen ekspresyonunda en yüksek fark göstermiştir. Nar dışında yapılan diğer meyvelerde yapılan çalışmalarda da aynı şekilde kırmızı çeşitlerde yüksek antosiyanin miktarına rastlanmıştır. Wei ve ark, (2011), Liçi meyvesinde F3H, DFR, ANS ve UFGT genlerinde kırmızı olmayan çeşitlerin perikarpındaki ekspresyon seviyesi kırmızı çeşitlerle kıyaslandığında çok zayıf olduğu ortaya çıkmıştır. Karanjalker ve ark, (2017) yeşil, sarı ve kırmızı renkli mango çeşitlerinin kabuğunda yapılan gen ekspresyonu çalışmasında ise kırmızı renkli çeşitlerde daha yüksek antosiyanin miktarı olduğu ortaya konulmuştur. Palapol ve ark, (2009) hızlı renklenen mangostan meyvesinde yapmış oldukları çalışmada GmMYB10 geninin ekspresyon düzeyine hem olgunlaşma aşamasında hem de olgunlaştıktan sonra RT-PCR yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada GmMYB10 geninin ekspresyonunun renklenmeyle birlikte arttığı gözlenmiş ve bu genin antosiyanin biyosentezini teşvik edici özellikte olduğu belirlenmiştir. Feng ve ark, (2015) PyMYB10 geninin ekspresyon seviyesini armutta yaprak, çiçek ve meyve kabuğunda RT-PCR yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. İncelenen farklı dokularda PyMYB10 geninin ifadesinin kırmızı dokularda, kırmızı olmayan dokulara göre daha fazla düzeyde olduğu gözlemlenmiştir.



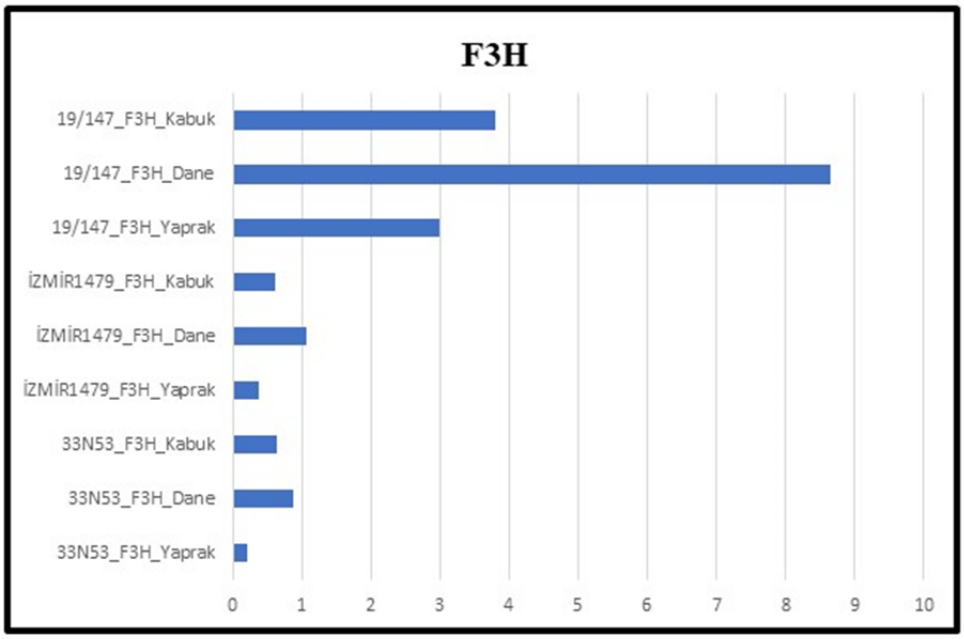
Şekil 4.8. CHS geninin tüm dokularda ifade seviyeleri

CHS genlerinin ekspresyon seviyeleri flavonoidlerin biyosentezi ile yüksek derecede ilişkilidir. Flavonoid biyosentetik yolağındaki ilk kararlı adımı katalize eden önemli bir enzimdir (Lu ve ark. 2019). CHS genine ait en yüksek ifade seviyesi 19/147 genotipine ait olan dane dokusunda gözlenmiştir. En düşük ifade seviyesi ise İzmir-1479 genotipine ait olan yaprak dokusunda olduğu görülmüştür.



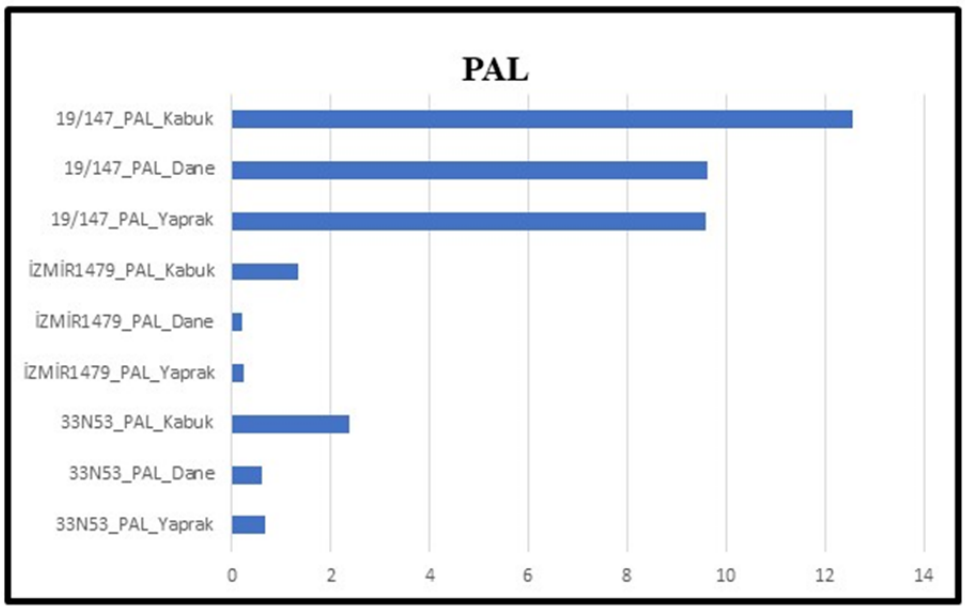
Şekil 4.9. CHI geninin tüm dokularda ifade seviyeleri

Kalkon izomeraz (CHI), bitkiler ve çevre arasındaki etkileşim için önemli olan bitki sekonder metabolizmasında kritik roller oynar. Çeşitli flavonoidler üreten fenilalanin metabolizma yolunun anahtar enzimidir (Liu ve ark, 2015). CHI genine ait en yüksek ekspresyon seviyesi 19/147 genotipine ait dane dokusunda ve en düşük ekspresyon seviyesi İzmir-1479 genotipine ait olan yaprak dokusunda gözlenmiştir.



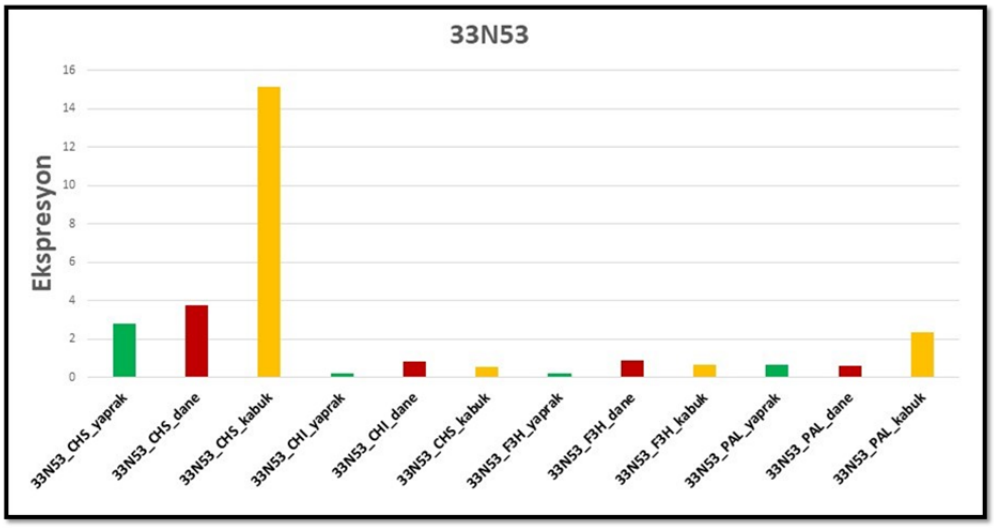
Şekil 4.10. F3H geninin tüm dokularda ifade seviyeleri

Flavanon 3-hidroksilaz (F3H), bitki flavonoidlerinin biyosentetik yolundaki önemli bir enzimdir (Khlestkina ve ark, 2013). F3H genine ait en yüksek ifade seviyesi 19/147 çeşidine ait olan dane dokusunda olduğu gözlenmiştir. En düşük ifade seviyesi ise 33N53 genotipine ait yaprak dokusunda gözlenmiştir.

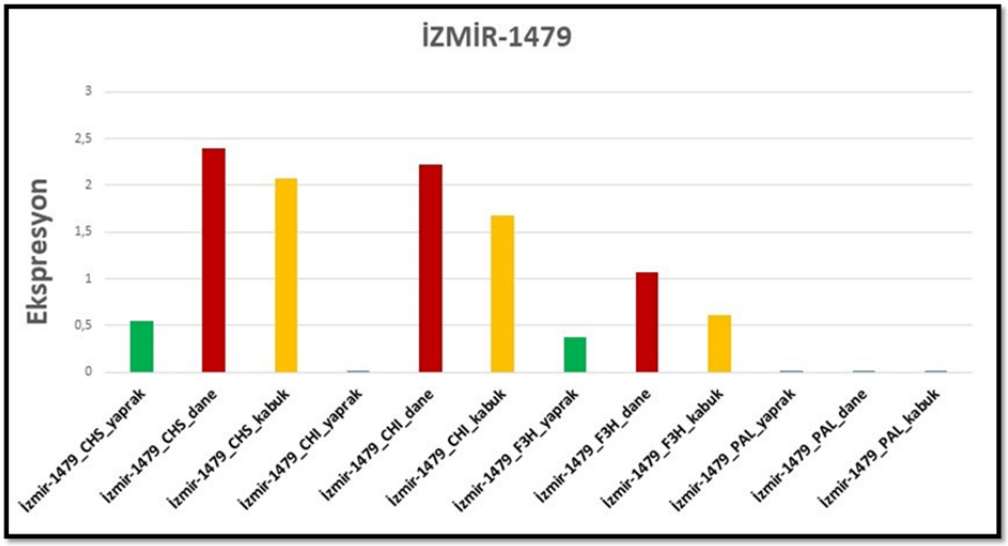


Şekil 4.11. PAL geninin tüm dokularda ifade seviyeleri

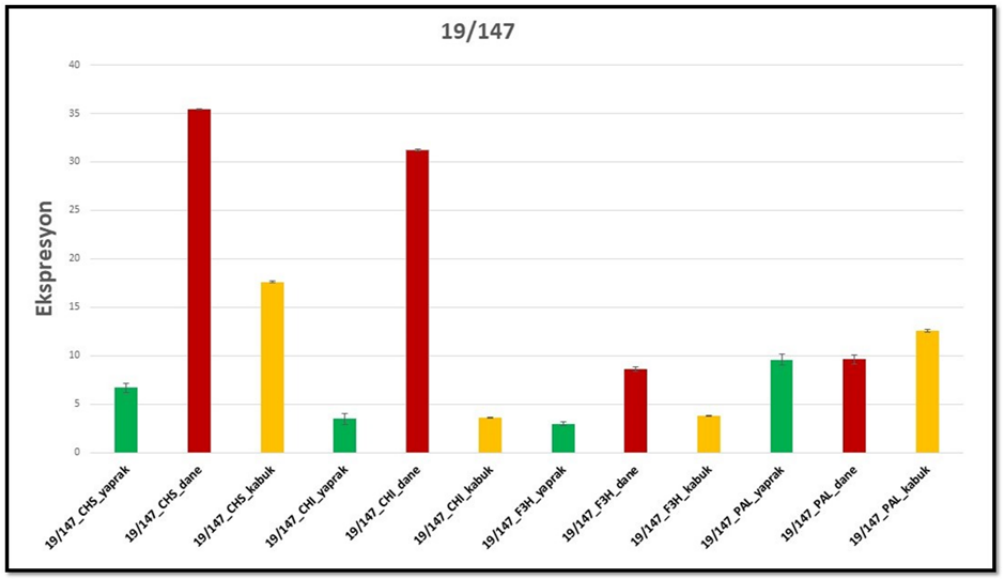
PAL geni, fenilpropanoid yolağındaki ilk ve aynı zamanda hız sınırlayıcı bir adımı katalize eder, bu da flavonoidler dahil olmak üzere çeşitli ikincil metabolitler için öncüler sağlamakta ve genel olarak bitkiler ve çevre arasındaki etkileşim için önemli olan bitki sekonder metabolizmasında kritik görevler üstlenmektedir (Liu ve ark, 2006). PAL genine ait en yüksek ekspresyon seviyesi 19/147 genotipine ait kabuk dokusunda iken en düşük ekspresyon seviyesi İzmir-1479 genotipine ait olan yaprak ve dane dokusunda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.12. 33N53 genotipine ait tüm genlerin ekspresyon seviyeleri



Şekil 4.13. İzmir-1479 genotipine ait tüm genlerin ekspresyon seviyeleri



Şekil 4.14. 19/147 genotipine ait tüm genlerin ekspresyon seviyeleri

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Nar, Punicaceae familyasına ait çok daneli bir meyve olup ekonomik önemi gün geçtikçe artan meyve türlerinden birisidir. Günümüzde bilim ve teknolojinin hızlı bir şekilde gelişmesiyle, insanlar sağlıklı yaşamaya ve faydalı gıdalar tüketmeye daha fazla özen göstermeye başlamışlardır. Bu bağlamda, nar bitkisinin kansere karşı koruyuculuk sağlama, kalp ve damar hastalıklarının tedavisi ve kolesterol ile şeker düzeyinin dengelenmesi başta olmak üzere, insan sağlığı üzerine birçok etkisi mevcuttur. Nar; folik asit, potasyum, fosfor, demir, C vitamini ve lif yönünden zengin bir meyvedir. Antioksidan içeriği yeşil çaydan üç kat fazla olan nar (Mori- Okamato ve ark. 2004, Anon, 2006a), hücre yenilenmesini büyümesini ve bağışıklık sistemini kuvvetlendirerek, vücut direncini artırmaya yardımcı olur. Antioksidan özelliği ile kansere karşı koruyucudur. Bu nedenle, bu meyve türü ile ilgili yapılan her bir çalışmanın özellikle organik nar yetiştiriciliğinin yaygınlaşmasına, ülkemizin ekonomisine ve daha sağlıklı bir toplumun oluşmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Nar Genetik Koleksiyonunda bulunan 3 farklı nar genotipinde meyve kabuğu, dane ve yaprak dokusunda, antosiyanin sentezi ile ilişkili 5 farklı genin (CHS, CHI, F3H, PAL, PgRPSII) ifade seviyeleri qRT-PCR tekniği ile araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda antosiyanin sentezi ile ilgili gen ekspresyon profilleri beyaz genotipte az miktarda, pembe genotipte orta miktarda ve kırmızı genotipte ise yüksek düzeyde eksprese olduğu görülmüştür. Genel olarak CHS ve CHI genlerinde yüksek miktarda ekspresyon seviyesi görülmüştür. Bunun nedeninin antosiyanin sentez yolağındaki ayrımdan sonra oluştuğundan dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple diğer genlerde ekspresyon seviyesi düşük gibi görünsede F3H de özellikle koyu kırmızı genotipte yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serbest radikalleri nötralize eden antioksidan etkinin kırmızı meyvelerde yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Bu da aslında çalışmamızda kullandığımız koyu

kırmızı genotipin antosiyanin biyosentezi ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyinin yüksek olmasıyla açıklanabilir. Özellikle insan sağlığında önemli bir yere sahip olan kırmızı meyvelerin tüketici talebinde artışlar olmaktadır bu da üreticileri besin komposizyonu zengin çeşitlerin ıslahına yönlendirmektedir. Bu nedenle bu çalışma da da görüldüğü gibi kırmızı meyvelerin gen ekspresyon düzeyindeki yüksek besin komposizyonu ile ilişkilendirilebilir ve ıslah için materyal seçiminde kullanılabilir. Gün geçtikçe besin komposizyonu yüksek meyvelerin üretimi ve tüketimine gidilmektedir. Bitkinin genetik yapısına, yetiştirildiği ortamın biyotik ve abiyotik stres faktörlerine bağlı olarak oluşan meyve rengi, tüketicinin tercihini etkileyen en önemli kalite parametrelerinden birisidir.

Antosiyaninler vakuollerde biriken suda çözünür bileşiklerdir. Bitkilerin pembe, kırmızı, mor ve mavi renklerinden sorumludurlar ve bitkilerde farklı seviyelerde birikirler (Aza-Gonzalez, 2012). Meyve rengi, tüketici talebinde önemli bir kriterdir bu durum meyvenin pazarlanabilirliğini etkileyen bir faktördür. İkincil metabolitler arasında, flavonoidler özellikle bitki büyümesi, gelişimi ve üremesi için çok önemlidir ve aynı zamanda insan sağlığının korunması için faydalıdır. Bu özellikler kapsamlı olarak incelendiğinde antioksidan kapasiteleri ile ilgilidir. Nar kabuğundaki ve danelerindeki su bazlı, tıbbi açıdan değerli ellagitannin fitokimyasalları nedeniyle oldukça önemlidir. Yapılan birçok çalışmada insan sağlığı için önemli etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Antosiyaninlerin antioksidan ve antienflamatuar aktiviteler sergilediğini ve tümör hücresi büyümesinin inhibisyonunu arttırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Reddy ve ark. 1997). Bugüne kadar narda antosiyanin miktarı ile ilgili çok fazla çalışma bulunmaktadır. Fakat renklenmeyi etkileyen genlerin ekspresyonuna yönelik moleküler düzeyde çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada antosiyanin sentezi ile ilgili genlerin ifade düzeyleri beyaz, pembe ve kırmızı nar genotiplerinde incelenerek renklenme ile olan ilişkileri araştırılmıştır.

Gerek nar meyvesi, gerek nardan yapılan ürünler insan sağlığını iyileştirici ve koruyucu etkileriyle tüketilmesi önerilen gıdalar arasındadır. Nar meyvesinin beslenme ve sağlık açısından önemi göz önünde tutularak; nar ekimi ve üretimi yaygınlaştırılmalı, nar meyvesi ve nar ürünlerinin tüketiminin artması sağlanmalıdır. Renk maddesi olarak gıdalara çekici bir renk kazandırmasının yanı sıra, gösterdikleri antioksidan etki nedeniyle antosiyaninlerin birçok kronik hastalığı önleyici etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Gil ve ark., 2000). Böylece daha sağlıklı bireyler ve toplumların oluşmasına etki edebileceği düşünülmektedir. Kanser hücrelerinin gelişimine karşı etkisinin yanı sıra, bazı mantarsal ve bakteriyel mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermesi nedeniyle, narın hem yaş meyve olarak hem de nar suyu olarak tüketimi yaygınlaştırılmalıdır. İnsan sağlığına olan faydalarından dolayı adeta bir ilaç ve hatta antibiyotik olan nar, özellikle bağışıklık sistemini güçlendirdiği ve insanları pek çok hastalıktan koruduğu için, tüketimine özen gösterilmelidir (Şimşek ve İkinci, 2017). İçerdiği bazı maddelerle, insandaki kolesterol ve şekerin dengelenmesine ve kalp sağlığının korunmasına olumlu etkisinden dolayı narın önemi vurgulanmalıdır. Antosiyanin içeriği yüksek ve diğer özellikler açısından da üstün olan nar çeşitlerini ıslahı konularında bu moleküler veriler kullanılabilecektir. Narda antosiyanin içeriği yüksek çeşitlerin geliştirilmesi günümüzde önemli bir konu haline gelmiştir. Moleküler teknikler ile yürütülen çalışmalar ıslah sürecine katkı sağlayabilmektedir. Antosiyanin mekanizması ile ilişkili markır veya QTL geliştirilmesi ıslah süreci için oldukça önemlidir. Günümüzde hızla gelişen yeni nesil dizileme teknolojileri ve genetik haritalama teknikleri kullanılarak bu genlerle ilişkili markırların geliştirilmesi ve ıslah çalışmalarına adapte edilmesi gerekmektedir. Ayrıca biyokimyasal çalışmalar ile daha fazla sayıda nar genotipinde antosiyanin içerikleri ve miktarları da ortaya konulmalıdır.

RT-PCR, son yılların İnsan Genom Projesiyle kullanım amaçları giderek artan bir tekniktir. Çünkü ekspresyon düzeyindeki tüm farklılıklar bu yöntemle hızlı bir şekilde açıklanabilir. Eş zamanlı olarak sonuç alınabilmesi ve non-spesifik bir bağlanma olmaması nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca sistemin hassasiyeti ve güvenirliği de kullanım oranını artmaktadır. Gelecekte de yoğun biçimde kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler arasında yerini koruyacağı muhakkaktır.

KAYNAKLAR

Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C. G., Reed, J. D., Mukhtar H., 2005. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer, 113: 423-433.

Akgöl, M., 2017. Nar'da (*Punica granatum*) yumuşak-sert çekirdek oluşum mekanizmasının moleküler, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana.

Akkuş, G., Akkuş, S., Muradoğlu, F., 2014. Nar'ın Türkiye Ekonomisindeki Yeri ve Önemi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi, Isparta, 1578.

Alighourchi, H., Barzegar, M., Abbasi, S., 2008. Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (Punica granatum L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization. European Food Research and Technology, 227(3), 881-887.

Arjen, J., Vail, T., Susan, A., Leon, A., Joseph, N., Mol, M., 1989. Regulation of chalcone flavanone isomerase (CHI) gene expression in Petunia hybrida: the use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen. Vrije Universiteit, Department of Genetics, Section Biosynthesis of Secondary Metabolites de Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam, Netherlands.

Aza-Gonzalez, C., Nunez-palenius, H. G., Ochoa-Alejo, N., 2012. Molecular biology of chili pepper anthocyanin biosynthesis. Journal of Mexıcon Chemical Society, 56(1).93-98.

Başaran, E., Aras S., Duman D., 2010. Genomik, Proteomik, Metabolomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Ankara, Cilt 67, Sayı 2, 88-89.

Ben- Simhon, Z., Judeinstein, S., Traının, T., Harel-Beja, R., Bar- Ya'akov, I., Borochov-Neori, H., 2015. A whıte anthocyanın-less pomegranate (*Punıca granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX; ANS) gene, Holland.

Bustin, S. A., Mueller, R., 2005. Review: Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis, Clinical Science, 109, 365-379.

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.

Feng, S., Sun, S., Chen, X., Wu, S., Wang, D., 2015. PyMYB10 and PyMYB10.1 ınteract with bhlh to enhance anthocyanin accumulation in pears. PLoS ONE, 10(11), 1-16.

Feng, S., Chen, X., Zhang, C., Liu, Z., Liu, X., Wanh, H., Wang, Y., Zhou, C., 2008. Relationship between anthocyanin biosynthesis anf related enzymes activity in pyrus pyrifolia mantianhong and ıts bud sports aoguan. Agricultural Sciences in China, 7(11),1318-1323.

Francis, D., 2010. Next generation sequencing of the tomato transcriptome. 28th International Horticultural Congress. Lisbon, Volume 1, p. 10, August 22-27.

Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food chemistry, 48(10), 4581-4589.

Günel, T., 2007. Gen anlatımının kantitatif analizi "Real- Time PCR", İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), İstanbul, 763-764.

Gündüzer, E., 2015. Tuz ve kuraklık stresi altında geliştirilmiş domates (*Solanum Lycopersicum* L.) bitkisinde katalaz geni mRNA ifade seviyesinin Real time PCR ile belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, s.1-196.

Harel-Beja, R., Tian, L., Freilich, S., Habashi, R., Borochov-Neori, H., Lahav, T., Amir, R., 2019. Gene expression and metabolite profiling analyses of developing pomegranate fruit peel reveal interactions between anthocyanin and punicalagin production. Tree Genetics & Genomes, 15(2), 22.

Hernandez, F., Melgarejo, P., Tomas-Barberan, F. A., & Artes, F. 1999. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. European Food Research and Technology, 210(1), 39-42.

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

Jaakola, L., 2013. New ınsights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. Trends in Plant Science, 18(9), 477-483.

Jaiswal, V., Dermarderosian, A., & Porter, J. R., 2010. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). Food Chemistry, 118(1), 11-16.

Karaca, E., 2011. Nar suyu konsantresi üretiminde uygulanan bazı işlemlerin fenolik bileşenler üzerine etkisi, Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, S. 26-36.

Karanjalker, G., 2017. A study on the expression of genes ınvolved in carotenoids and anthocyanins during ripening in fruit peel of green, yellow, and red colored mango cultivars, icar indian institute of horticultural research (IIHR), Hessarghatta Lake Post, Bengaluru,140-154, Indıa.

Kelebek, H., Canbaş, A., 2010. Hicaz narı şırasının organik asit şeker ve fenol bileşikleri içeriği ve antioksidan kapasitesi. GIDA, 35(6), 439-444.

Khlestkina, E., Dobrovolskaya, O., Leonova, I., Salina, E., 2013. Diversification of the duplicated F3h genes in triticeae. ınstitute of cytology and genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia.

Kısa, D., 2015. Ağır metallerin domateste (*Solanum Lycopersicm*) metollothionein gen ekspresyonu profilleri üzerine etkisi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı. Tokat, s.1-83.

Koca, İ., Karadeniz B., Tural S., 2006. Antosiyaninlarin antioksidan aktivitesi, Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, 133.

Kocaman, E., 2019. Ağır metal stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinde camta ve yabby genlerinin gen ifadesi düzeyinde incelenmesi. Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, s.1-119.

Kolaç, T., Gürbüz, P., Yetiş, G., 2017. Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri, İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, Cilt 5, Sayı 1, S.3-4.

Kurt, H., Şahin, G., 2013. "Bir Ziraat Coğrafyası Çalışması: Türkiye'de Nar (*Punica Granatum L.*) Tarımı", Marmara Coğrafya Dergisi, Sayı: 27, Ocak- 2013, S. 551-574.

Li, L., Ban, Z., Li, X., Wu, M., Wang, A., Jiang, Y., 2012. differential expression of anthocyanin biosynthetic genes and transcription factor PcMYB10 in pears (Pyrus communis L.) Key Laboratory of Food Nutrition and Safety (Ministry of Education), Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, People's Republic of China, p.1,10.

Liu, R., Xu, S., Li, J., Hu, Y., Lin, Z., 2006. Expression profile of a PAL gene from Astragalus membranaceus var. Mongholicus and its crucial role in flux into flavonoid Biosynthesis. National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, DOI 10.1007/s00299-005-0072-7. Chına.

Liu, Y., Zhao, S., Wang, J., Zhao, C., Guan, H., Hou, L., Li, C., Xia, H., Wang, X., 2015. Molecular cloning, expression, and evolution analysis of type II CHI gene from peanut (Arachis hypogaea L.) Dev Genes Evol 225:1–10 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Lu, X., Zhou, W., Gao, F., 2009. Cloning, characterization and localization of CHS gene from blood orange, Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Ruby. South China Normal University, Guangzhou, People's Republic of China.

Mercan, E., 2017. Farklı elma çeşitlerinde antosiyanin biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynayan MdMYBA, MdMYB10 ve MdMYB3 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi. Süleyman Demiral Üniversitesi, Isparta, s. 1-81.

Miguel, G., Fontes, C., Antunes, D., Neves, A., & Martins, D., 2004. Anthocyanin concentration of "Assaria" pomegranate fruits during different cold storage conditions. BioMed Research International, (5), 338-342.

Mori-Okamato. J., Otawara-Hamamato, Y., Yamato. H., Yoshimura, H., 2004. Pomegranate extract ımproves a depressive menopausal syndrome model ovariec tomized mice. J. Etnopharmacology. 92. 93-101.

Nabavi, S. M., 2020. Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. Biotechnology Advances, Volume 38, p.1478-1499.

Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. E., (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, Nature Protocols, 1(3):1559-1582.

Okutucu, B., Pehlivan S., 2003. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları, Ege Üniversitesi, İzmir,138-140,

Ono, N. N., Britton, M. T., Fass, J. N., Nicolet, C. M., Lin, D., and Tian, L., 2011. Exploring The Transcriptome Landscape of Pomegranate Fruit Peel for Natural Product Biosynthetic Gene and SSR Marker Discovery (F). Journal of Integrative Plant Biology, 53(10);800-13.

Ophir, R., Sherman, A., Rubinstein, M., Eshed, R., Schwager, M. S., Harel-Beja, R., 2014. Single-Nucleotide Polymorphism Markers from De-novo Assembly of The Pomegranate Transcriptome Reveal Germplasm Genetic Diversity. PloS One, 9(2);e88998.

Özen, G., Akbulut, M., 2008. Dut suyu antosiyanin içeriğinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Ziraat fakültesi, Gıda Mühendisliği, Konya, s.279-282.

Özgüven, A. I. Yılmaz, C., 2000. Pomegranate Growing in Turkey. I. Int. Symp. on Pomegranate, 15-17 October, Orihuela (Alicante) Spain, 41-48.

Palapol, Y., Ketsa, S., Stevenson, D., Cooney, J., 2009. Colour development and quality of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) fruit during ripening and after harvest. Postharvest Biology and Technology. DOI:10.1016/j.postharvbio.2008.08.003. P.349-353.

Reddy, R. K., Rurray, J. R., Ohmann, S. R., Tong, C. B. S., Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and humon tumor cell proliferation by natural food colors. Amer. Soc.Hortic. Sci. P.20-23.

Şengül, H., 2015. Narda bulunan antosiyaninlarin biyoyararlılığına gıda matrisi ve bileşenlerinin etkisi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, S.21.

Şimşek, M., 2017. A general overview of pomegranate (*Punica granatum* L.) Production Potentıal, Effects to Health, Problems and Solutıon Proposals of Turkey. Middle East J. of Science, 3(1):51-58.

Şimşek, M., İkinci, A., 2017.Narın (Punica granatum L.) insan sağlığına etkileri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21(4):494-506.

Şimşek, Ö., Dönmez, D., İmrak, B., Özgüven, A. I., & Kaçar, Y. A., 2018. Development of SSR markers by using next generation sequencing technology in pomegranate (*Punica granatum* L.). Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi, 4(2), 161-167.

Taguchi, G., Sharan, M., Gonda, K., Yanagisawa, K., Shlmosaka, M., Hayashida, N., Okazak, M., 1998. Effect of methyl jasmonate and elicitor on PAL gene expression in tobacco cultured cells. J. Plant Biochemistry & Biotechnology Vol. Japan, 7,79-84.

Tamer, C., 2006. Nar bileşimi ve insan sağlığı üzerine etkileri, Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Sayı:9, S.50-51.

Tu, Y., Liu, F., Guo, D., Fan, L., Zhu, Z., Xue, Y., Gao, Y., Guo, M., 2016. Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation. BMC Plant Biology. China, p. 2-12.

TUİK, 2020. İstatistikler/ Tarım / Bitkisel. www.tüik.gov.tr.

Yu, O., Shoeva, E., Khlestkina, E., 2013. F3h gene expression in various organs of wheat. ınstitute of cytology and genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.

Yuan, Z., Fang, Y., Zhang, T., Fei, Z., Han, F., Liu, C., & Zhang, M. 2018. The pomegranate (Punica granatum L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. Plant biotechnology journal, 16(7), 1363-1374.

Yıldız, M., 2009. Havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosentezi ile mor ve sarı renkleri veren P_1 ve Y_2 genlerinin haritalanması, Çukurova Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Adana.

Yılmaz, C., 2007. Nar. Hasad yayıncılık, İstanbul, 190s.

Yılmaz, F., 2012 Vişne (*Prunus cerasus* L.) Posasından fenolik madde ekstraksiyonunun optimizasyonu, Harran Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa, s.7-10.

Yüzbaşıoğlu, A., 2008. Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, s.1,54 .

Zhao, X., Yuan, Z., Feng, L., & Fang, Y., 2015. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate. Journal of plant research, 128(4), 687-696.

Zuker, A., Tzfira, T., Meir, H., Ovadis, M., Shklarman, E., Itzhaki, H., Forkmann, G., Martens, S., Sharir, I., Weiss, D., Vainstein, A., 2002. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. The Kennedy Leigh Centre for Horticultural Research and The Otto Warburg Center for Biotechnology in Agriculture, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.

Wang, Z., Yu, Q., Shen, W., Mohtar, C., Zhao, X., and Fredrick, G., 2018. Functional study of CHS gene family members in citrus revealed a novel CHS gene affecting the production of flavonoids. Citrus Research Institute, Southwest University, Xiema, Beibei, Chongqing 400715, BMC Plant Biology (2018) ,China,18:189.

Wannapinpong, S., Srikulnath, K., Thongpan A., Choowongkomon, K., Peyachoknagul, S., 2015. Molecular cloning and characterization of the CHS gene family in turmeric (Curcuma longa Linn.) Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Wei, Y., Hu, F., and Hu, G., 2011. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of litchi chinensis sonn, Physiological Laboratory for South China Fruits, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, China, 1-11.

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.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Nur ÜNAL, 11.09.1994 tarihinde Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana 'da tamamladı. 2013 yılında Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümüne başlayıp 2017 yılında mezun oldu. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Bu süreçte Adana Şehir Hastanesi Genetik Tanı Merkezinde çalıştı. Ocak 2018 'den bu yana yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.